



HAL
open science

Perturbateurs endocriniens de type phtalate et poisson zèbre *Danio rerio* : approche chémoprotéomique pour l'identification des cibles et recherche de signatures d'exposition

Rodrigue Yedji

► To cite this version:

Rodrigue Yedji. Perturbateurs endocriniens de type phtalate et poisson zèbre *Danio rerio* : approche chémoprotéomique pour l'identification des cibles et recherche de signatures d'exposition. Ecotoxicologie. Université de Lorraine, 2022. Français. NNT : 2022LORR0106 . tel-03887214

HAL Id: tel-03887214

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-03887214v1>

Submitted on 6 Dec 2022

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.



**UNIVERSITÉ
DE LORRAINE**

**BIBLIOTHÈQUES
UNIVERSITAIRES**

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact bibliothèque : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr
(Cette adresse ne permet pas de contacter les auteurs)

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

THESE

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Spécialité : Ecotoxicologie, Biodiversité, Ecosystèmes

par Rodrigue, Sègbégnon YEDJI

Perturbateurs endocriniens de type phtalate et poisson zèbre
Danio rerio : approche chémoprotéomique pour l'identification
des cibles et recherche de signatures d'exposition

Le 28 Juin 2022

Membres du jury :

Rapporteur	Dr. Amar BENNASROUNE	Maître de conférences, Université de Reims Champagne-Ardenne
Président du jury et rapporteur	Pr. Christophe MINIER	Professeur, Université Le Havre-Normandie
Invitée	Dr. Bénédicte SOHM	Ingénieure de recherche, Université de Lorraine
Co-directrice de thèse	Pr. Carole COSSU-LEGUILLE	Professeure, Université de Lorraine
Directeur de thèse	Dr. Éric BATTAGLIA	Maître de conférences, Université de Lorraine

Remerciements

J'aimerais tout d'abord témoigner toute ma reconnaissance et ma gratitude aux membres du jury de cette thèse : M. Christophe MINIER (Professeur de Toxicologie Environnementale à l'Université Le Havre - Normandie) et M. Amar BENNASROUNE (Maître de conférences HDR à l'Université de Reims Champagne-Ardenne). Je tiens à vous remercier sincèrement d'avoir accepté d'évaluer ce manuscrit.

Je tiens tout particulièrement à remercier mes directeurs de thèse : M. Éric BATTAGLIA, Mme Carole COSSU-LEGUILLE et Mme Bénédicte SOHM pour m'avoir fait confiance et recruté, pour leurs disponibilités, leurs soutiens, leurs conseils au quotidien mais aussi pour leurs convivialités durant ces quatre années de thèse.

Je tiens aussi à remercier la directrice du Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux (LIEC), Mme Laure GIAMBERINI pour l'intérêt qu'elle a su porter à l'avancement de mes travaux et pour son implication lors des moments difficiles.

Mes remerciements vont également aux membres de mon comité de suivi de thèse : Mme Hélène DUBOIS-POT-SCHNEIDER (Maître de Conférences à l'Université de Lorraine) et M. Frédéric SILVESTRE (Professeur associé, Université de Namur) pour leurs disponibilités et suivis, leurs suggestions et remarques durant ces quatre années de thèses.

J'exprime toute ma gratitude envers tous ceux qui ont collaboré avec nous sur ce projet : M. Alexandre SPECHT et Mme Elodie SPRICK pour l'expertise en synthèse des sondes photoactivables, Mme Virginie SALNOT et M. François GUILLONNEAU pour l'expertise en analyses LC-MS/MS.

Je remercie toutes les personnes qui ont croisées mon chemin de près ou de loin et ont ainsi participé à mes travaux,

Justine FLAYAC, David BILLET, Rania ZNAIDI, Clara VANDIN, Lalia MOSTEFA, Claudia OLIVEIRA, Emmanuel FLEURBAIX, Miriam BECK, Nicolas LACHAUX, Vinita VIJAYARAJ, Ziming WANG, Eva DELATOUR, Nicolas DUPUY, Elsa SALLES, Ludovic FARAVEL...

Merci à l'ensemble des membres du LIEC pour leurs disponibilités et leurs convivialités.

J'exprime aussi toute ma gratitude envers Monsieur Farid BABA-MOUSSA, Madame Hélène AHOUANDJINO et Monsieur Zoul-Kifouli ADEOTI, pour m'avoir soutenu durant mes études au Bénin et encouragé à faire une thèse doctorale.

Finalement je remercie ma famille et mes amis pour leurs soutiens qui m'a été bien utile durant ma thèse.

Table des matières

LISTE DES TABLEAUX	VII
LISTE DES FIGURE.....	VIII
LISTE DES SCHEMAS.....	XII
LISTE DES ANNEXES	XIII
LISTE DES ABREVIATIONS.....	XIV
Introduction	18
Chapitre 1 : Synthèse bibliographique.....	23
I.1. Pollution environnementale	24
I.1.1. Généralités.....	24
I.1.2. Etat des eaux de surface et souterraines en France	25
I.1.3. Pollution chimique des eaux : les micropolluants impliqués.....	27
I.2. Les composés perturbateurs endocriniens (CPE)	29
I.2.1. Définition	29
I.2.2. Caractéristiques des CPE.....	29
I.2.3. Mécanisme d'action des CPE.....	30
I.2.4. Propriétés toxicologiques des CPE	32
I.2.5. Molécules concernées par la perturbation endocrinienne.....	34
I.3. Les esters de phtalate.....	37
I.3.1. Présentation et origine	37
I.3.2. Synthèse et structure des phtalates	38
I.3.3. Propriétés physico-chimiques	42
I.3.4. Voies d'entrée et devenir dans l'environnement.....	43
I.3.4.1. Voies d'entrée des phtalates dans l'environnement.....	43
I.3.4.2. Devenir des phtalates dans l'environnement.....	46
I.3.5. Effets et mécanisme d'action des esters de phtalate chez les organismes vivants	48
I.3.5.1. Effets médiés par les PPARs	49
I.3.5.2. Effets médiés par les récepteurs ERs et AR	51
I.3.5.3. Autres récepteurs.....	53
I.3.6. Utilisation du DBP comme modèle de polluant.....	54
I.4. Le poisson zèbre: un organisme modèle pour la détermination des cibles moléculaires des CPE.....	54
I.4.1. Généralités sur le poisson zèbre.....	55
I.4.2. Cycle de vie du poisson zèbre.....	56
I.4.3. Intérêt écotoxicologique	58
I.4.4. <i>Danio rerio</i> et CPE : état actuel des connaissances	59

I.4.4.1. Effets des CPE sur les récepteurs de <i>D. rerio</i>	59
I.4.4.2. Autres effets des CPE observés chez <i>D. rerio</i> : mortalité, croissance, sexe ratio, histologie des gonades, fécondité.	61
I.5. Utilisation de nouvelles approches protéomiques pour la compréhension des modes d'action des xénobiotiques	62
I.5.1. Principe de l'ABPP	63
I.5.2. Sondes électrophiles (activity-based probes ABPs).....	66
I.5.3. Sondes de photoaffinité (Afinity-based probes AfBP)	68
I.5.3.1. Benzophénone (BP).....	70
I.5.3.2. Aryl azide (AA)	71
I.5.4. Techniques de ligation pour la détection des protéines marquées	73
I.5.4.1. Réaction de ligation catalysée par le Cu(I) : la chimie-click	74
Objectifs :	77
Chapitre 2 : Matériels & Méthodes	79
II.1. Utilisation de l'approche « <i>Affinity based protein profiling</i> » (AfBPP)	80
II.1.1. Synthèse chimique des sondes	80
II.1.1.1. Synthèse de la sonde 1,2-bis(but-3-yn-1-yl) benzène-1,2-dicarboxylate (aDBP).....	81
II.1.1.2. Synthèse des sondes de type aryl-azide.....	81
II.1.2. Validation <i>in vitro</i> des sondes photoactivables.....	87
II.1.2.1. Protocole générale de marquage de photoaffinité (protocole optimisé)	87
II.2. Utilisation de l'approche « <i>Activity-based protein profiling</i> » (ABPP) sur des larves de poisson zèbre (5 jours post-fécondation)	89
II.2.1 Conditions d'exposition des œufs de poisson zèbre	90
II.2.2 Extraction des ARN totaux et reverse transcription.....	92
II.2.3. Marquage avec la sonde à sérine.....	93
II.2.3.2.3. Marquage avec la dB-FP et purification sur billes magnétiques des protéines desthiobiotinylées.....	96
Chapitre 3 : Résultats.....	99
III.1. Utilisation des sondes photoactivables (AfBPP).....	100
III.1.1. Mise au point d'un protocole standard de marquage de photoaffinité.....	100
III.1.1.1. Choix des protéines modèles pour les marquages <i>in vitro</i>	100
III.1.1.2. Marquage par photoaffinité : choix de la température, du temps d'incubation et de la longueur d'onde d'irradiation des sondes.....	100
III.1.1.3. Elimination des sondes libres non fixées aux cibles protéiques	102
III.1.1.4. Ligation bioorthogonale par CuAAC (chimie-click)	104
III.1.1.5. Visualisation des protéines marquées par l'utilisation d'un tag fluorescent.....	105
III.1.1.6. Visualisation des protéines marquées par Western blot avec l'utilisation du tag azide-biotine (tag non fluorescent).....	106

III.1.2. Conception de la sonde sans groupe photoactivable (sonde témoin)	109
III.1.2.1. Propriétés physicochimiques de la sonde témoin aDBP	109
III.1.3. Conception des sondes azide	109
III.1.4. Propriétés physicochimiques des sondes azide	111
III.1.5. Validation <i>in vitro</i> des sondes azide photoactivables 3-N₃-aDBP et 4-N₃- aDBP	113
III.1.5.1. Utilisation de protéines modèles (BSA et GST Pi) pour la validation des sondes azide	113
III.1.5.2. Utilisation d'homogénat protéique de poisson zèbre pour la validation des sondes azide	118
III.1.6. Conception des sondes diazirine (DA)	122
III.1.6.1. Longueur d'onde d'irradiation du mélange protéine – sonde	123
III.1.8. Validation <i>in vitro</i> des sondes diazirine photoactivables (diazirine 2 et 3)	125
III.1.8.1. Utilisation de protéines modèles (BSA et GST Pi) pour la validation des sondes diazirine	125
III.1.8.2. Utilisation d'homogénat protéique de poisson zèbre pour la validation des sondes diazirine	130
III.1.9. Bilan de la validation <i>in vitro</i> des sondes photoactivables	131
III.2. Utilisation des sondes réactives aux hydrolases à sérines (ABPP)	132
III.2.1.1. Optimisation de la réactivité spécifique de la sonde TAMRA- FP : Cinétique de marquage	132
III.2.1.2. Optimisation de la réactivité spécifique de la sonde TAMRA- FP : influence de la concentration	133
III.2.2. Marquage compétitif entre les deux sondes ABPP (TAMRA-FP et dB-FP)	135
III.2.3. Profilage des hydrolases à sérine dans les fractions protéiques solubles et membranaires des larves de poisson zèbre	136
III.2.4. Détection des protéines réactives à la sonde dB-FP par SDS-PAGE couplée au Western blot	137
III.2.5. Optimisation d'une méthode de purification des protéines FP-biotinylées avec l'utilisation de billes magnétiques couplées à la streptavidine	137
III.2.6. Identification des SHs du protéome de poisson zèbre inhibés par le DBP <i>in vitro</i> par une ABPP compétitive	140
III.2.7. Identification des SHs dans le protéome des larves de poisson zèbre exposées au DBP	143
III.2.7.1. Influence du DBP sur la mortalité et anomalies de développement au cours de l'exposition des larves	143
III.2.7.2. Dosage de l'activité AChE	146
III.2.7.3. Expression des gènes cibles par qRT-PCR après exposition au DBP	146
III.2.7.4. Annotation des SHs dans le protéome des larves de poisson zèbre	147
III.2.7.6. Analyse des SHs identifiées	157

Chapitre 4 : Discussion	163
IV.1. Utilisation des sondes AfBPP pour la cartographie des cibles protéiques du DBP dans le protéome du poisson zèbre	164
IV.1.1. Les sondes azide	165
IV.1.1.1. Validation des sondes azide.....	166
IV.1.1.2. Influence du DBP sur le marquage des protéines : Hypothèse	168
IV.1.2. Les sondes diazirine	170
IV.2. Utilisation des sondes ABPP pour la cartographie des SHs et identification de marqueurs d'exposition au DBP chez poisson zèbre	174
IV.2.1. Validation de l'utilisation des sondes fluorophosphate (TAMRA-FP et dB-FP) pour le profilage des hydrolases à sérine dans le protéome du poisson zèbre.	175
IV.2.2. ABPP compétitive <i>in vitro</i> avec le DBP	175
IV.2.3. Mesure de l'activité AChE	176
IV.2.4. Mesure de l'expression des gènes (<i>acox-1, 17β-hsd, vtg</i>) cibles par RT-qPCR.....	177
IV.2.5. Cartographie des hydrolases à sérine du protéome de poisson zèbre	179
IV.2.6. Changements fonctionnels des SHs en fonction de l'exposition au DBP	181
Conclusions & Perspectives.....	186
Références bibliographiques.....	195
ANNEXE 1 : Article soumis dans le journal Zebrafish	215

LISTE DES TABLEAUX

- Tableau I.* Liste des CPE légalement reconnus dans l'UE.
- Tableau II.* Les esters de phtalate d'importance commerciale.
- Tableau III.* Propriétés physico-chimiques des esters phtalates à 25°C.
- Tableau IV.* Séquences des amorces des gènes testés dans cette étude.
- Tableau V.* Propriétés physicochimiques des ligands DBP et MBP et des sondes azide *AfBPP* issues de synthèse chimique.
- Tableau VI.* Propriétés physicochimiques des ligands DBP et MBP et des sondes diazirine *AfBPP* issues de synthèse chimique.
- Tableau VII.* Mortalité et anomalies de développement au cours de l'exposition des larves.
- Tableau VIII.* Protéines de *Danio rerio* enrichies par la sonde dB-FP.
- Tableau IX.* Annotation GO des SHs identifiées.

LISTE DES FIGURE

- Figure 1.* Illustration schématique des réactions d'un écosystème aquatique aux pollutions dans un bassin versant.
- Figure 2.* Évolution de l'état chimique des masses d'eau de surface et souterraines en France.
- Figure 3.* Evolution de l'état écologique des masses d'eau de surface en France.
- Figure 4.* Evolution du nombre de micropolluants quantifiés dans les cours d'eau en France.
- Figure 5.* Les caractéristiques clés des perturbateurs endocriniens.
- Figure 6.* Vue d'ensemble des mécanismes cellulaires par lesquels les hormones et les CPE agissent.
- Figure 7.* Représentation graphique des courbes dose-réponse toxicologiques des polluants chimiques.
- Figure 8.* Illustration des produits contenant des esters de phtalate (PAE).
- Figure 9.* Composition des esters de phtalate dans différents types d'eau douce et marine à l'échelle mondiale.
- Figure 10.* Composition en esters de phtalate des eaux potables à l'échelle mondiale.
- Figure 11.* Occurrence et biodégradation des esters de phtalate dans l'environnement.
- Figure 12.* Effets des esters de phtalate sur la signalisation endocrinienne.
- Figure 13.* Exemples d'effets et de mécanisme d'action connus des plastifiants y compris les esters de phtalate et le BPA chez les espèces aquatiques en général.
- Figure 14.* Principales étapes de développement embryon-larvaire du poisson zèbre.
- Figure 15.* Description du cycle biologique de *Danio rerio*.
- Figure 16.* Illustration de la structure classique d'une ABP.
- Figure 17.* Illustration de l'approche ABPP.
- Figure 18.* Illustration du marquage avec les deux types de sondes.
- Figure 19.* Illustration basique d'une ABP.
- Figure 20.* Techniques de ligation fréquemment utilisées dans le marquage en deux étapes.
- Figure 21.* Illustration des étapes liées à la conception et la synthèse des sondes photoactivables.
- Figure 22.* Synthèse des différentes étapes de marquage de photoaffinité des protéines selon la méthode générale utilisée.
- Figure 23.* Illustration de l'irradiation des tubes contenant les échantillons.

- Figure 24.* Vue d'ensemble de la démarche expérimentale.
- Figure 25.* Vue d'ensemble de l'expérience d'exposition des embryons de poisson zèbre au DBP.
- Figure 26.* Illustration de l'expérience de compétition entre la sonde T-FP et le DBP/PMSF/DMSO.
- Figure 27.* Illustration de la démarche analytique utilisée pour l'identification des SHs dans le protéome des larves de poisson zèbre.
- Figure 28.* Spectres d'absorption de la sonde 3-N₃-aDBP avec ou sans UV à 254 nm (A) et 365 nm (B).
- Figure 29.* Marquage de photoaffinité de la BSA (A) et de l'homogénat protéique de poisson zèbre (B) avec la sonde 3-N₃-aDBP. Comparaison entre l'utilisation de l'AscNa et du TCEP dans la réaction de CuAAC.
- Figure 30.* Marquage de photoaffinité de la GST Pi avec la sonde 3-N₃-aDBP.
- Figure 31.* Marquage de photoaffinité d'homogénat protéique de poisson zèbre avec la sonde 3-N₃-aDBP.
- Figure 32.* Structure de la sonde témoin (sans groupe photoactivable).
- Figure 33.* Conception des sondes azide. A) positionnement des groupes fonctionnels ; B) structure des sondes azide : deux sondes basées sur la structure du DBP (analogues au DBP) et deux autres analogues au MBP.
- Figure 34.* Marquage de la BSA par les sondes azide (3-N₃-aDBP, 4-N₃-aDBP) et la sonde témoin (aDBP).
- Figure 35.* Marquage de photoaffinité avec les sondes azide.
- Figure 36.* Marquage compétitif entre le DBP et les sonde azide.
- Figure 37.* Marquage de photoaffinité sur des homogénats protéiques de poisson zèbre.
- Figure 38.* Marquage de photoaffinité sur des homogénats protéiques de poisson zèbre.
- Figure 39.* Marquage compétitif entre le DBP et la sonde azide 3-N₃-aDBP : utilisation d'homogénat protéique de poisson zèbre.
- Figure 40.* Conception des sondes diazirine. A) positionnement des groupes fonctionnels. B) structure des sondes diazirine : deux sondes basées sur la structure du DBP (analogues au DBP) et une sonde analogue au MBP.
- Figure 41.* Spectres d'absorption de la sonde diazirine 2 avec ou sans UV à 365 nm.
- Figure 42.* Marquage par photoaffinité de la BSA avec la sonde diazirine 2.
- Figure 43.* Marquage par photoaffinité avec les sondes diazirine.

- Figure 44.* Marquage compétitif entre le DBP et la sonde diazirine 2 pour le site de fixation sur la BSA.
- Figure 45.* Marquage de photoaffinité avec la sonde diazirine 2.
- Figure 46.* Marquage de photoaffinité avec les sondes diazirine à partir d'homogénat protéique de poisson zèbre.
- Figure 47.* Cinétique du temps d'incubation de la sonde TAMRA-FP avec l'homogénat protéique de poisson zèbre.
- Figure 48.* Marquage des SHs de poisson zèbre avec des concentrations croissantes en sonde.
- Figure 49.* Marquage compétitif entre la sonde couplée à la desthiobiotine et celle couplée au fluorochrome TAMRA.
- Figure 50.* Marquage des fractions protéiques (soluble et insoluble) de larves de poisson zèbre avec la sonde TAMRA-FP.
- Figure 51.* Marquage de la fraction protéique soluble de larves de poisson zèbre avec la sonde dB-FP couplée à la visualisation par Western blot.
- Figure 52.* Purification des protéines (fraction soluble) marquées à la dB-FP avec des billes magnétiques couplées à la streptavidine.
- Figure 53.* Purification des protéines (fraction insoluble) marquées à la dB-FP avec des billes magnétiques couplées à la streptavidine.
- Figure 54.* ABPP compétitif *in vitro* entre la sonde dB-FP et le DBP (gel de gauche), et le PMSF (gel de droite).
- Figure 55.* ABPP compétitif *in vitro* entre la sonde dB-FP et le DBP.
- Figure 56.* Activité de l'AChE chez des larves de poisson zèbre (*D. rerio*) exposées à différentes concentrations de DBP (0, 5 et 100 µg/L) pendant 5 jours.
- Figure 57.* Perturbation de l'expression de trois gènes cibles (*Acox1*, *17β-hsd*, *vtg 7*) mise en évidence par RT-qPCR chez des larves de poisson zèbre exposées à différentes concentrations de DBP (0, 5 et 100 µg/L) pendant 5 jours.
- Figure 58.* Diagramme de Venn montrant la répartition des SHs identifiées en fonction des conditions d'études.
- Figure 59.* Expression des hydrolases à sérine métaboliques chez les larves de poisson zèbre exposées au DBP.
- Figure 60.* Expression des protéases à sérines chez les larves de poisson zèbre exposées au DBP.

Figure 61. Réseaux de protéines associées aux voies de signalisation canoniques telles que définies par l'analyse Ingenuity Pathway (IPA).

Figure 62. Illustration de la nouvelle sonde photoactivable.

LISTE DES SCHEMAS

- Schéma 1.* Réaction entre l'anhydride phtalique et l'alcool (ROH) permettant de synthétiser un ester de phtalate (R et R' représentent les chaînes latérales alkyle).
- Schéma 2.* Transformation des esters de phtalate par hydrolyse.
- Schéma 3.* Voies générales de biodégradation des esters de phtalate dans l'environnement.
- Schéma 4.* Mode d'action de quelques groupes photoactivables.
- Schéma 5.* Synthèse des triazoles par la réaction de cycloaddition de Huisgen entre l'azide et l'alcyne.
- Schéma 6.* Mécanisme réactionnel de chimie click catalysée par le Cu(I).
- Schéma 7.* Mécanisme réactionnel de chimie click catalysée par le Cu(I) en présence du Cu(II), d'un ligand et d'un agent réducteur.
- Schéma 8.* Synthèse de la sonde 1,2-bis(but-3-yn-1-yl) benzène-1,2-dicarboxylate (aDBP).
- Schéma 9.* Synthèse des sondes de type aryl-azide ; 1,2-bis(but-3-yn-1-yl)3-azidobenzène-1,2-dicarboxylate (3) et 1,2-bis(but-3-yn-1-yl)4-azidobenzène-1,2-dicarboxylate (6).
- Schéma 10.* Structures des sondes azide analogues au MBP. Acide 3-azido-2-[(but-3-yn-1-yloxy)carbonyl]benzoïque (3') et l'acide 4-azido-2-[(but-3-yn-1-yloxy)carbonyl]benzoïque (6').
- Schéma 11.* Synthèse de la molécule [3-(1,1-difluoroprop-2-yn-1-yl)-3H-diazirine-3-yl] méthanol (15).
- Schéma 12.* Synthèse de la sonde but-3-yn-1-yl [3-(1,1-difluoroprop-2-yn-1-yl)-3H-diazirine-3-yl]méthyl benzène-1,2-dicarboxylate (17) (diazirine-2).
- Schéma 13.* Synthèse de l'acide 2-([3-(1,1-difluoroprop-2-yn-1-yl)-3H-diazirine-3-yl]méthoxy)carbonyl)benzoïque (18) (diazirine-1).
- Schéma 14.* Synthèse de la sonde bis{[3-(1,1-difluoroprop-2-yn-1-yl)-3H-diazirine-3-yl]méthyl} benzène-1,2-dicarboxylate (19) (diazirine-3).
- Schéma 15.* Structure chimique des sondes à sérine (i, ii) et de l'inhibiteur des hydrolases à sérine (iii).
- Schéma 16.* Illustration de l'hypothèse d'acylation des protéines par la diazirine-2.

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1. Article soumis dans Zebrafish

LISTE DES ABREVIATIONS

(Q)SAR: quantitative structure activity relationship

C_{WL}^S : solubilité aqueuse

3/4-N₃-aDBP: 3/4-azido-alcyne-n-dibutyl phtalate

AA: aryl azide

ABP: sonde basée sur l'activité

ABPP: activity-based protein profiling

AChE: acétylcholine estérase

aDBP: alcyne di-n-butyl phtalate

ADES: Banque nationale d'accès aux données sur les eaux souterraines

ADN: acide désoxyribonucléique

AfBPP: affinity-based protein profiling

AHR: récepteur d'aryl hydrocarbure

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

AOP: adverse outcome pathway

AR: androgen receptor

ARN: acide ribonucléique

BP: benzophénone

BPA: bisphénol A

BPDS: bathophénanthroline disulfonate

BSA: bovine serum albumin

CAR: chimeric antigen receptor

CAT: catalase

CE: commission européenne

CES: carboxylestérase

CF₂N₂: difluorodiazométhane

ChE: cholinestérases

CPE: composés perturbateurs endocriniens

CSTEE: comité scientifique de la toxicité, de l'écotoxicité et de l'environnement

Cu(I): iodure de cuivre

Cu(II): oxyde de cuivre

CuAAC: cycloaddition d'alcyne-azide catalysée par le cuivre (I)

CuSO₄·5H₂O: sulfate de cuivre pentahydraté

CYP: cytochrome P450

DA: diazirine

dB-FP: desthiobiotine- fluorophosphonate

DBP/DnBP: di-n-butyl phtalate (phtalate de dibutyle)

DCC: N-N'-dicyclohexylcarbodiimide

DCE: directive-cadre sur l'eau

DEHP: di(2-ethylhexyle) phthalate

DES: diethylstilbestrol

DMAP: 4-diméthylaminopyridine

DMSO: diméthylsulfoxyde

DOM: départements d'outre-mer

DTT: dithiothréitol

E2: 17β-estradiol

ECHA: european chemicals agency

EDTA: éthylènediaminetétraacétique

EE2: 17α-éthynylestradiol

ER: estrogen receptor

GO: gene ontology

GPx: glutathion peroxydase

GST: glutathion-S-transférases

GST Pi: glutathion S-transférase Pi

H: constante de la loi de Henry

HAP: hydrocarbures aromatiques polycycliques

HDAC: histones désacétylases

hpf: heures post-fécondation

HSA: human serum albumin

IPA: ingenuity Pathway

K_{AW}: coefficient de partage air-eau

K_d: constante de dissociation

K_{OA}: coefficient de partage octanol-air

K_{ow}: coefficient de partage Octanol –Eau

LB: Laemmli buffer

LC-MS/MS: chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem

LFQ: label free quantification

LPO: lipid peroxidation

MBP: monobutyle phtalate

N₂: diazote

NaAsc: ascorbate de sodium

OCDE: organisation de coopération et de développement économiques

OFB: office français de la biodiversité

PA: phthalic acid (acide phtalique)

PAE: phthalic acid esters (esters de phtalate)

PAL: marquage de photoaffinité

PBS: phosphate Buffered Saline

PE: perturbateur endocrinien

PFOS: perfluorooctanesulfonate

PMSF: fluorure de phénylméthylsulfonyle

PPARs: peroxisome proliferator-activated receptor

PS: poids sec

PTBP: 4-tert-Butylphenolformaldehyde resin

PVC: polychlorure de vinyle

PXR: pregnane X receptor

REACH: registration, évaluation, authorization and restriction of chemicals

ROS: reactive oxygen species (espèces réactives de l’oxygène)

RT-qPCR: quantitative reverse transcription PCR

RXRs: retinoid x receptor

SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis

SH: serine hydrolase

SOD: superoxyde dismutase

TAMRA-FP / T-FP: TAMRA-fluorophosphonate

TAMRA: tetramethylrhodamine

TBST: tris-buffered saline-Tween

TBTA: tris [(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl] amine

TCA: acide trichloracétique

TCEP: tris(carboxyéthyl)phosphine

TH: thyroid hormones

THPTA: tris(hydroxypropyltriazolylmethyl) amine

TR: thyroid hormone receptor

Trp: tryptophane

UE: union européenne

US EPA: U.S. Environmental Protection Agency

UV: ultraviolet

V_p: pression de vapeur

VTG: vitellogénine

RESUME

Les esters de phtalate constituent une famille de composés synthétiques très répandue du fait de leurs usages comme plastifiants. Ils entrent dans la composition de plusieurs produits plastiques tels que les emballages, les jouets, les produits cosmétiques, certains systèmes de toiture en plastique, ainsi que les matériaux de décoration de meubles. Les phtalates ne sont pas liés de manière covalente à la matrice des polymères et sont donc facilement rejetés dans l'environnement, entraînant par conséquent une exposition animale et humaine. En absence de produits de substitutions non-toxiques, les composés de type phtalate restent encore largement utilisés dans l'industrie en dépit de la classification de certains d'entre eux dans la catégorie des substances présumées toxiques par l'European Chemicals Agency (ECHA), en tant que perturbateurs endocriniens. De plus, ils sont cancérigènes et tératogènes. L'effet délétère des esters de phtalates sur les organismes est établi mais le caractère multiple des effets observés montre que les mécanismes d'action des phtalates ne sont que très partiellement élucidés. Nous avons utilisé deux approches de protéomique ciblée pour tenter d'éclairer nos connaissances sur les mécanismes d'actions des esters de phtalate. Pour cela, le dibutyl phtalate (DBP) a été utilisé comme phtalate modèle, et le poisson zèbre (*D. rerio*) comme organisme modèle. L'utilisation de la première approche de protéomique ciblée, le profilage protéique basé sur l'affinité (*affinity-based protein profiling*, AfBPP) a permis de montrer la perturbation fonctionnelle de protéines par le DBP avec des sondes photoactivables issues de la synthèse de types aryle azide. L'optimisation des conditions de fixation des sondes diazirine (Diazirine 2) devrait nous permettre de disposer d'une sonde pouvant être utilisée pour identifier les cibles protéiques du DBP dans le protéome du poisson zèbre. La deuxième approche, le profilage basé sur l'activité des enzymes (*activity-based protein profiling*, ABPP) a permis d'utiliser une sonde réactive spécifique des hydrolases à sérine (SHs) pour cartographier pour la première fois des SHs actives dans le protéome du poisson zèbre. L'identification des SHs dérégulées en présence de DBP chez les larves de poisson zèbre a également été rapportée dans cette étude. Nos résultats globaux indiquent que les approches de protéomiques ciblées telles que l'ABPP ou l'AfBPP peuvent être un atout pour comprendre les mécanismes d'action liés aux xénobiotiques en écotoxicologie.

Mots clés : Larves de poisson zèbre, hydrolases à sérine, dibutyl phtalate, « activity-based protein profiling », « affinity-based protein profiling ».

ABSTRACT

Phthalate esters are a family of synthetic compounds widely used as plasticisers. They are used in a number of plastic products such as packaging, toys, cosmetics, plastic roofing system and furniture decoration materials. Phthalates are not covalently bonded to the polymer matrix and are therefore easily released into the environment, resulting in animal and human exposure. In the absence of non-toxic substitutes, phthalate compounds are still widely used in industry, despite the classification of some of them by the European Chemicals Agency (ECHA) as suspected toxic substances and as endocrine disruptors. In addition, they are carcinogenic and teratogenic. The deleterious effect of phthalate esters on organisms is established, but the multiple nature of the effects observed shows that the mechanisms of action of phthalates are only partially elucidated. We used two targeted proteomics approaches to shed light on the mechanisms of action of phthalate esters. Dibutyl phthalate (DBP) was used as a model phthalate and zebrafish (*D. rerio*) as a model organism. Using the first targeted proteomics approach, affinity-based protein profiling (AfBPP), the functional disruption of proteins by DBP with photoaffinity probes from aryl azide synthesis was demonstrated. Optimisation of the binding conditions for diazirine probes (Diazirine 2) should provide us with a probe that can be used to identify DBP protein targets in the zebrafish proteome. The second approach, activity-based protein profiling (ABPP), used a reactive probe specific for serine hydrolases (SHs) to map active SHs in the zebrafish proteome for the first time. The identification of deregulated SHs in the presence of DBP in zebrafish larvae was also reported in this study. Overall, our results indicate that targeted proteomics approaches such as ABPP or AfBPP can be an asset for understanding xenobiotic-related mechanisms of action in ecotoxicology.

Key words: Zebrafish larvae, serine hydrolases, dibutyl phthalate, activity-based protein profiling, affinity-based protein profiling.

Introduction

Avec une production mondiale annuelle autour de 400 millions de tonnes et des prévisions estimées à 600 millions de tonnes pour 2025 (Fuhr and Franklin, 2020), le plastique présente de nombreux risques pour la santé humaine et environnementale. Ces risques proviennent du fait que de nombreux produits chimiques sont ajoutés à la matière plastique elle-même (phtalates, le bisphénol A, 4-tert-butylphénol etc.) pour lui donner des propriétés souhaitées, mais sont dangereux pour la santé humaine et animale. Par exemple les esters de phtalate couramment retrouvés dans divers produits plastiques, migrent des sacs de stockage et des tubes utilisés pour la transfusion sanguine ou la dialyse rénale et se retrouvent dans l'organisme (Mettang et al., 2000). Hormis la présence de produits chimiques dangereux dans les matières plastiques, les particules de plastique sont omniprésentes dans tous les compartiments environnementaux (air, eau et sol) et dans la chaîne alimentaire (Danopoulos et al., 2020; De-la-Torre, 2020; Gasperi et al., 2018; Phuong et al., 2021). Un article récent publié dans la revue scientifique *Environmental International* rapportait pour la première fois les preuves sur la présence de particules de plastiques dans le sang humain (Leslie et al., 2022). Au cours des vingt dernières années des découvertes similaires se sont multipliées et soulèvent de nombreuses questions notamment celles concernant les dangers associés à de telles expositions. Dans un contexte « *One Health* » où la santé humaine, animale et environnementale aux échelles locales, nationales et planétaire ne sont plus dissociables (Zinsstag et al., 2011), il est urgent d'apporter des réponses claires quant aux dangers liés aux polluants en générale et ceux liés aux plastiques en particulier.

En toxicologie de l'environnement, les écosystèmes aquatiques constituent le réceptacle majeur des polluants issus de l'agriculture, des transports, des industries et d'autres activités humaines. La présence de ces polluants dans les écosystèmes aquatiques induit une pression considérée comme un état « d'altération » pouvant nuire aux organismes. Dans le souci de protéger les eaux de surface et souterraine d'une dégradation et protéger l'environnement aquatique, l'Union Européenne (UE) a publié la directive 2000/60/CE pour inciter chaque pays membre à atteindre un « bon état écologique » dans les eaux de surface. Cette première directive a été suivie par deux autres (2008/105/CE et 2013/39/UE) qui fixent les normes de qualité environnementale pour les substances dites prioritaires et certains autres polluants, que les états membres devraient appliquer aux eaux de surface. Cependant de récentes études de suivi dans de nombreux pays européens ont établi que le risque pour l'environnement aquatique est non seulement présent mais parfois sous-estimé (Papadakis et al., 2017). De plus, la plupart des outils de biosurveillance de la pollution aquatique ont montré des insuffisances quant à leurs

capacités à apporter des preuves solides des associations entre l'exposition à des produits chimiques et leurs effets néfastes sur la santé des organismes. En outre, notre capacité à établir des liens de causalité définitifs entre les polluants et leurs effets est complexifié par la grande variabilité des facteurs environnementaux dans les écosystèmes aquatiques. De plus, la stratégie classique utilisée en écotoxicologie qui consiste à évaluer les polluants anthropiques (outre leur bioaccumulation) en termes d'effets ciblés sur certains paramètres biologiques (tels que mortalité, perturbation de l'activité ou de l'expression de biomarqueurs), n'apporte pas de réponse spécifique en lien avec la nature du contaminant car ces biomarqueurs sont associés à une variété de stress.

Parmi les polluants les plus problématiques, on retrouve les composés perturbateurs endocriniens (CPE), qui sont des substances exogènes pouvant affecter les fonctions physiologiques, notamment la reproduction des organismes, en interagissant avec le système endocrinien. Les esters de phtalate font partie des CPE fréquemment pointés du doigt aussi bien en santé humaine que dans le domaine environnemental. Ils sont largement utilisés comme plastifiants et sont présents dans tous les compartiments environnementaux (Peijnenburg, 2008). Les esters de phtalate pénètrent dans l'environnement par des pertes au cours des processus de fabrication via les émissions atmosphériques, les effluents aqueux, les déchets solides et la lixiviation des produits finaux, car ils ne sont pas liés chimiquement à la matrice polymère (Liang et al., 2008; Peijnenburg, 2008; Stanley et al., 2003). En absence de produits de substitutions non-toxiques, les composés de type phtalate restent encore largement utilisés dans l'industrie en dépit de la classification de certains d'entre eux dans la catégorie des substances présumées toxiques par l'European Chemicals Agency (ECHA), en tant que perturbateurs endocriniens.

La toxicité des esters de phtalate varie selon le type de composé, et est liée à leurs structures chimiques. Plusieurs auteurs ont rapporté des effets liés à l'exposition aux phtalates, tels que le dysfonctionnement de l'appareil reproducteur et les malformations embryonnaires chez plusieurs espèces de mammifères (tels que les rongeurs) et de poissons (Kinch et al., 2016 ; Gao et al., 2016 ; Uren-Webster et al., 2010, Carnevali et al., 2005). L'effet délétère de ces substances sur les organismes est établi mais le caractère multiple des effets observés montre que les mécanismes d'action des esters de phtalate ne sont que très partiellement élucidés.

La compréhension des bases mécanistiques à l'origine des effets observables à divers niveaux d'organisation biologique est primordiale pour l'évaluation prédictive des risques en

toxicologie de l'environnement. Dans ce sens, les approches « omiques » offrent un éclairage unique sur la façon dont les xénobiotiques peuvent affecter un organisme. Elles ont été utilisées pour identifier ou suggérer des modes d'action ou des effets indésirables potentiels (Garcia-Reyero et al., 2014) mais aussi pour la détermination des biomarqueurs d'exposition aux polluants. Cependant, les techniques « omiques » classiques n'apportent pas toutes les réponses sur les mécanismes d'actions des xénobiotiques en général et celui des esters de phtalate en particulier. En effet, les études concernant l'interaction entre une molécule et ses partenaires potentiels ou encore l'analyse spécifique de famille de protéines possédant une activité enzymatique ne sont pas possibles par la réalisation d'une approche de protéomique standard. En revanche, l'utilisation de nouvelles approches de protéomiques ciblées comme la chémoprotéomique rend ces études possibles. Les approches chémoprotéomiques, peuvent révéler de nouvelles protéines et compléter les connaissances déjà existantes ou clarifier des fonctions de protéines qui n'ont pas été décrites précédemment, générant ainsi de nouvelles hypothèses (Miller et al., 2014).

La chémoprotéomique est un domaine de la biologie chimique qui évolue rapidement, elle utilise la chimie de synthèse pour générer des sondes informant sur le mode d'action des petites molécules et la fonction des protéines (Wright and Sieber, 2016). Dans le contexte des CPE, la chémoprotéomique peut être utilisée pour identifier les récepteurs protéiques ou les cibles de ces composés dans les cellules ou organismes vivants. Elles peuvent aussi aider à identifier les enzymes impliquées dans la métabolisation, la détoxification, ou l'élimination des contaminants chimiques.

Deux objectifs majeurs ont motivé la réalisation de nos travaux de recherche : **(i)** définir les partenaires protéiques interagissant directement avec les CPE de type phtalate chez le poisson zèbre *Danio rerio*, par l'utilisation d'une stratégie de chémoprotéomique faisant appel au marquage de photoaffinité (*Affinity-Based Protein Profiling AfBPP*), **(ii)** cartographier les hydrolases à sérines du protéome du poisson zèbre et identifier celles dont l'expression est perturbée dans le cadre d'une exposition au phtalate de dibutyle (DBP), par l'utilisation d'une deuxième stratégie de chémoprotéomique faisant appel au marquage de réactivité (*Activity-Based Protein Profiling ABPP*).

Le présent manuscrit qui décrit les travaux de recherche menés dans ce sens s'articule en quatre chapitres :

- **Le chapitre I**, présente l'état de l'art des connaissances sur : la pollution environnementale, les CPE, les esters de phtalate, le poisson zèbre et les approches de protéomique ciblée (AfBPP et ABPP) ;
- **Le chapitre II**, fait la description du matériel et des méthodes utilisées pour chacune des deux approches de protéomique ciblée ;
- **Les chapitre III et IV**, exposent les résultats et discussions en fonction des deux approches utilisées ;

Le bilan de ces travaux de recherche au travers d'une conclusion générale suivi des perspectives d'études viennent clôturer ce manuscrit de thèse.

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

I.1. Pollution environnementale

I.1.1. Généralités

La pollution environnementale se traduit généralement par l'altération et/ou la dégradation d'un milieu naturel par des polluants anthropiques. Ces polluants anthropiques ont la capacité d'affecter et de modifier de manière durable la santé humaine ainsi que la qualité des écosystèmes et de la biodiversité aquatique ou terrestre même à de faibles concentrations. Ils ont des sources diverses, ils peuvent être libérés de façon accidentelle (marées, accidents industriels etc.) ou provenir des différentes activités humaines telles que les activités agricoles, industrielles et urbaines (figure 1). Les effluents d'assainissement constituent l'une des principales voies d'entrée des polluants dans l'environnement.

Les conséquences engendrées par les polluants sont multiples et peuvent présenter un effet cumulatif (figure 1) : détérioration de la qualité du sol, de l'eau et de l'air, destruction des habitats naturels, extinction des espèces animales ou végétales.

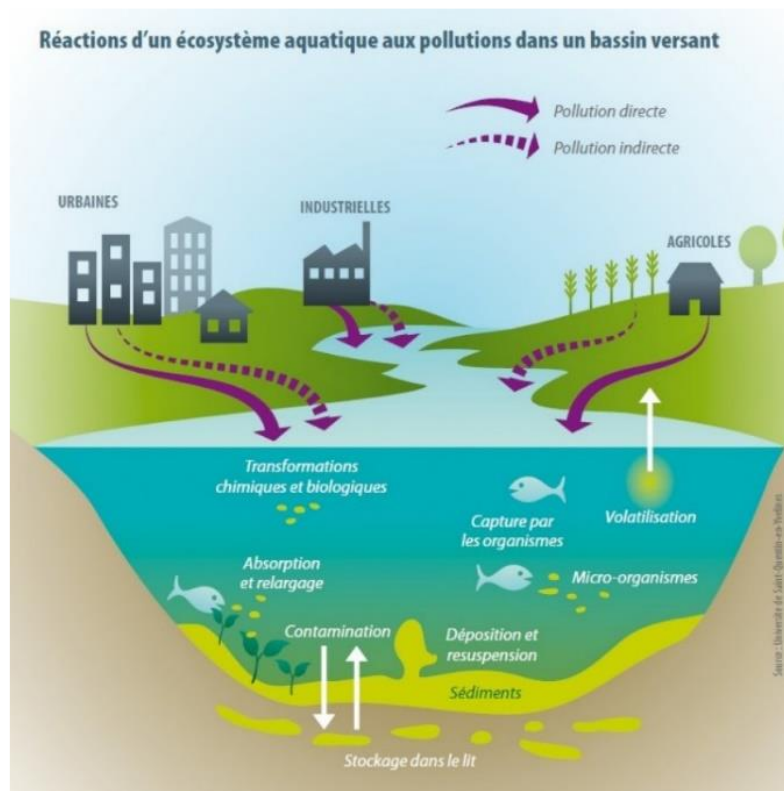


Figure 1 : Illustration schématique des réactions d'un écosystème aquatique aux pollutions dans un bassin versant. (Source : <http://www.osi-perception.org/La-pollution-de-l-eau-un-fleau-invisible.html#navbartop>)

Dans une perspective de développement durable, la directive-cadre sur l'eau (DCE) définissant un cadre cohérent en matière de gestion et de protection des eaux par grand bassin hydrographique au plan européen a été adoptée en 2000 puis implémentée dans les différents pays de l'UE.

De manière globale, la DCE impose :

- Une évaluation de l'état écologique des masses d'eau de surface au moins tous les six ans à partir d'éléments de qualité biologique (faune, flore), de paramètres physico-chimiques (nitrates, température, oxygène, polluants spécifiques, etc.) et d'éléments hydromorphologiques.
- Une évaluation de l'état chimique des masses d'eaux de surface et souterraines au moins tous les six ans à partir d'une liste de substances définie au niveau européen, qui peut également être complétée par toute substance jugée pertinente par l'État membre.

Quarante-cinq substances dangereuses sont définies au niveau européen pour l'évaluation de l'état chimique des masses d'eau de surface. Ces substances appartiennent à différentes familles de molécules comprenant les métaux lourds (plomb, mercure et cadmium et leurs composés), les pesticides (alachlore, atrazine, diuron etc.) les phtalates (Di(2-ethylhexyle) phthalate, DEHP par exemple), les hydrocarbures aromatiques polycycliques (par exemple, les HAP ; fluoranthène, naphthalène), les alkylphénols « nonylphénol, octylphénol » etc. Parmi ces substances, on compte vingt-et-une substances dangereuses prioritaires (ce qui représente ~47% du total des substances dangereuses) et plus d'une dizaine de composées perturbateurs endocriniens.

Quel bilan peut-on faire de la mise en application de cette directive en ce qui concerne les eaux de surface et souterraines en France ?

I.1.2. Etat des eaux de surface et souterraines en France

Le dernier rapport DCE en France concerne les données de 2015. Globalement on note une amélioration du niveau d'état écologique et chimique des masses d'eau de surface et souterraine par rapport au cycle 2009. En France 62,9% des masses d'eau de surface ont été évaluées en bon état chimique en 2015, ce qui représente une augmentation de 19,8 % par rapport à 2009 (figure 2). Deux raisons majeures expliquent cette évolution. La première raison est liée à la diminution du pourcentage d'état inconnu qui traduit les efforts menés en termes d'évaluation de l'état chimique des masses d'eau de surface. La deuxième raison est quant à elle liée à l'application des mesures d'amélioration de l'état des masses d'eau telles que la réhabilitation

de stations d'épuration, l'interdiction de substances et les actions de sensibilisation (Eau et milieux aquatiques, Les chiffres clés Édition 2020).

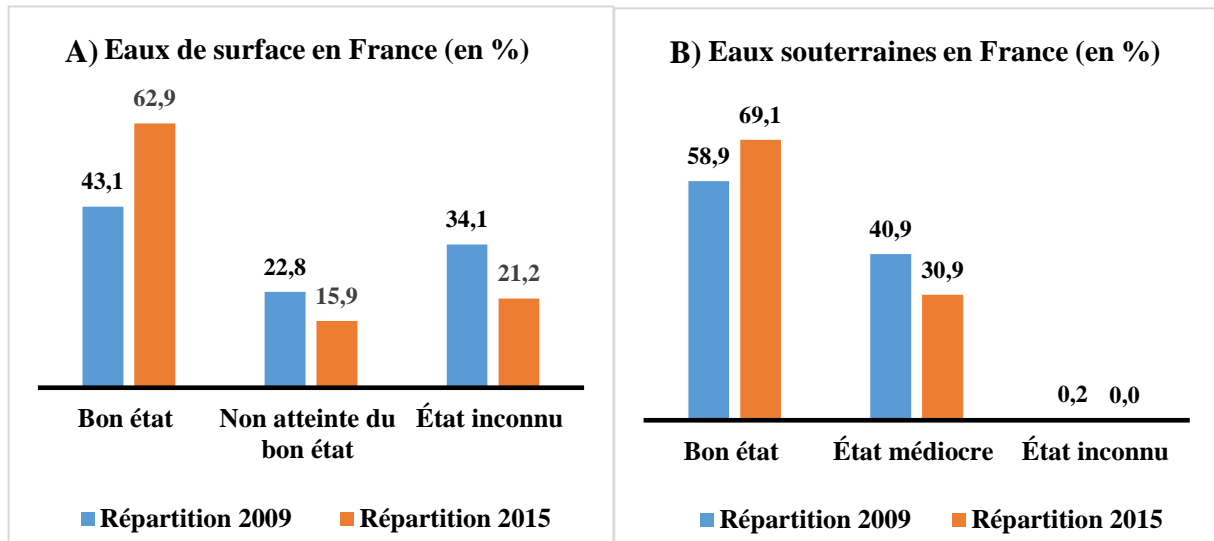


Figure 2 : Évolution de l'état chimique des masses d'eau de surface et souterraines en France. A « eaux de surface », B « eaux souterraines ».

(Sources : agences de l'eau, offices de l'eau, Deal (DOM), OFB, rapports DCE 2010 et 2016, à partir des données de 2009 et 2015. Traitements : OFB, 2018).

En ce qui concerne les eaux souterraines, la croissance du bon état chimique est de 10,2% entre 2009 et 2015 (figure 2). En 2015, 73% des masses d'eau en mauvais état chimique sont déclassées du fait des pesticides et 59% du fait des nitrates. Parmi les substances pesticides impliquées, on retrouve certaines d'entre elles déjà interdites d'usages comme l'atrazine ou la simazine. Les temps de dégradation (des substances pesticides), de transferts sol-eau et de renouvellement de certaines masses d'eau parfois assez long peuvent expliquer cette situation. Toutefois cette amélioration constatée entre les deux cycles (2009 et 2015) peut s'expliquer par la mise en place de mesures, telles que l'interdiction de substances dangereuses et le recours à des techniques alternatives pour la protection des cultures.

Contrairement à l'état chimique des masses d'eaux de surface, l'état écologique des masses d'eaux souterraines a quant à lui très peu évolué entre 2009 et 2015. Cette faible évolution observée entre ces deux cycles s'explique en partie par l'amélioration des méthodes d'évaluation plus précises et prenant en compte de nouveaux paramètres rendant ainsi plus difficile l'atteinte du bon état par une masse d'eau (Eau et milieux aquatiques, Les chiffres clés Édition 2020). Les eaux de surface présentant un bon ou très bon état écologique représentent

un pourcentage de 44,3% en 2015, ce qui est légèrement supérieur à la moyenne européenne pour la même période soit 40% (Eau et milieux aquatiques, Les chiffres clés Édition 2020).

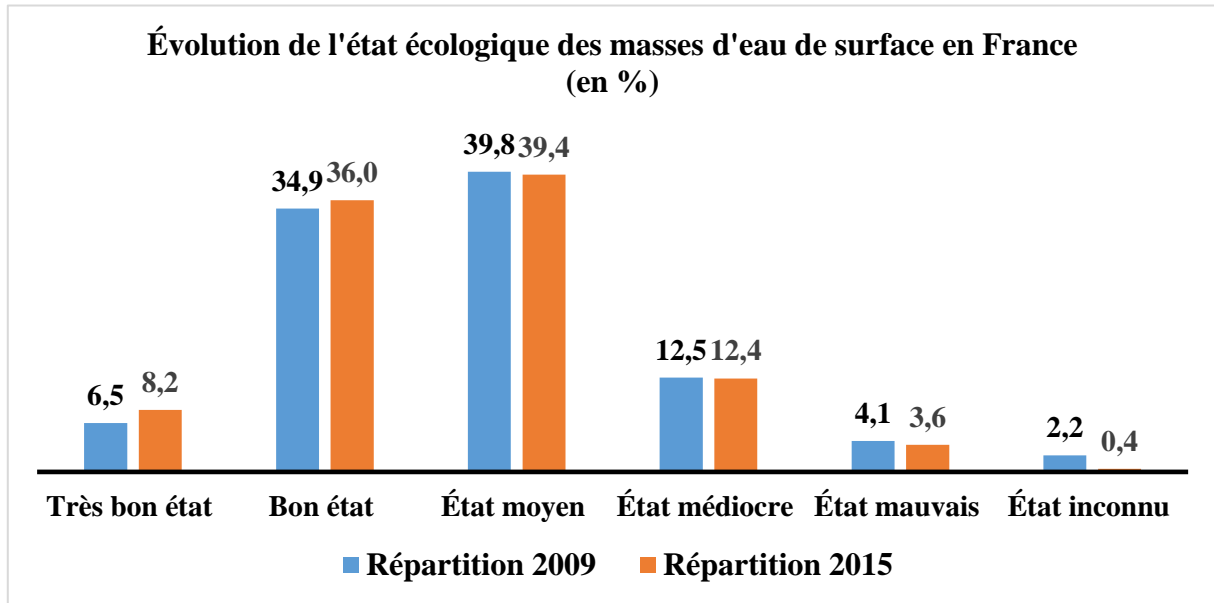


Figure 3 : Évolution de l'état écologique des masses d'eau de surface en France.

(Sources : agences de l'eau, offices de l'eau, Deal (DOM), OFB, reportages DCE 2010 et 2016, à partir des données de 2009 et 2015 pour la France entière. Traitements : OFB, 2018).

I.1.3. Pollution chimique des eaux : les micropolluants impliqués

Trois groupes de polluants sont majoritairement quantifiés dans les cours d'eau français (figure 4): les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP dont benzo[b]fuoranthène, benzo[g,h,i]perylène, indeno[1,2,3-cd]pyrène, benzo[a]pyrène, benzo[k]fuoranthène, fuoranthène, naphtalène...), les métaux-métalloïdes (dont nickel, plomb, cadmium et leurs composés...) et les phtalates (di-n-butyl phtalate ou DBP et di(2-ethylhexyl) phtalate ou DEHP...). Par exemple en 2018, les HAP représentaient deux tiers des résultats quantifiés et les métaux et métalloïdes un tiers. Dans les eaux souterraines, les trois groupes de polluants majoritairement quantifiés en 2018 sont les phénols (bisphénol A et S, 4-tert-butylphénol ou PTBP etc.), les médicaments (carbamazépine, paracétamol, tramadol etc.) et les phtalates (DBP et DEHP) (figure 4). Quarante pourcents de ces micropolluants quantifiés proviennent de produits du quotidien (médicaments, plastifiants, solvants, détergents etc.).

Dans la liste des micropolluants fréquemment quantifiés figurent deux groupes de composés extrêmement préoccupants pour leur caractère de perturbateurs endocriniens selon le règlement n° 1907/2006 du Parlement européen et du Conseil du 18 décembre 2006 concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, ainsi que les restrictions applicables à ces substances (REACH). Il s'agit des composés phénoliques (bisphénols A, S, 4-tert-Butylphénolformaldehyde resin ou PTBP, etc.) et des phtalates (DBP et DEHP) (figure 4). Les phtalates sont présents aussi bien dans les eaux de surface que les eaux souterraines. Le DEHP est d'ailleurs considéré comme une substance dangereuse prioritaire dans l'annexe 11 du guide technique relatif à l'évaluation de l'état des eaux de surface continentale (publié en 2019).

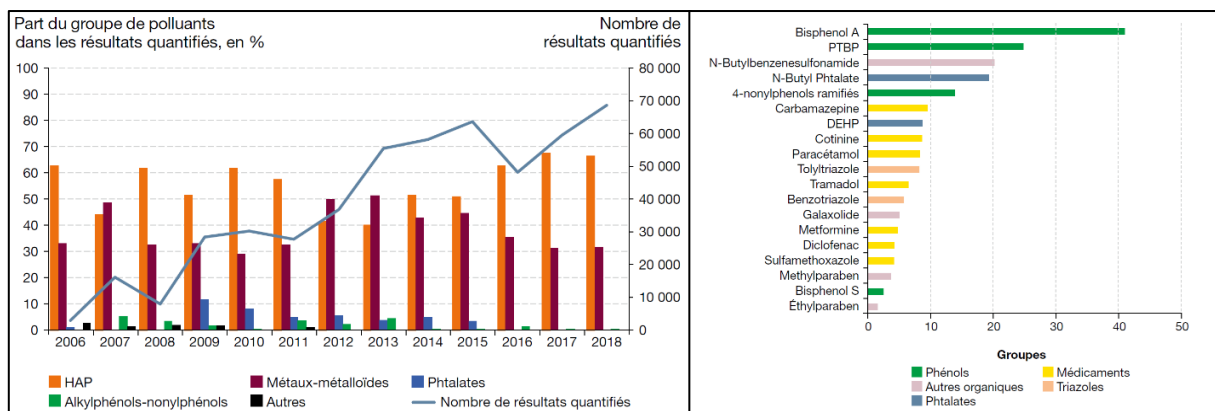


Figure 4 : Évolution du nombre de micropolluants quantifiés dans les cours d'eau en France (à gauche*); classement des micropolluants selon leur taux de présence dans les eaux souterraines, en 2018 (à droite**) (**Source :** *Eaufrance, Naiades (données sur la qualité des eaux de surface) ; **Eaufrance, ADES (données sur la qualité des eaux souterraines). Traitements : SDES, 2020). N-Butyl Phtalate : DBP.

Ce bilan encourageant traduit les efforts menés en matière de gestion et de protection des eaux définis par la DCE. A une échelle beaucoup plus large, les inquiétudes liées à l'identification et au devenir des polluants chimiques dans les milieux aquatiques sont très grandes. En effet, de récentes études de suivi dans de nombreux pays européens ont établi que le risque pour l'environnement aquatique est non seulement présent mais parfois sous-estimé (Ccanccapa et al., 2016; Cruzeiro et al., 2016; Papadakis et al., 2018; Schreiner et al., 2016), cette constatation est encore plus accentuée quand on s'intéresse à d'autres régions du monde tels que l'Asie ou l'Afrique.

La multiplicité des polluants chimiques associée aux données scientifiques insuffisantes complexifie d'avantage l'évaluation des risques pour l'environnement. La DCE n'aborde qu'une facette de la pollution des milieux aquatiques car les potentialités toxiques et

écotoxiques des polluants chimiques n'y sont pas abordées. Les conséquences biologiques des expositions aux polluants chimiques sont encore mal connues et complexes à étudier. C'est particulièrement vrai pour des composés capables d'interagir avec le système hormonal chez les organismes vivant y compris l'Homme. De tels composés sont qualifiés de composés perturbateurs endocriniens (CPE). L'étude des CPE est aujourd'hui considérée comme un enjeu majeur pour les spécialistes de la toxicologie (en ce qui concerne les effets chez l'Homme) et de l'écotoxicologie (pour les organismes environnementaux).

I.2. Les composés perturbateurs endocriniens (CPE)

I.2.1. Définition

Le système endocrinien est un système composé de plusieurs organes, dont chacun secrète des messagers chimiques (hormones) qui diffusent dans tout l'organisme par la circulation sanguine pour interagir avec des cibles spécifiques (récepteurs). Ces interactions entre hormones et récepteurs spécifiques conduisent à la régulation d'un vaste ensemble de fonctions physiologiques, telles que la croissance, le développement, la reproduction, l'équilibre énergétique, le métabolisme et la régulation du poids corporel (Merrill et *al.*, 2020).

Selon le comité scientifique de la toxicité, de l'écotoxicité et de l'environnement (CSTEE, européen), « Un perturbateur endocrinien (PE) est une substance exogène ou un mélange qui altère la (les) fonction (s) du système endocrinien et, par conséquent, provoque des effets néfastes sur la santé d'un organisme intact ou de sa progéniture ou de ses (sous-) populations ». Ces composés perturbateurs endocriniens (CPE) agissent donc comme des agonistes ou des antagonistes des hormones sexuelles stéroïdiennes, des œstrogènes ou des androgènes, ce qui fait du système reproducteur l'un des plus affectés (Wuttke et *al.*, 2010 ; Osvaldo et *al.*, 2013).

I.2.2. Caractéristiques des CPE

Les molécules chimiques capables de perturber l'action des hormones possèdent des caractéristiques identifiables qui sont liées à leur capacité à interagir lors d'étapes clés de régulation des systèmes hormonaux. Une publication récente (Merrill et *al.*, 2020) liste les dix principales caractéristiques clés des perturbateurs endocriniens qui font consensus parmi les experts du domaine (figure 5). Certains CPE répondent à l'ensemble de ces caractéristiques alors que d'autres non. C'est par exemple le cas du bisphénol A (BPA) et du diethylstilbestrol (DES) pour lesquels des preuves substantielles existent pour presque toutes les caractéristiques clés à l'exception de la dégradation ou clairance hormonale pour le BPA et le transport

hormonal pour le DES. Par contre dans le cadre du perchlorate un autre perturbateur endocrinien connu, seule la caractéristique liée à la perturbation de la synthèse hormonale est établie (Merrill *et al.*, 2020). Il y a donc un véritable manque de données pour bien caractériser les molécules connues ou suspectées pour leurs activités de perturbateur endocrinien.

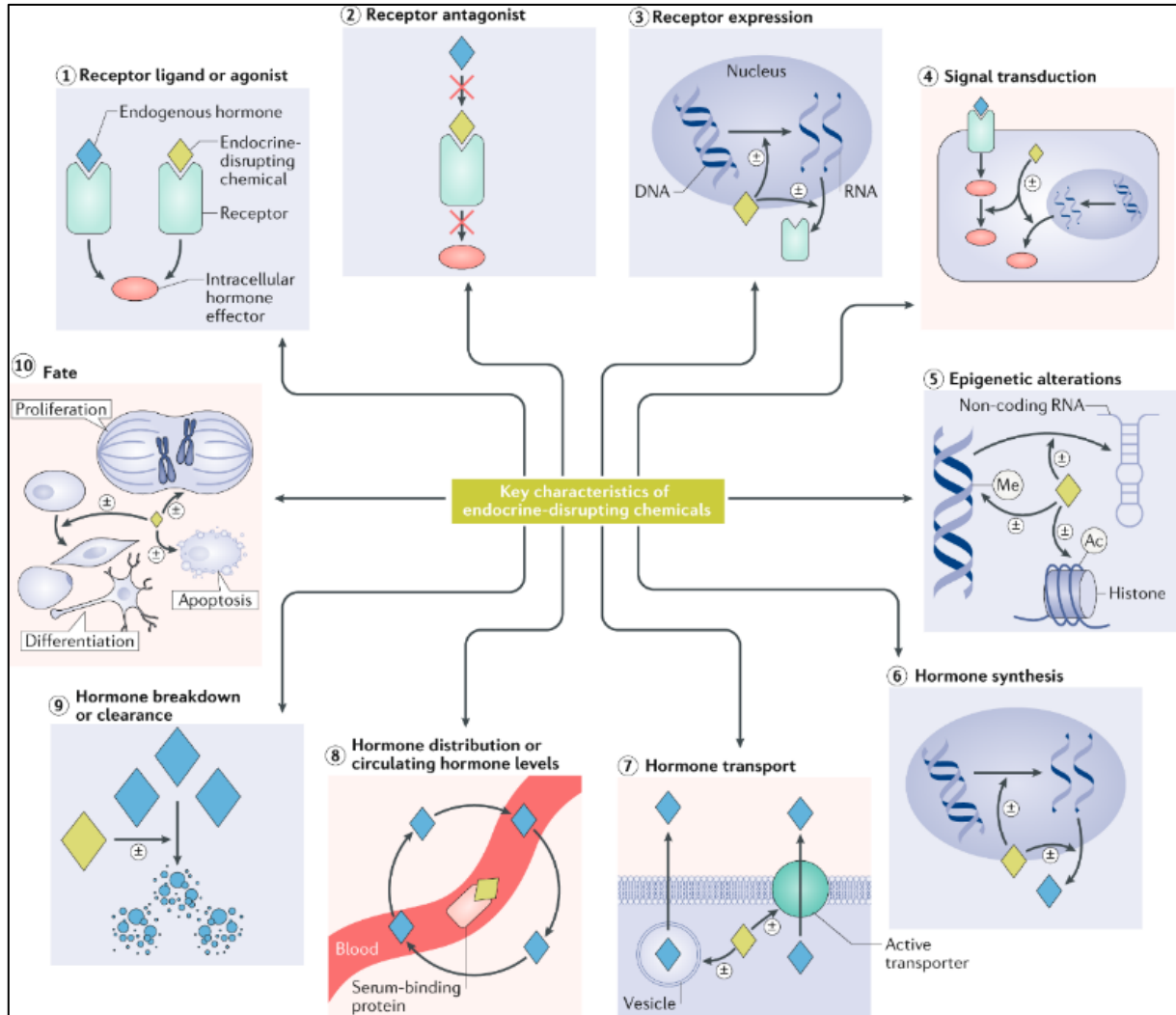


Figure 5 : Les caractéristiques clés des perturbateurs endocriniens. Le symbole \pm indique qu'un CPE peut augmenter (+) ou diminuer (-) les processus et les effets. (Source : La Merrill *et al.*, 2020).

I.2.3. Mécanisme d'action des CPE

La perturbation du fonctionnement normal du système endocrinien par les CPE se fait via les mêmes mécanismes cellulaires que les hormones endogènes. Les voies classiques utilisables par les CPE pour induire des réponses modifiant le fonctionnement de l'organisme sont résumées sur la figure 6. De manière simplifiée, le PE peut déplacer une hormone endogène de son transporteur protéique à l'extérieur de la cellule (on a donc une substitution de l'hormone endogène par le CPE) ou utiliser d'autres voies de passage présentes sur la cellule, par exemple

un passage membranaire, un récepteur hormonal de la membrane, un canal ionique ou un transporteur multidrogue.

- **Passage membranaire** : Le PE peut traverser les membranes cellulaires et nucléaires, se lier à un récepteur nucléaire, formant ainsi un complexe qui peut interagir avec d'autres facteurs de transcription et fournir une réponse hormonale, qui peut aboutir à l'expression d'un gène et l'obtention de la protéine concernée (flèches vertes, figure 6). Le PE peut également traverser les membranes cellulaires et nucléaires, mais se lier à un récepteur orphelin (PXR ou CAR) au lieu du récepteur hormonal nucléaire, influençant l'expression de gènes et aboutissant probablement à une production de protéines (flèches jaunes, figure 6).
- **Récepteur membranaire** : Le PE peut se lier à un récepteur membranaire d'une hormone et causer une cascade de signalisation cellulaire médiée par une protéine kinase, générant ainsi une variété de réponses cellulaires en aval (flèche rouge, figure 6).
- **Canal ionique** : Le PE peut interagir avec un canal ionique, facilitant ainsi le passage d'ions calciques dans la cellule, et provoquer une cascade de signalisation cellulaire médiée par une protéine kinase, induisant de nombreuses réponses cellulaires (flèche violette, figure 6).
- **Transporteur multidrogue** : Le PE peut détourner un transporteur multidrogue, entrer dans la cellule et agir comme décrit pour le passage membranaire (flèches bleues, figure 6).

Les interactions entre le PE et les macromolécules de la cellule peuvent se produire au niveau de toutes ces voies. Il faut néanmoins garder à l'esprit que d'autres mécanismes, non décrits, incluent l'altération des facteurs de transcription (par exemple, coactivateurs et corécepteurs), changent le taux de dégradation des récepteurs nucléaires et de liaison aux récepteurs des neurotransmetteurs ou des transporteurs, aboutissant à l'altération de la signalisation (Amiard and Amiard-Triquet, 2017).

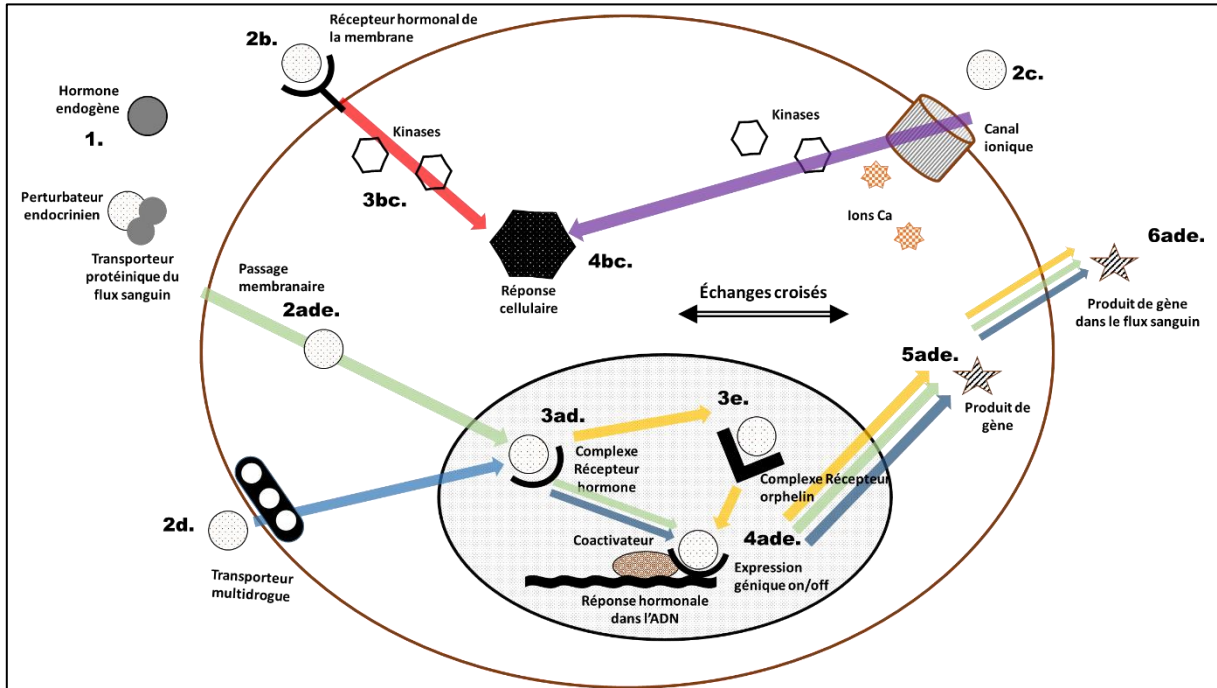


Figure 6 : Vue d'ensemble des mécanismes cellulaires par lesquels les hormones et les CPE agissent (Amiard and Amiard-Triquet, 2017; Brander, 2013).

I.2.4. Propriétés toxicologiques des CPE

Contrairement aux autres types de polluants les CPE ne répondent pas au dogme de Paracelse selon lequel « la dose fait le poison ». Classiquement pour beaucoup de polluants la toxicité augmente en fonction de leurs concentrations (on parle de courbes dose-réponse monotone), et les courbes dose-réponse obtenues sont sigmoïdales (figure 7 a). En revanche pour les CPE, les courbes dose-réponse sont non monotones (figure 7 b et c) c'est-à-dire qu'elles ont des formes en cloche ou en U, ou sont multiphasiques. Cette propriété particulière aux CPE est non seulement due à leur cytotoxicité mais surtout à leurs mécanismes d'action et plus particulièrement la sélectivité du récepteur, la compétition envers le récepteur et les boucles endocrines de rétroaction négatives (Amiard and Amiard-Triquet, 2017).

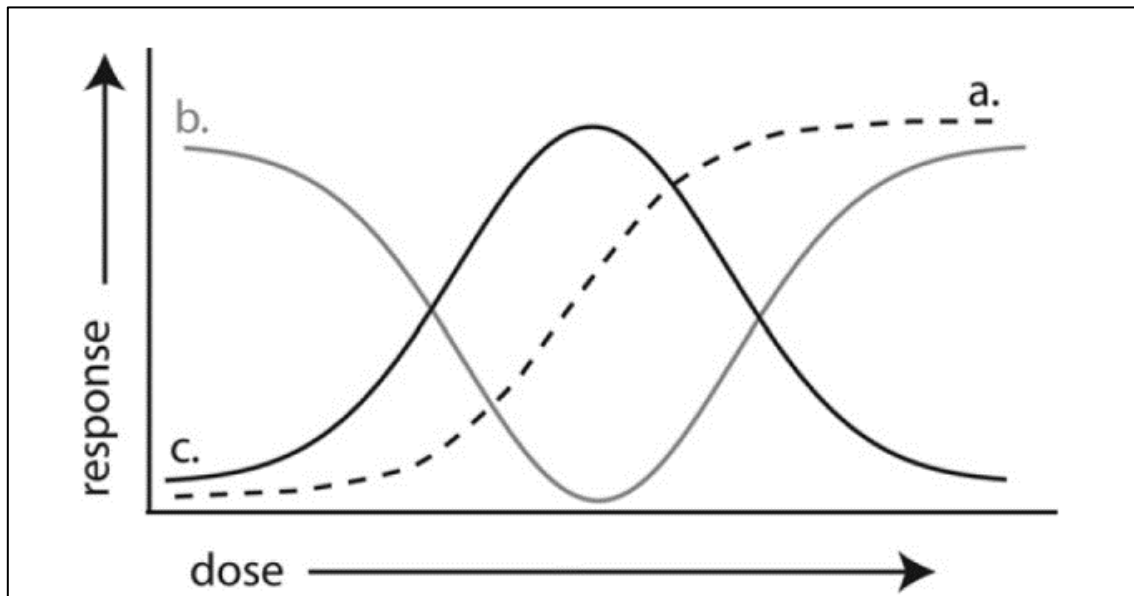


Figure 7 : Représentation graphique des courbes dose-réponse toxicologique des polluants chimiques. a) courbe dose-réponse sigmoïdale (courbe monotone). b) courbe dose-réponse biphasique ou c) courbes dose-réponse unimodale, ces deux dernières étant typiques des perturbateurs endocriniens (**Source :** Brander, 2013).

Au dogme de Paracelse peut s'ajouter deux autres hypothèses toxicologiques auxquelles les CPE ne répondent pas, à savoir l'uniformité des effets et l'existence d'un effet seuil (Caliman and Gavrilescu, 2009). L'uniformité des effets suppose qu'un produit chimique ne peut pas avoir des effets opposés bien qu'il puisse avoir des effets multiples. Or certains CPE peuvent avoir des effets opposés, c'est par exemple le cas de la dioxine qui a des effets semblables aux œstrogènes dans les organismes fœtaux mais un effet anti-œstrogène chez les adultes (Caliman and Gavrilescu, 2009). L'existence d'un effet seuil suppose que si une faible exposition conduit à une diminution des risques pour la santé, à un dosage très faible, l'effet sur la santé devient infiniment petit ou effectivement nul. Les hormones étant connues pour leurs actions à très faibles doses, les CPE peuvent aussi exercer leurs effets néfastes à de très faibles doses dans les milieux expérimentaux ou dans la nature (Amiard and Amiard-Triquet, 2017). Comme on peut le voir sur la figure 7 (b et c), à faible dose les effets toxicologiques sont élevés (forte induction) et faibles à fortes doses (inhibition). Ceci est particulièrement évident avec des réponses médiées par des récepteurs qui peuvent saturer en fonction de la concentration (Brander, 2013).

I.2.5. Molécules concernées par la perturbation endocrinienne

Les CPE regroupent plusieurs familles de composés telles que les pesticides et herbicides, les plastifiants et plastiques, les retardateurs de flammes, les dioxines et composés apparentés, les hormones naturelles et stéroïdes, ou les alkylphénols etc. En 2017, le nombre total de composés suspectés d'avoir des interactions avec le système endocrinien était estimé approximativement à 38000. Toutefois, plus de 80000 composés chimiques requéraient des analyses pour confirmer ou infirmer leurs actions perturbatrices de type CPE (Gmurek *et al.* 2017).

Le nombre de composés testés et reconnus pour leurs effets perturbateurs endocriniens évolue au fil des années. Par exemple dans une revue publiée en 2012 par Vandenberg *et al.*, vingt-neuf substances sont rapportées pour leurs effets à faibles doses sur le système endocrinien animal (ou humain) alors que Gmurek *et al.* (2017) relèvent cinquante-six substances. Les données rapportées peuvent donc varier en fonction des auteurs et des années. Néanmoins il existe des substances qui font consensus et qui sont très souvent étudiées comme le bisphénol A, les phtalates ou certains HAP. Très peu de CPE sont inclus dans les réglementations pour l'évaluation des risques environnementaux malgré la multiplicité des CPE avérés. Par exemple quand on se réfère au règlement REACH concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, ainsi que les restrictions applicables à ces substances, 16 composés chimiques figurent sur la liste des substances extrêmement préoccupantes en raison de leurs propriétés de perturbation endocrinienne (tableau 1). On retrouve dans cette liste des composés tels que les phtalates, le bisphénol A, 4-tert-butylphénol etc. qui sont tous caractérisés par leur utilisation dans la fabrication des produits plastiques

La pollution liée aux matières plastiques se démarque tout particulièrement des autres types de polluants environnementaux quand l'on considère les sources d'exposition aux CPE. Plus de 9,2 milliards de tonnes de plastiques ont été produites entre 1950 et 2017, ce qui représente plus d'une tonne par personne vivant actuellement sur la planète. La production mondiale annuelle tourne autour de 400 millions de tonnes et les prévisions sont de 600 millions de tonnes pour 2025 (Fuhr and Franklin, 2020). Le plastique présente de nombreux risques pour la santé humaine et environnementale. Ces risques proviennent du fait que toute sorte de produits chimiques sont ajoutés à la matière plastique elle-même (phtalates, le bisphénol A, 4-tert-butylphénol) pour lui donner des propriétés souhaitées, mais sont dangereux pour la santé et s'accumulent dans l'air, dans l'eau et dans le sol.

Tableau I : Liste des CPE légalement reconnus dans l'UE. (Correspond aux substances ajoutées à la liste REACH des substances extrêmement préoccupantes en raison de leurs propriétés de perturbation endocrinienne, consultée le 10/05/21).

N°	Acronyme et nom de la substance	N° CAS	Motif de l'inclusion	Date d'inclusion
1	Butyl 4-hydroxybenzoate	94-26-8	Propriétés de perturbation endocrinienne (article 57(f)** - santé humaine)	25/06/2020
2	Phosphite de tris (4-nonylphényle, ramifié et linéaire) (TNPP)	-	Propriétés de perturbation endocrinienne (article 57(f)** - environnement)	16/07/2019
3	4-tert-butylphénol	98-54-4	Propriétés de perturbation endocrinienne (article 57(f)** - environnement)	16/07/2019
4	1,7,7-triméthyl-3-(phénylméthylène) bicyclo [2.2.1] heptan-2-one ; 3-benzylidène-Camphor ; 3-BC	15087-24-8	Propriétés de perturbation endocrinienne (article 57(f)** - environnement)	15/01/2019
5	Dicyclohexyl phthalate (DCHP)	84-61-7	- Toxique pour la reproduction (article 57 (c)*) - Propriétés de perturbation endocrinienne (article 57(f)** - santé humaine)	27/06/2018
6	Produits de réaction de 1,3,4-thiadiazolidine-2,5-dithione, formaldéhyde et 4-heptylphénol, ramifiés et linéaires (RP-HP)	-	Propriétés de perturbation endocrinienne (article 57(f)** - environnement)	15/01/2018
7	p- (1,1-diméthylpropyl) phénol (PTAP)	80-46-6	Propriétés de perturbation endocrinienne (article 57, (f)** - environnement)	12/01/2017
8	4-heptylphénol, ramifié et linéaire (4-HP)	-	Propriétés de perturbation endocrinienne (article 57(f)** - environnement)	12/01/2017
9	4,4'-isopropylidènediphénol; Bisphénol A; (BPA)	80-05-7	- Toxique pour la reproduction (article 57 (c)*) - Propriétés de perturbation endocrinienne (article 57(f)** - environnement) - Propriétés de perturbation endocrinienne (article 57(f)** - santé humaine)	12/01/2017
10	4-nonylphénol, ramifié et linéaire, éthoxylé	-	Propriétés de perturbation endocrinienne (article 57(f)** - environnement)	20/06/2013

Suite tableau I

N°	Acronyme et nom de la substance	N°CAS	Motif de l'inclusion	Date d'inclusion
11	4- (1,1,3,3-tétraméthylbutyl) phénol, éthoxylé	-	Propriétés de perturbation endocrinienne (article 57(f)** - environnement)	19/12/2012
12	4- (1,1,3,3-tétraméthylbutyl) phénol	140-66-9	Propriétés de perturbation endocrinienne (article 57(f)** - environnement)	19/12/2011
13	Diisobutyl phthalate (DIBP)	84-69-5	- Toxique pour la reproduction (article 57 (c)*) - Propriétés de perturbation endocrinienne (article 57(f)** - santé humaine)	13/01/2010
14	Benzyl butyl phthalate (BBP)	85-68-7	- Toxique pour la reproduction (article 57 (c)*) - Propriétés de perturbation endocrinienne (article 57(f)** - santé humaine)	28/10/2008
15	Dibutyl phthalate (DBP)	84-74-2	- Toxique pour la reproduction (article 57 (c)*) - Propriétés de perturbation endocrinienne (article 57(f)** - santé humaine)	28/10/2008
16	Phtalate de bis(2-éthylhexyle) (DEHP)	117-81-7	- Toxique pour la reproduction (article 57 (c)*) - Propriétés de perturbation endocrinienne (article 57(f)** - environnement) - Propriétés de perturbation endocrinienne (article 57(f)** - santé humaine)	28/10/2008

<https://echa.europa.eu/candidate-list-table>

**Articles 57 (c) substances répondant aux critères de classification comme substances toxiques pour la reproduction, de catégorie 1A ou 1B, ayant des effets néfastes sur la fonction sexuelle et la fertilité ou sur le développement, conformément à l'annexe I, section 3.7, du règlement (CE) n°1272/2008 ;*

***Articles 57 (f) les substances, - telles que celles possédant des propriétés perturbant le système endocrinien ou celles possédant des propriétés persistantes, bioaccumulables et toxiques ou très persistantes et très bioaccumulables, qui ne remplissent pas les critères visés aux points d) ou e) - pour lesquelles il est scientifiquement prouvé qu'elles peuvent avoir des effets graves sur la santé humaine ou l'environnement qui suscitent un niveau de préoccupation équivalent à celui suscité par l'utilisation d'autres substances énumérées aux points a) à e) et qui sont identifiées, au cas par cas, conformément à la procédure prévue à [l'article 59](#).*

I.3. Les esters de phtalate

I.3.1. Présentation et origine

Les esters de phtalate (plus communément appelés phtalates), constituent une famille diversifiée de composés synthétiques industriels, très répandus, à cause de leurs usages comme plastifiants. Leur faible point de fusion et leur point d'ébullition élevé les rendent également très utiles comme fluides caloporteurs et supports. Ils entrent dans la composition de plusieurs produits plastiques (figure 8) tels que les emballages plastiques, les jouets, les produits cosmétiques, les joints, les systèmes de toiture en plastique, ainsi que les matériaux de décoration de meubles (Shea, 2003 ; Horn *et al.*, 2004 ; Katsikantami *et al.*, 2016). Dans certains plastiques, les phtalates représentent jusqu'à 50% du poids total (Peijnenburg, 2008). Net *et al.*, (2015) ont estimé à 150 millions de tonnes la quantité de produits plastiques consommée à travers le monde, et d'après Wittassek *et al.*, (2011) la production globale annuelle d'esters de phtalate avoisinerait les 8 millions de tonnes.

Les esters de phtalate ne sont pas liés par covalence aux polymères et sont donc capables de migrer à la surface de la matrice polymère. De ce fait, ils peuvent se détacher des matrices de polymères par une variété de processus physiques, bien que diverses forces d'attraction maintiennent les esters étroitement dans la matrice vinylique, de sorte que la migration se produit à un faible taux (Peijnenburg, 2008). Par cette capacité de détachement des matrices de polymères, les phtalates se retrouvent libres dans divers compartiments environnementaux (l'air, l'eau et les sédiments).

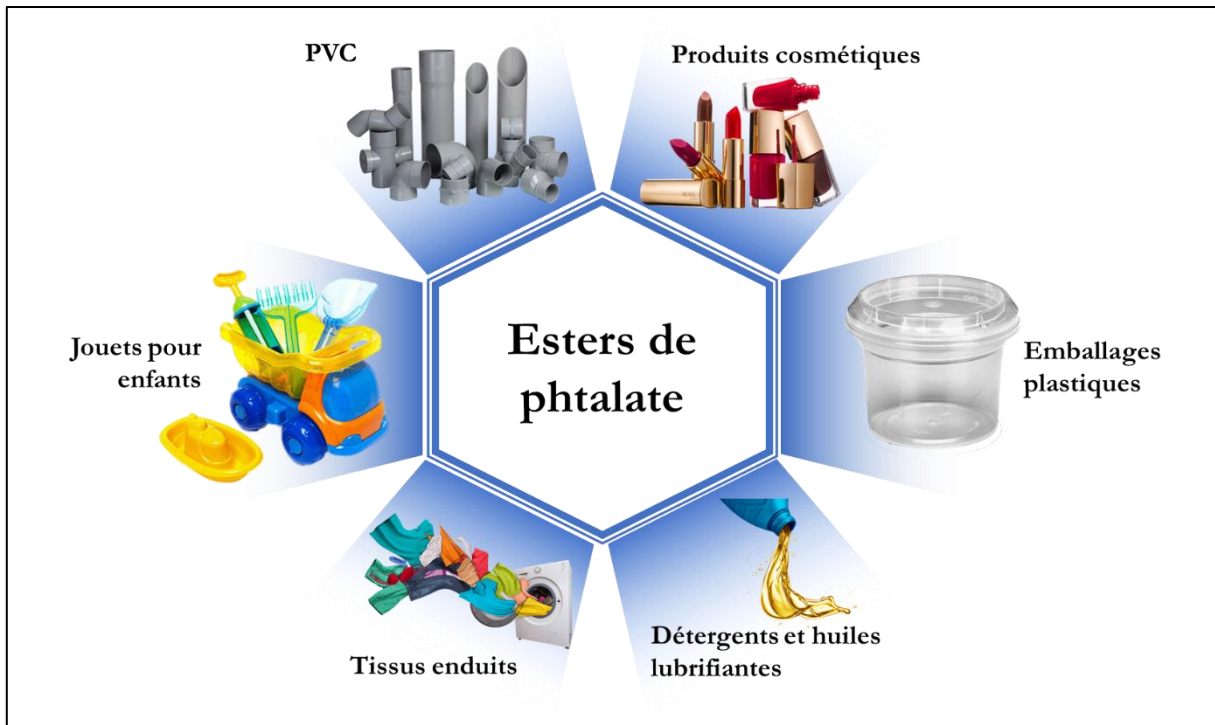


Figure 8 : Illustration des produits contenant des esters de phtalate.

I.3.2. Synthèse et structure des phtalates

Les phtalates constituent un ensemble de diesters de l'acide 1,2-benzène dicarboxylique (acide o-phtalique). Leur structure générale est présentée sur le schéma 1. Leur structure chimique se compose d'un cycle benzène et de deux groupes fonctionnels esters liés au cycle par deux atomes de carbone consécutifs (schéma 1). Ils sont produits par l'addition d'un excès d'alcools ramifiés ou linéaires à l'anhydride phtalique en présence d'un catalyseur (Peijnenburg, 2008). Les alcools utilisés varient du méthanol et de l'éthanol au tridécanol (C13).

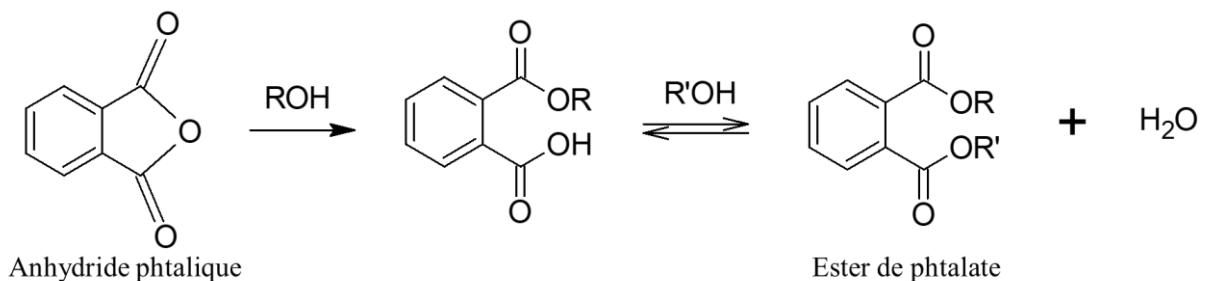


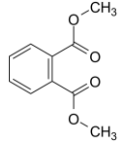
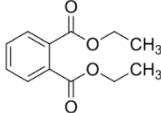
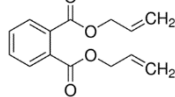
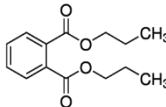
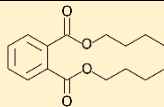
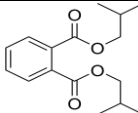
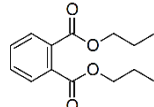
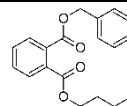
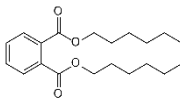
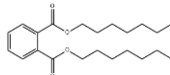
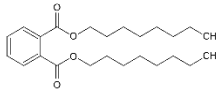
Schéma 1 : Réaction entre l'anhydride phtalique et l'alcool (ROH) permettant de synthétiser un ester de phtalate (R et R' représentent les chaînes latérales alkyle) (Lorz et *al.*, 2012).

Les esters de phtalate sont classés en deux groupes distincts suivant la longueur de leur chaîne carbonée. Les phtalates de haut poids moléculaire sont caractérisés par une chaîne carbonée de 7 à 13 atomes de carbone, tandis que les phtalates à faible poids moléculaire présentent 3 à 6 atomes de carbone dans leur squelette. Le di-isodecylphtalate (DiDP), le di-isononylphtalate (DiNP), le di-2-éthylhexylphtalate (DEHP), le di-propylheptylphtalate (DPHP), le di-isoundécylphtalate (DiUP) et le di-isotridécylphtalate (DTDP) font partie des phtalates de haut poids moléculaire largement utilisés dans l'industrie (ECPI, 2017 ; Katsikantami *et al.*, 2016). On retrouve le dibutylphtalate (DBP), le di-isobutylphtalate (DiBP), le butylbenzylphtalate (BBzP), parmi les phtalates de faible poids moléculaire. Il convient de souligner que le diméthylphtalate (DMP) et le di-éthylphtalate (DEP), contenant respectivement un et deux atomes de carbones sur leur chaîne hydrocarbonée ne sont classés dans aucun groupe car ils ne sont pas utilisés comme plastifiants. Ils sont utilisés comme solvants et fixateurs dans les parfums et en tant qu'additifs dans les cosmétiques, les dispositifs médicaux, les produits d'entretien ménager et personnel (Katsikantami *et al.*, 2016).

Les deux types d'esters de phtalate, linéaires et ramifiés sont utilisés dans la fabrication des plastiques. Les esters de phtalate linéaires offrent en particulier une flexibilité supérieure à basses températures et ont également une volatilité plus faible. Les esters de phtalate de faibles poids moléculaires ne sont pas souvent utilisés comme plastifiant en raison de problèmes de volatilité. Les esters de phtalate de hauts poids moléculaires sont les plastifiants vinyliques dominants, avec parmi eux le DEHP et le DiNP prédominants (Peijnenburg, 2008).

Le tableau II présente les 22 esters de phtalate ayant une importance commerciale (Autian, 1973 ; Cousins et Mackay, 2000).

Tableau II : les esters de phtalate d'importance commerciale

Abréviation	Ester de phtalate	Numéro CAS	Formule chimique	Structure	Masse moléculaire (g mol ⁻¹)
DMP	Dimethyl Phtalate	131-11-3	C ₁₀ H ₁₀ O ₄		194,2
DEP	Diethyl Phtalate	84-66-2	C ₁₂ H ₁₄ O ₄		222,2
DAP	Diallyl Phtalate	131-17-9	C ₁₄ H ₁₄ O ₄		246,2
DPP	Dipropyl Phtalate	131-16-8	C ₁₄ H ₁₈ O ₄		250,3
DBP*	Di-n-Butyl Phtalate	84-74-2	C ₁₆ H ₂₂ O ₄		278,4
DIBP	Diisobutyl Phtalate	84-69-5	C ₁₆ H ₂₂ O ₄		278,4
DnPP	Di-n-propyl phtalate	131-16-8	C ₁₄ H ₁₈ O ₄		250,3
BBP	Butylbenzyl Phtalate	85-68-7	C ₁₉ H ₂₀ O ₄		312,4
DHP	Dihexyl Phtalate	84-75-3; 68515-50-4	C ₂₀ H ₃₀ O ₄		334,4
DIHpP	Di-n-heptyl phtalate	3648-21-3 ; 68515-44-6	C ₂₂ H ₃₄ O ₄		362,5
DnOP	Di-n-Octyl Phtalate	117-84-0	C ₂₄ H ₃₈ O ₄		390,6

*indique l'ester de phtalate modèle utilisé dans le cadre de cette thèse

Suite tableau II

Abréviation	Ester de phtalate	Numéro CAS	Formule chimique	Structure	Masse moléculaire (g mol ⁻¹)
BOP	Butyl 2-Ethylhexyl Phtalate	85-69-8	C ₂₀ H ₃₀ O ₄		334,4 (278,4 - 390,6)
610P	Di (n-Hexyl, n-Octyl, n-Decyl) Phtalate	25724-58-7; 68515-5 I-5	C ₂₅ H ₄₀ O ₄		404,6 (334 - 447)
DEHP	Di (2-Ethylhexyl) Phtalate	117-81-7	C ₂₄ H ₃₈ O ₄		390,6
DIOP	Diisooctyl Phtalate	27554-26-3	C ₂₄ H ₃₈ O ₄		390,6 (376,6 - 390,6)
DnNP	Di-n-nonyl phtalate	84-76-4 ; 68648-92-0 ; 68515-45-7	C ₂₆ H ₄₂ O ₄		418,6
DINP	Diisononyl Phtalate	28553-12-0; 68515-48-0	C ₂₆ H ₄₂ O ₄		418,6 (418,6 - 432,6)
DnDP	Di-n-decyl phtalate	84-77-5	C ₂₈ H ₄₆ O ₄		446,7
DIDP	Diisodecyl Phtalate	26761-40-0; 68515-49-1	C ₂₈ H ₄₆ O ₄		446,7 (432,7 - 446,7)
D711P	Di (Heptyl, Nonyl, Undecyl) Phtalate	3648-20-2; 68515-44-6 ; 68515-45-7; 111381-89-6 ; 111381-90-9; 111381-91-0	C ₂₆ H ₄₂ O ₄		418,6 (362,6 - 474,7)
DUP	Diundecyl Phtalate	3648-20-2	C ₃₀ H ₅₀ O ₄		447,7 (432,7 - 474,7)
DTDP	Ditridecyl Phtalate	119-06-2; 68515-47-9	C ₃₄ H ₅₈ O ₄		530,8 (506,8 - 544,8)

I.3.3. Propriétés physico-chimiques

La connaissance des propriétés physico-chimiques des esters de phtalate est un facteur important pour comprendre leurs comportements et leur devenir dans l'environnement (Staples *et al.*, 1997), mais c'est surtout un facteur clé dans la mise au point des essais de monitoring. De manière générale, la plupart des esters de phtalate sont des liquides incolores, faiblement volatiles, très peu solubles dans l'eau mais solubles dans des solvants organiques et les huiles. Comme précisé précédemment, les esters de phtalate sont classiquement divisés en deux groupes selon la longueur de leurs chaînes carbonées. L'observation des propriétés physico-chimiques (tableau 3) publiées par Cousins et Mackay (2000), montre une corrélation entre la solubilité des phtalates et leurs masses moléculaires:

- Les phtalates de hauts poids moléculaires sont moins solubles en milieu aqueux que ceux de faibles poids moléculaires. Ainsi les coefficients de partage Octanol –Eau (K_{OW}) augmentent (i.e., augmentation de l'hydrophobie) avec la longueur de la chaîne. Cette faible solubilité dans l'eau (C_{WL}^S) des phtalates de haut poids moléculaire peut rendre la faisabilité des expériences de bioconcentration discutable, en particulier parce que les valeurs élevées de K_{OW} associées suggèrent une forte hydrophobie et probablement une forte sorption sur les matières organiques et les surfaces (Cousins et Mackay, 2000). Selon Staples *et al.*, (1997) le potentiel de bioaccumulation chez les poissons par exemple est atténué par le métabolisme relativement rapide de ces composés.
- Les phtalates de faibles poids moléculaires sont assez volatiles, mais ont des valeurs de K_{AW} (coefficient de partage air-eau) très faibles, donc ils se volatilisent assez rapidement à l'état pur mais très lentement quand ils sont en solution aqueuse.
- Les valeurs élevées de K_{OA} (coefficient de partage octanol-air) suggèrent quant à elles que tout ester de phtalate de haut poids moléculaire présent dans l'atmosphère sera sensiblement absorbé par les particules d'aérosol ainsi que par le sol et la végétation.
- Quant au coefficient de partage air-eau (K_{AW}), il augmente avec le poids moléculaire, ce qui suggère que les phtalates de poids moléculaire plus élevé peuvent potentiellement s'évaporer plus rapidement de l'eau, mais cela sera atténué par la sorption aux matières en suspension dans la colonne d'eau.

Tableau III: Propriétés physico-chimiques des phtalates à 25°C (Cousins et Mackay, 2000).

Abréviation	C_{WL}^S (mg l ⁻¹)	V _P (Pa)	Log K _{OW}	Log K _{OA}	Log K _{AW}	H (Pa m ³ mol ⁻¹)
DMP	5220	0,263	1,61	7,01	-5,40	9,78 x 10 ⁻³
DEP	591	6,48 x 10 ⁻²	2,54	7,55	-5,01	2,44 x 10 ⁻²
DAP	156	2,71 x 10 ⁻²	3,11	7,87	-4,76	4,28 x 10 ⁻²
DPP	77	1,75 x 10 ⁻²	3,40	8,04	-4,64	5,69 x 10 ⁻²
DBP*	9,9	4,73 x 10 ⁻³	4,27	8,54	-4,27	0,133
DIBP	9,9	4,73 x 10 ⁻³	4,27	8,54	-4,27	0,133
DnPP	1,3	1,28 x 10 ⁻³	5,12	9,03	-3,91	0,302
BBP	3,8	2,49 x 10 ⁻³	4,70	8,78	-4,08	0,205
DHP	0,159	3,45 x 10 ⁻⁴	6,00	9,53	-3,53	0,726
DIH _p P	2,00 x 10 ⁻²	9,33 x 10 ⁻⁵	6,87	10,04	-3,17	1,69
DnOP	2,49 x 10 ⁻³	2,52 x 10 ⁻⁵	7,73	10,53	-2,80	3,95
BOP	0,385	5,37 x 10 ⁻⁴	5,64	9,37	-3,73	0,466
610P	8,76 x 10 ⁻⁴	1,31 x 10 ⁻⁵	8,17	10,78	-2,61	6,05
DEHP	2,49 x 10 ⁻³	2,52 x 10 ⁻⁵	7,73	10,53	-2,80	3,95
DIOP	2,49 x 10 ⁻³	2,52 x 10 ⁻⁵	7,73	10,53	-2,80	3,95
DnNP	3,08 x 10 ⁻⁴	6,81 x 10 ⁻⁶	8,60	11,03	-2,43	9,26
DINP	3,08 x 10 ⁻⁴	6,81 x 10 ⁻⁶	8,60	11,03	-2,43	9,26
DnDP	3,81 x 10 ⁻⁵	1,84 x 10 ⁻⁶	9,46	11,52	-2,06	21,6
DIDP	3,81 x 10 ⁻⁵	1,84 x 10 ⁻⁶	9,46	11,52	-2,06	21,6
D711P	3,08 x 10 ⁻⁴	6,81 x 10 ⁻⁶	8,60	11,03	-2,43	9,26
DUP	4,41 x 10 ⁻⁶	4,97 x 10 ⁻⁷	10,33	12,02	-1,69	50,5
DTDP	7,00 x 10 ⁻⁸	3,63 x 10 ⁻⁸	12,06	13,01	-0,95	275

K_{OW} : coefficients de partage Octanol –Eau ; K_{OA} : coefficient de partage octanol-air ; K_{AW} : coefficient de partage air-eau ; C_{WL}^S : solubilité aqueuse ; H : Constante de la loi de Henry ; V_p : pression de vapeur. *indique l'ester de phtalate modèle utilisé dans le cadre de cette thèse.

I.3.4. Voies d'entrée et devenir dans l'environnement

I.3.4.1. Voies d'entrée des phtalates dans l'environnement

Les phtalates pénètrent dans l'environnement par des pertes au cours des processus de fabrication via les émissions atmosphériques, les effluents aqueux, les déchets solides et la lixiviation des produits finaux, car ils ne sont pas liés chimiquement à la matrice des polymères (Stanley et al., 2003; Liang et al., 2008; Peijnenburg, 2008). On les retrouve alors dans divers milieux environnementaux, notamment l'air (Wensing et al., 2005; Peijnenburg, 2008), les sols, les sédiments, les lixiviats des décharges et dans les eaux naturelles en raison de leur production, de leur utilisation et de leur migration des matières plastiques (Chao and Cheng 2007, Huang et al., 2013). La majeure partie des phtalates présents dans l'environnement provient de leur

migration des matières plastiques lors de leur utilisation et de leur élimination, également appelée érosion (Stanley *et al.*, 2003 ; Liang *et al.*, 2008, Peijnenburg, 2008). Cette capacité des phtalates à migrer des matières plastiques est inversement liée à leurs poids moléculaires (Peijnenburg, 2008). Du fait de leur liaison non covalente aux matrices de plastiques, les phtalates migrent en particulier dans des conditions d'exposition de surface élevée et de températures élevées. Cela est particulièrement vrai dans le cas des matériaux de constructions extérieurs, où les esters de phtalate peuvent se diffuser dans l'air malgré leurs pressions de vapeur assez faible. Les sources diffuses et ponctuelles contribuent ainsi à leur dispersion, principalement à partir des dépôts atmosphériques humides et secs directs, via les eaux de surface, et par le ruissellement de l'écoulement de surface (Peijnenburg, 2008). Malgré la dégradation bactérienne dans les eaux de surface et la dégradation par photolyse, les phtalates sont détectés dans différents compartiments environnementaux à des concentrations allant de 0,3 à 77 ng.m⁻³ dans l'atmosphère, 0,3 à 98 mg L⁻¹ dans les eaux de surface, 0,2 à 8,4 mg kg⁻¹ de poids sec (PS) dans les sédiments, et de 28 à 154 mg par kg de PS dans les boues d'épuration (Peijnenburg, 2008). En fonction des positions géographiques sur le globe, la contamination par les esters de phtalate varie fortement comme on peut le voir sur la figure 9 avec l'exemple des eaux de surfaces. Les eaux de surfaces (eaux douces et marines) à l'échelle du globe sont fortement contaminées par le DEHP, le DBP, le DEP et le DnOP (figure 9). Même dans les régions les plus éloignées des activités humaines telle que l'arctique, on retrouve de fortes contaminations par le DEHP, l'un des esters de phtalate les plus répandus dans l'environnement (figure 10). Plus inquiétant encore, on retrouve les esters de phtalate dans les eaux de consommation un peu partout dans le monde (figure 10). Par exemple en Europe, on observe une absence des esters de phtalate dans les eaux de consommation en France alors qu'une forte présence de DEHP et de DBP est détectée dans ces eaux en république Tchèque (figure 10). Le Nigéria, Taïwan et l'Inde se démarquent particulièrement par la diversité et les concentrations élevées d'esters de phtalate retrouvées dans les eaux de consommation (figure 10).

Les esters de phtalate représentent un risque pour l'homme mais aussi pour les organismes aquatiques (eaux douces) en particulier. En effet, les niveaux de DBP et de DEHP dissous se trouvent dans les échantillons d'eau douce, alors que ces composés sont généralement présents à des concentrations inférieures à la limite de détection dans l'eau et les sédiments marins (Peijnenburg, 2008).

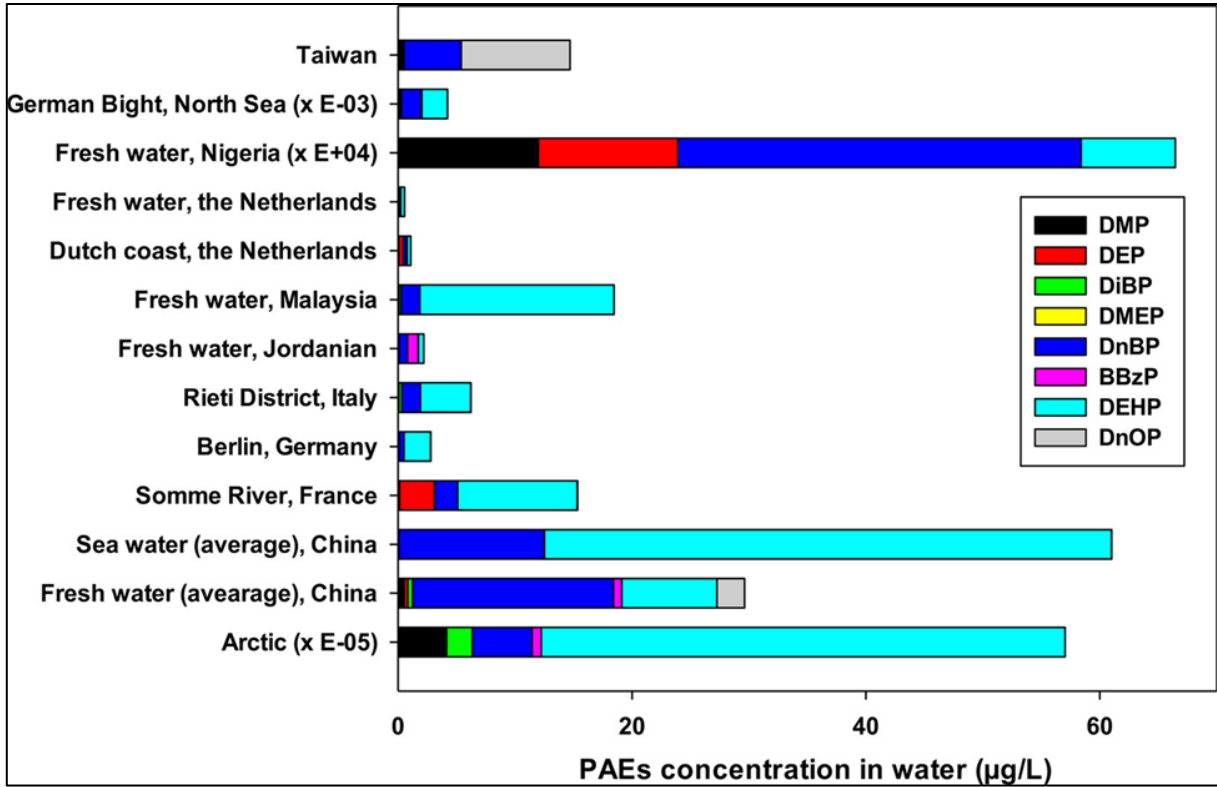


Figure 9 : Composition des esters de phtalate (PAE) dans différents types d'eau douce et marine à l'échelle mondiale (Net et al., 2015). DiBP : DBP

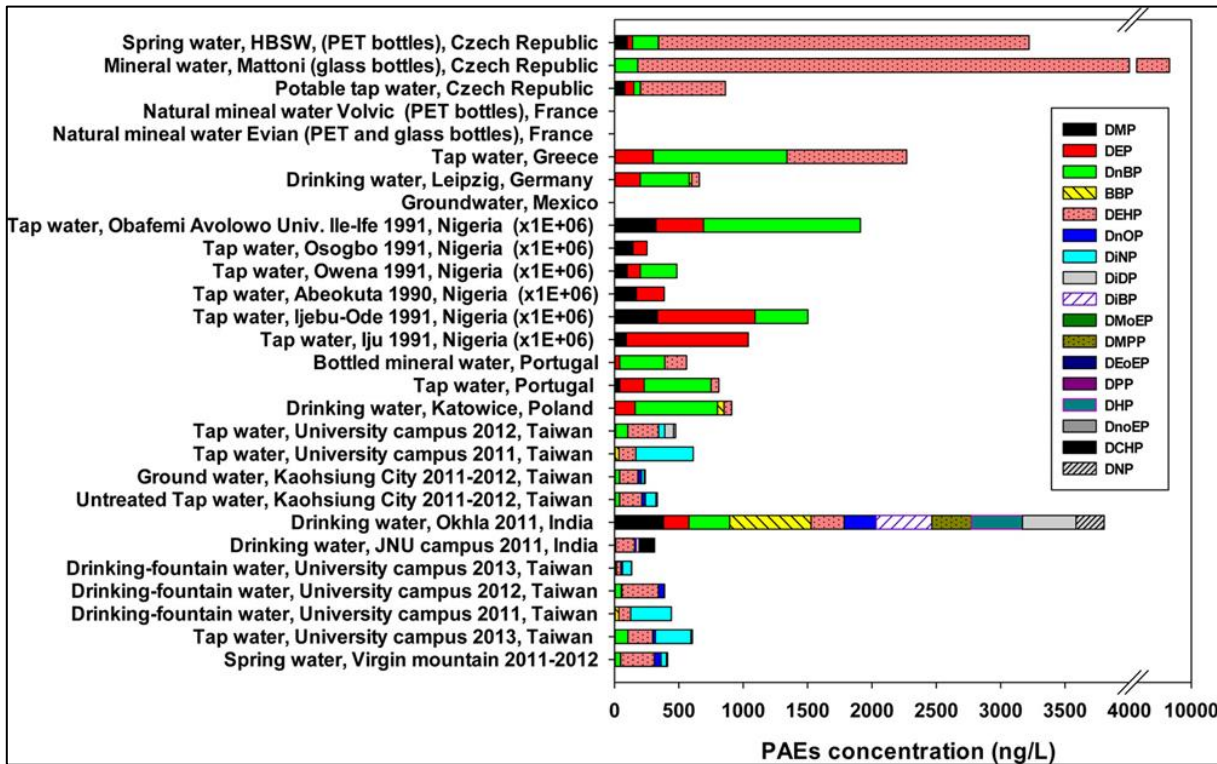


Figure 10 : Composition en esters de phtalate (PAE) des eaux potables à l'échelle mondiale (Net et al., 2015). DiBP : DBP

I.3.4.2. Devenir des phtalates dans l'environnement

Une fois dans l'environnement, les esters de phtalate subissent deux types de processus de dégradation: la dégradation abiotique et la dégradation biotique. Le processus de dégradation abiotique comprend la photolyse et l'hydrolyse qui ont lieu respectivement dans le compartiment atmosphérique et le compartiment aquatique de l'environnement. Elles constituent les principaux processus de transformation abiotique auxquels sont soumis les esters de phtalate lorsqu'ils sont libérés dans l'environnement (Staples et., 1997) (figure 11). L'hydrolyse est l'une des réactions les plus courantes contrôlant la dégradation abiotique et est donc l'une des principales voies de dégradation des substances xénobiotiques (OCDE, 1981; Huang et *al.*, 2013). D'après Staples et *al.*, (1997) les esters de phtalate sont sensibles à l'hydrolyse, mais de manière modérée. Les esters de phtalate peuvent subir deux étapes hydrolytiques, produisant d'abord le monoester et un alcool libre et une deuxième étape créant de l'acide phtalique et un second alcool (schéma 2).

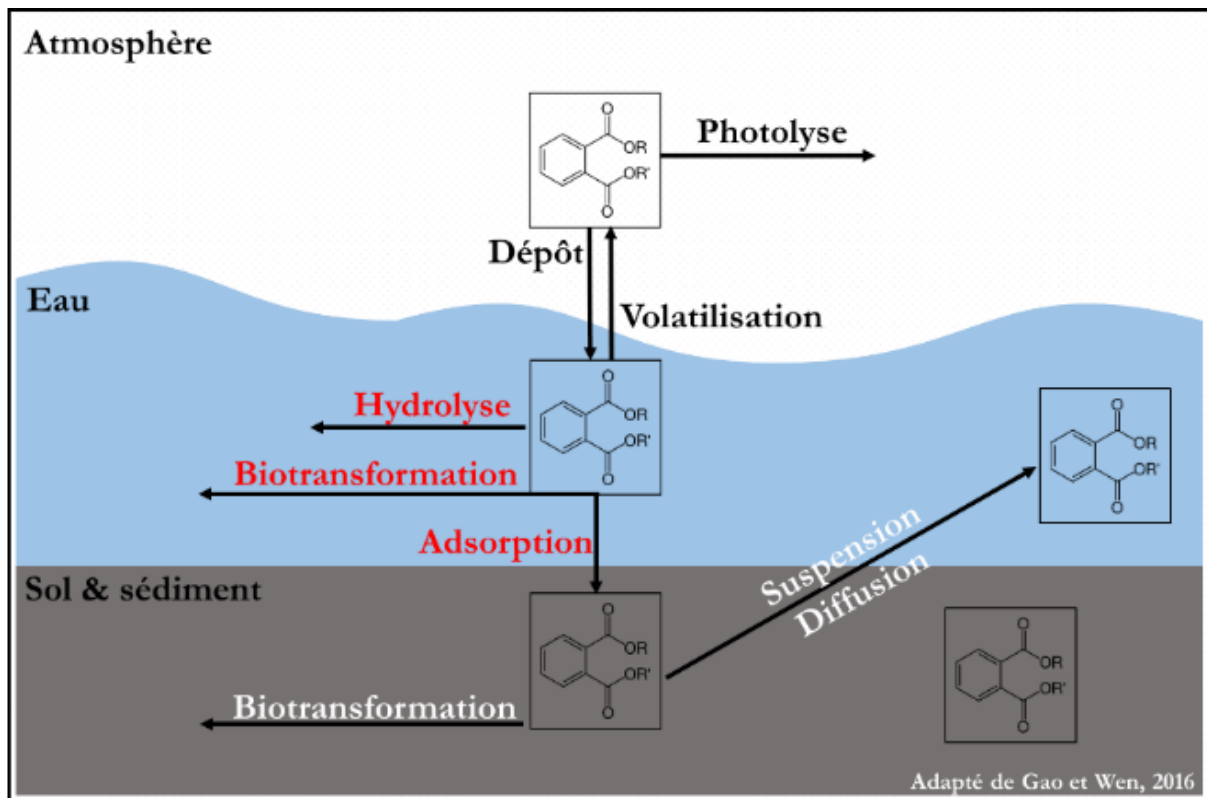


Figure 11: Occurrence et biodégradation des esters de phtalate dans l'environnement (adapté d'après Gao and Wen, 2016a).

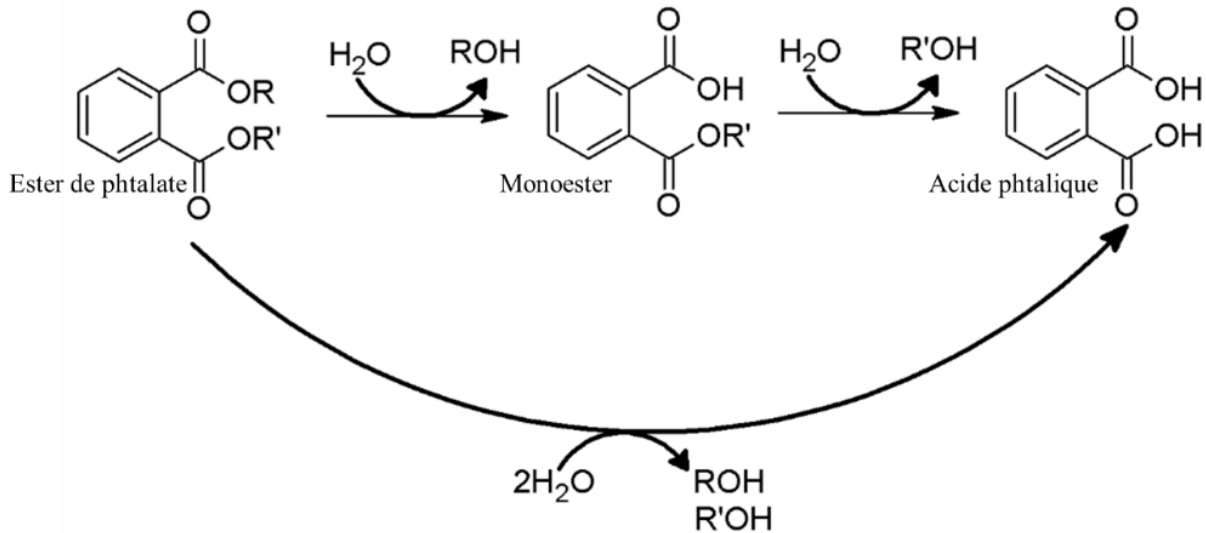


Schéma 2 : Transformation des esters de phtalate par hydrolyse (Adapté de Staples et *al.*, 1997; Huang et *al.*, 2013).

La biodégradation est une voie importante de transformation des esters de phtalate dans l'environnement, mais aussi l'une des méthodes les plus étudiées d'élimination de ces composés dans l'environnement (Gao and Wen, 2016a). Elle s'opère dans tous les milieux excepté l'atmosphère où les esters de phtalate sont susceptibles d'être sensibles à une photooxydation par les radicaux hydroxyles (Cousin et *al.*, 2003) (figure 11). D'après Staples et *al.*, (1997) les microorganismes interviennent dans ces processus de biodégradation. On les retrouve aussi bien dans les environnements aérobies que dans certains environnements anaérobies. Ils comprennent les bactéries gram-positives et gram-négatives et les actinomycètes. Bien que certains microorganismes individuels soient capables de minéraliser complètement les esters de phtalate, un métabolisme plus efficace semble résulter de populations microbiennes mixtes (consortium microbien), généralement présentes dans l'environnement (Chang et al., 2007; Engelhardt and Wallnöfer, 1978; Roslev et al., 2007). Les voies métaboliques du métabolisme microbien des esters de phtalate dans les conditions aérobies et anaérobies débutent par l'hydrolyse des esters pour former un monoester et l'alcool correspondant (schéma 3). Dans des conditions aérobies, une dégradation enzymatique supplémentaire du monoester se produit via l'acide phtalique par une voie 3,4 ou 4,5 dihydroxyphalate pour donner le procatechuate. Le clivage du noyau aromatique du procatechuate peut alors se produire via une voie ortho qui entraîne la formation du pyruvate et l'oxaloacetate ou une voie méta produisant un β -keto adipate qui est ensuite dégradé en acetyl CoA et succinate (Staples et *al.*, 1997).

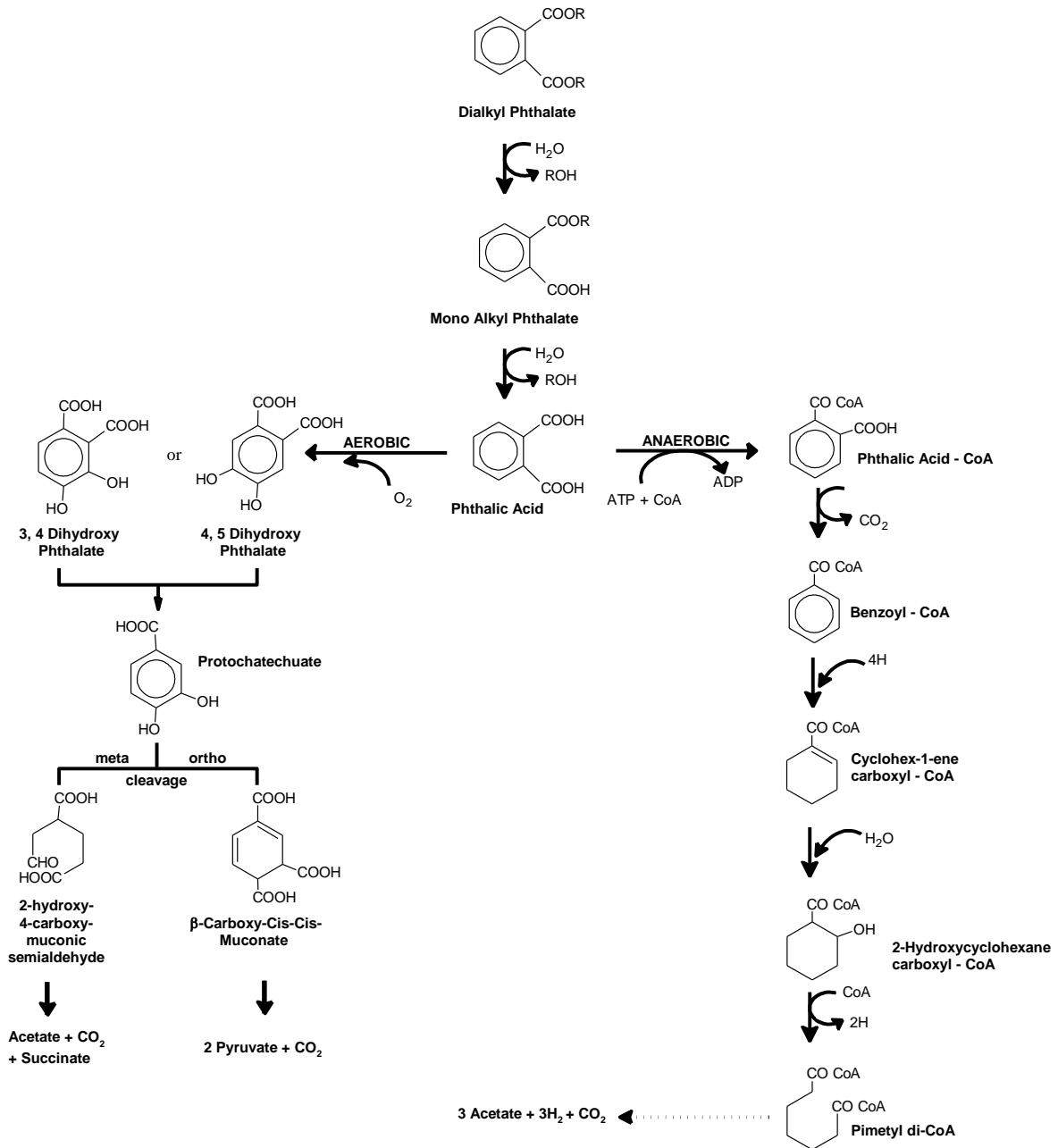


Schéma 3 : Voies générales de biodégradation des esters de phtalate dans l’environnement (Staples et al., 1997).

I.3.5. Effets et mécanisme d’action des esters de phtalate chez les organismes vivants

Les phtalates sont cancérigènes pour les animaux et peuvent causer la mort du fœtus (Abbott et al., 2007), des malformations, des lésions testiculaires, des lésions hépatiques, une activité anti-androgène, une tératogénicité, un stress oxydant (Lee et al., 2007), une prolifération de peroxysomes et en particulier une toxicité pour la reproduction chez les animaux de laboratoire (Hurst and Waxman, 2003; Peijnenburg, 2008a). Leur toxicité varie selon le type de phtalate.

Par exemple chez le rat, le mécanisme d'action sur la reproduction du DEHP est similaire chez les deux sexes (mâles et femelles) alors que le DBP et son métabolite principal le monobutyle phtalate (MBP) produisent des effets sur le développement chez les mâles et des effets sur l'appareil reproducteur chez les femelles (Peijnenburg, 2008).

Ces effets multiples des phtalates sur les organismes sont le plus souvent médiés par différents récepteurs (figures 12 et 13), tels que les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes (PPARs) (Bility, 2004; Lapinskas et al., 2005), les récepteurs d'androgènes (AR), les récepteurs d'œstrogènes (ERs) et les récepteurs thyroïdiens (Cooke et al., 2013). Les phtalates ont aussi des effets agonistes et antagonistes via des effets directs sur les hormones thyroïdiennes (TR) et sont potentiellement impliqués dans l'obésité (à notre connaissance, les réactions menant à l'obésité ne sont pas encore connues ou décrites, figure 12) (Cooke et al., 2013).

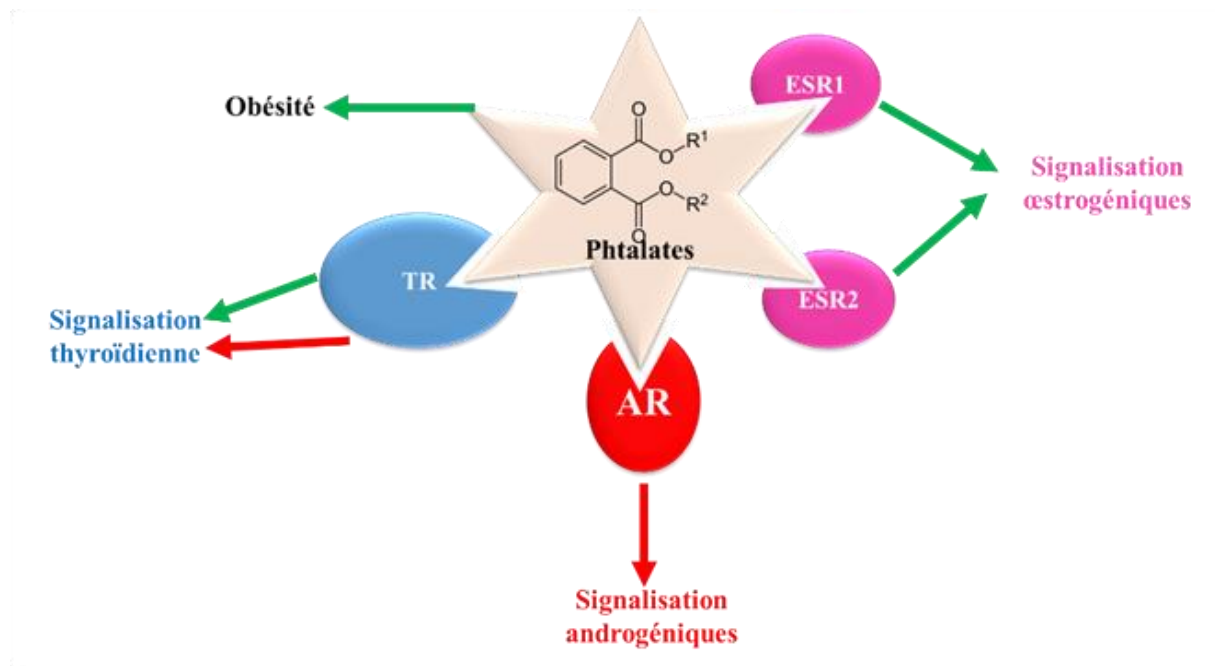


Figure 12 : Effets des phtalates sur la signalisation endocrinienne (adapté de Cooke et al., 2013). ESR 1 et 2: récepteurs aux œstrogènes 1 et 2, AR : récepteur aux androgènes, TR: récepteur de l'hormone thyroïdienne.

I.3.5.1. Effets médiés par les PPARs

La fonction transcriptionnelle des récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes (PPARs) est considérée comme le principal mécanisme d'action à la base des changements transcriptionnels induits par les plastifiants dont les phtalates (Gazouli et al., 2002; Mathieu-Denoncourt et al., 2015). Les PPARs (α , β/δ et γ) sont des récepteurs protéiques nucléaires qui

se lie à des séquences d'ADN spécifiques et régulent la transcription de l'ADN (Mathieu-Denoncourt et al., 2015). Ces récepteurs fonctionnent comme des capteurs lipidiques qui régulent de manière coordonnée l'expression de grands réseaux de gènes et, par conséquent, modulent d'importants événements métaboliques (Berger et al., 2005). L'activation des récepteurs PPARs s'effectue suite à leur liaison au ligand, la conformation du récepteur est alors modifiée de sorte qu'il forme des interactions de haute affinité avec des coactivateurs tels que les récepteurs RXRs (retinoid x receptor) qui remodelent la chromatine et activent la machinerie transcriptionnelle cellulaire (Berger et al., 2005) comme on peut le voir sur la figure 13 (2-5). Cet enchaînement de réactions peut conduire à la formation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans le cas de l'activation des PPARs par les phtalates (figure 13, 5-7) (Lee et al., 2007), ou induire des effets tels que des lésions testiculaires, des malformations ou des cancers (figure 13) (Mathieu-Denoncourt et al., 2015). La figure 13 résume l'ensemble des effets et mécanismes d'action des phtalates connus impliquant les PPARs.

La régulation du métabolisme et le transport du cholestérol impliquant l'action des récepteurs PPARs (Xie et al., 2002) peut être aussi perturbée par les phtalates (figure 13, 8-12). En effet les phtalates réduisent le transport du cholestérol, en réprimant l'expression de ses transporteurs (figure 13, 9). L'expression génique d'une série d'enzymes nécessaire pour la stéroïdogénèse est alors réprimée, ce qui entraîne une baisse du taux de testostérone (figure 13, 10-11). L'inhibition du transport du cholestérol n'est pas la seule voie de perturbation de la stéroïdogénèse par les PPARs par les phtalates. D'autres cibles telles que la 17β -hydroxystéroïde déshydrogénase (17β -HSD) impliquée dans l'activation/inactivation des androgènes et des œstrogènes (Andersson and Moghrabi, 1997) seraient également perturbées. Fan et al., (1998) ont démontré chez la souris que l'induction de la 17β -HSD IV par le DEHP et le DBP était fortement dépendante de l'expression des PPAR α dans le foie et le rein. En considérant le vaste réseaux de gènes contrôlés par les PPARs (Berger et al., 2005), on peut émettre l'hypothèse que d'autres cibles moléculaires non élucidées soient impliquées dans le mécanismes d'action des phtalates.

Les phtalates sont aussi cités comme agonistes des PPARs affectant le métabolisme des lipides chez les mammifères et l'Homme (Lind et al., 2012; Schmidt et al., 2012). Selon Schmidt et al., (2012), l'exposition à des concentrations environnementales de DEHP augmenterait les niveaux d'expression des gènes liés à l'adipogenèse (isoformes PPAR) et conduirait à une augmentation du poids corporel et des dépôts de graisse viscérale chez les souris de souche C3H/N.

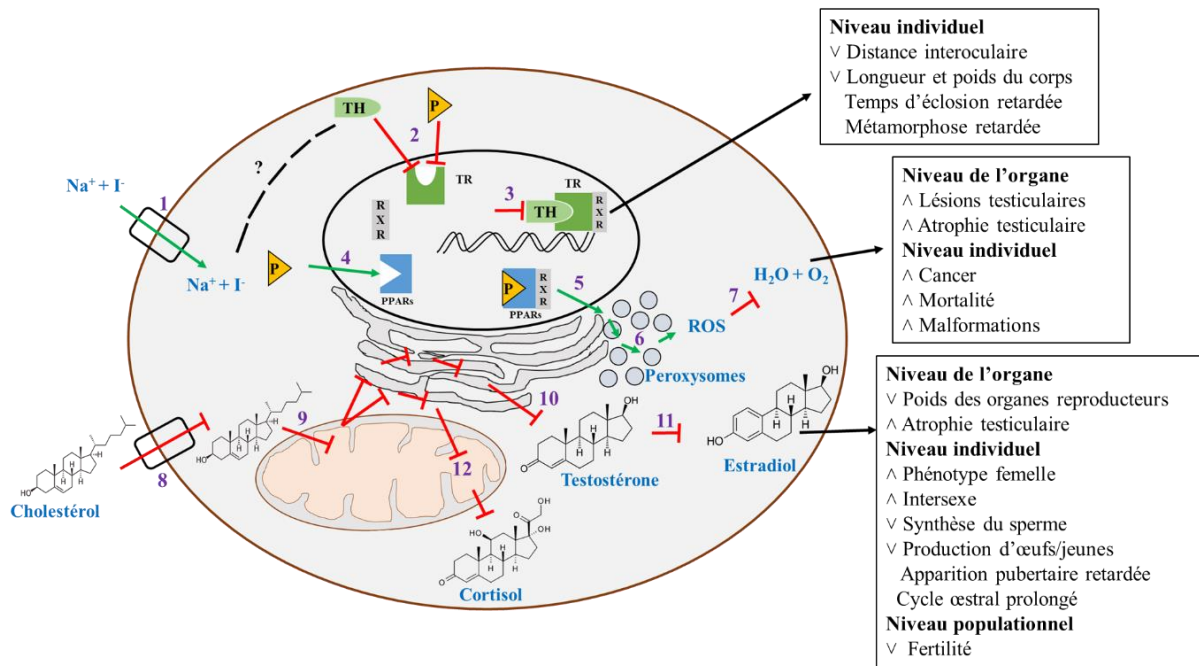


Figure 13: Exemples d'effets et de mécanisme d'action connus des plastifiants y compris les esters de phtalate et le BPA chez les espèces aquatiques en général (adapté de Mathieu-Denoncourt et al., 2015). (∧ induction; ∨ inhibition; P, plastifiants; TH, hormone thyroïdienne; TR, récepteurs des hormones thyroïdiennes; ROS, espèces réactives de l'oxygène; RXR, récepteur rétinoïde X; PPARs, récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes)

I.3.5.2. Effets médiés par les récepteurs ERs et AR

I.3.5.2.1. Les récepteurs aux œstrogènes (ER α , ER β 1 et ER β 2)

L'affinité du DBP pour les récepteurs des œstrogènes a été démontrée *in vitro* par plusieurs études chez différents organismes. Jobling et al., (1995) ont par exemple démontré que le DBP pouvait réduire la liaison du 17 β -estradiol à son récepteur (*in vitro*) chez la truite arc-en-ciel à des concentrations d'environ 10⁻⁵ à 10⁻⁷ M. D'après ces mêmes auteurs, le DBP est également en mesure de stimuler l'activité transcriptionnelle du récepteur des œstrogènes dans des lignées cellulaires du cancer du sein humain (cellules MCF-7 transfectées de manière transitoire). De plus, le DBP est aussi en mesure d'entrer en compétition avec la 17 β -estradiol pour se lier au récepteur des œstrogènes utérins de rat *in vitro*, cependant, avec une faible affinité (Zacharewski, 1998).

De même que le DBP, le DEHP peut également perturber l'expression des récepteurs ERs. En effet Maradonna et al., (2013) ont démontré la capacité du DEHP et de son métabolite l'acide phtalique (PA) à induire des variations dans l'expression des récepteurs ERs *in vitro* sur des

cultures de cellules primaires d'hépatocytes de poisson zèbre exposées à des concentrations environnementales comprises entre 0,05 et 100 nM de DEHP et 0,01 à 10 µM de PA. Ces effets sont dépendants du sexe. En effet une induction des ERβs a été observée dans les cultures d'hépatocytes femelles tandis que les cultures cellulaires provenant des mâles entraînent une réduction significative des récepteurs ERα et ERβs.

Il est important de noter que les variations au niveau des récepteurs ERs peuvent être accompagnées d'autres effets tels que des changements dans le niveau d'expression de biomarqueurs tels que la vitellogénine (*vgt*) (Dang et al., 2011). En effet, il est établi que la transcription du gène *vgt* se produit sous stimulation œstrogénique : l'œstrogène se lie au récepteur ER, ce complexe se dimérise et se lie à l'élément de réponse aux œstrogènes (ERE) situé dans le promoteur des gènes cibles, améliorant leur transcription. Le récepteur ER est donc considéré comme une molécule clé dans le processus vitellogénique (Maradonna et al., 2013). Nelson et Habibi (2010) ont démontré chez le poisson rouge (goldfish) que les trois sous-types d'ERs (ERα, ERβ1 et ERβ2) sont nécessaires pour l'induction normale de la vitellogénine par la 17β-estradiol (E2). Cependant d'autres auteurs ont pu montrer un fort lien entre l'augmentation de l'expression de ERα et l'induction de la vitellogénine en présence de E2 chez d'autres espèces de poisson (Marlatt et al., 2008; Nelson and Habibi, 2010; Sabo-Attwood et al., 2007) ou l'augmentation des ERβs et l'induction de la vitellogénine dans des cellules d'hépatocytes femelles de poisson zèbre en présence du DEHP (Maradonna et al., 2013). Ces différentes variations que l'on observe entre l'expression des ERs et l'induction de la vitellogénine suggèrent des interactions variées et complexes entre les isoformes des ERs et les ligands (DEHP, E2 etc.). Des données supplémentaires seraient nécessaires pour élucider les mécanismes d'actions médiés par ces récepteurs ERs.

I.3.5.2.2. Les récepteurs aux androgènes (AR)

D'après Dufour et al., (2003) l'exposition *in utero* à certains phtalates tels que le DBP et le DEHP produit une action antiandrogène chez l'animal en développement. Cependant, cette action anti-androgène ne semble pas impliquer la liaison irréversible des phtalates au récepteur des androgènes, mais dans le cas du DBP, elle peut supprimer la production d'androgènes dans les cellules de Leydig fœtales (Dufour et al., 2003; Ema et al., 2000; Mylchreest, 2000; Shultz, 2001). Sharpe (2001) a émis l'hypothèse que cette inhibition des récepteurs androgéniques modifierait les niveaux d'œstrogènes, entraînant un changement dans l'équilibre d'action entre les androgènes et les œstrogènes sur les testicules du rat. De même, il a été démontré que le

DBP perturbait la différenciation sexuelle masculine régulée par les androgènes chez le rat pendant l'exposition prénatale sans interagir directement avec le récepteur des androgènes, comme le fait le flutamide, un anti-androgène connu (Mylchreest et al., 1999).

I.3.5.3. Autres récepteurs

L'axe des hormones thyroïdiennes (TH) est l'un des axes hormonaux perturbés par les plastifiants dont les phtalates (Mathieu-Denoncourt et al., 2015). En effet, le système des hormones thyroïdiennes avec ses principales hormones tétraiodo-L-thyronine (T4) et 3,3', 5-triiodo-L-thyronine (T3) physiologiquement actives sont des régulateurs cruciaux de nombreux processus du développement (ex. cerveau, oreille interne et développement osseux ainsi que le remodelage osseux) et des fonctions physiologiques telles que le métabolisme des glucides, des lipides et des protéines et l'homéostasie du métabolisme (Hofmann et al., 2009). Les effets physiologiques de T3 et T4 sont médiés par la liaison aux récepteurs nucléaires des hormones thyroïdiennes alpha et beta (TRs, TR α et TR β) (Flood et al., 2013). La particularité de ces récepteurs réside dans le fait qu'ils n'ont pas l'affinité des récepteurs des œstrogènes, et donc les xénobiotiques ne se lient généralement pas aux TR. Cependant certains xénobiotiques tels que les phtalates peuvent se lier à ceux-ci avec une faible affinité (Cooke et al., 2013). Les phtalates ont des effets antagonistes sur les récepteurs des TH. C'est le cas du DEHP un inhibiteur du domaine de liaison du ligand aux TR (Ishihara et al., 2003), le benzyl butyl phtalate (BzBP) un antagoniste de T3 (Sugiyama et al., 2005) et le DBP et son métabolite principal le MBP qui altèrent l'expression de 4 gènes liés aux TH (induction de *tsha* et *tsh β* d'une part et inhibition de *tr β* et *rxry* d'autre part) chez des têtards de la grenouille africaine à griffes (Shen et al., 2011). A l'inverse, chez les rongeurs, l'expression de *tra* est induite dans les testicules des rats traités au DBP (Lee et al., 2007). Outre leurs effets au niveau moléculaire, les phtalates peuvent augmenter les niveaux des TH ainsi que la prolifération des cellules qu'elles induisent (Mathieu-Denoncourt et al., 2015). Cette induction des niveaux des TH serait liée à une hyperactivité de la glande thyroïde induite par les phtalates (Gayathri et al., 2004) ou une augmentation de l'apport d'iodure par les phtalates en augmentant l'activité du symporteur sodium/iodure (Wenzel et al., 2005). L'état actuel des connaissances ne permet pas de dire si les plastifiants y compris les phtalates peuvent modifier les niveaux des TH chez les espèces aquatiques.

I.3.6. Utilisation du DBP comme modèle de polluant

Le DEHP et le DBP représentent les deux esters de phtalate les plus utilisés et par conséquent les plus retrouvés dans l'environnement (Lyche et al., 2009; Net et al., 2015b). De plus, ils sont les esters de phtalate les plus étudiés comme nous l'avons montré avec les exemples mentionnés dans les paragraphes précédents. Les concentrations de DEHP utilisées dans la plupart des études dépassent largement sa solubilité aqueuse (environ $2,49 \times 10^{-3}$ mg/L ; tableau III). L'analyse QSAR (relation quantitative structure activité) des esters de phtalate indique que le DEHP et d'autres esters de phtalate de poids moléculaire élevé ne présentent pas de danger de toxicité aquatique en raison de l'effet combiné d'une faible solubilité dans l'eau et d'un potentiel de bioconcentration (Parkerton and Konkel, 2000). Afin de nous affranchir des contraintes de solubilité dans l'eau lors de la réalisation et de l'interprétation des expérimentations, nous avons opté pour l'utilisation du DBP beaucoup plus soluble dans l'eau (9,9 mg/L ; tableau III) que le DEHP. Des effets du DBP à faibles doses (en dessous de la limite de solubilité) ont été rapportés. Par exemple, les concentrations de DBP supérieures à 0,04 mg/L ont des effets délétères sur les invertébrés aquatiques et des concentrations supérieures à 0,2 mg/L peuvent avoir des effets létaux (Zeng et al., 2013). Outre les effets induits par le DBP lui-même, son métabolite principal, le MBP est signalé comme étant l'espèce active responsable de certains effets nocifs de l'exposition au DBP (Ema et al., 1996; Kremer et al., 2005, 2005). Le MBP est d'ailleurs indexé en tant que potentiel perturbateur endocrinien de catégorie 1 selon la saisine « 2009-SA-0331 » (ANSES, 2015). C'est pour cela que nous avons inclus le MBP dans l'exploitation de l'approche AfBPP (voir objectif 1).

I.4. Le poisson zèbre: un organisme modèle pour la détermination des cibles moléculaires des CPE

L'évaluation précoce des risques écotoxicologiques impose l'utilisation des biomarqueurs dont le développement s'est accru ces dernières années. Le développement et l'utilisation des biomarqueurs imposent l'utilisation d'espèces sentinelles ou modèles comme support. La biologie de ces espèces supports qui vont servir à la détermination des biomarqueurs doit être bien connue afin de s'affranchir des effets des facteurs intrinsèques de confusion. Parmi les matrices biologiques utilisées, les moules et certaines espèces de poissons sont privilégiés pour la détermination des biomarqueurs dans les programmes de biosurveillance à long terme et à grande échelle (Amiard and Amiard-Triquet, 2017, p. 17). De plus, se fondant sur l'idée que les mécanismes responsables de la toxicité des polluants et des drogues présentent de grandes

similitudes chez tous les vertébrés, le modèle « poisson », est souvent utilisé en toxicologie et en écotoxicologie (Amiard and Amiard-Triquet, 2017, p. 301; Segner, 2009). Parmi les espèces de poisson les plus utilisées, on retrouve le poisson zèbre *Danio rerio*. Ce chapitre présente le modèle biologique du poisson zèbre, son intérêt écotoxicologie et l'état des connaissances sur son utilisation dans les recherches liées aux CPE.

I.4.1. Généralités sur le poisson zèbre

Décrit pour la première fois en 1822 par Hamilton-Buchanan (Meyer et al., 1993), et utilisé depuis les années 1980 comme organisme modèle, *Danio rerio*, communément appelé poisson zèbre, est une espèce tropicale de la famille des Cyprinidés et de l'ordre des Cypriniformes. Il est originaire des rivières de l'est de l'Inde et se développe dans les eaux tempérées. Son corps orné de teintes vives, métalliques, brillantes et composé de cinq bandes bleu acier longitudinales sur toute sa longueur lui vaut le nom de poisson zèbre. A l'âge adulte, il mesure jusqu'à 45 mm de long et pèse environ 0,3 g, ce qui permet l'élevage d'un grand nombre de poissons dans un volume restreint tout en respectant le taux de charge recommandé (OCDE 2010). Les femelles sont morphologiquement caractérisées par un abdomen plus gonflé que les mâles et sont reconnaissables à leurs papilles urogénitales (Porcher et al., 2003). Elles pondent des œufs qui ont la particularité d'être transparents, non collants et très perméables. Les œufs fécondés se développent de manière synchrone à l'extérieur du corps de la mère et sont ainsi disponibles pour l'observation à tous les stades du développement (Ekker and Akimenko, 1991). De plus, le développement embryonnaire de *D. rerio* est rapide (voir cycle de vie, paragraphe I.4.2.), le plan du corps principal s'établit dans les 24 heures post-fécondation (hpf), et la plupart des organes sont développés dans les 96 hpf (Segner, 2009) (figure 14 et 15).

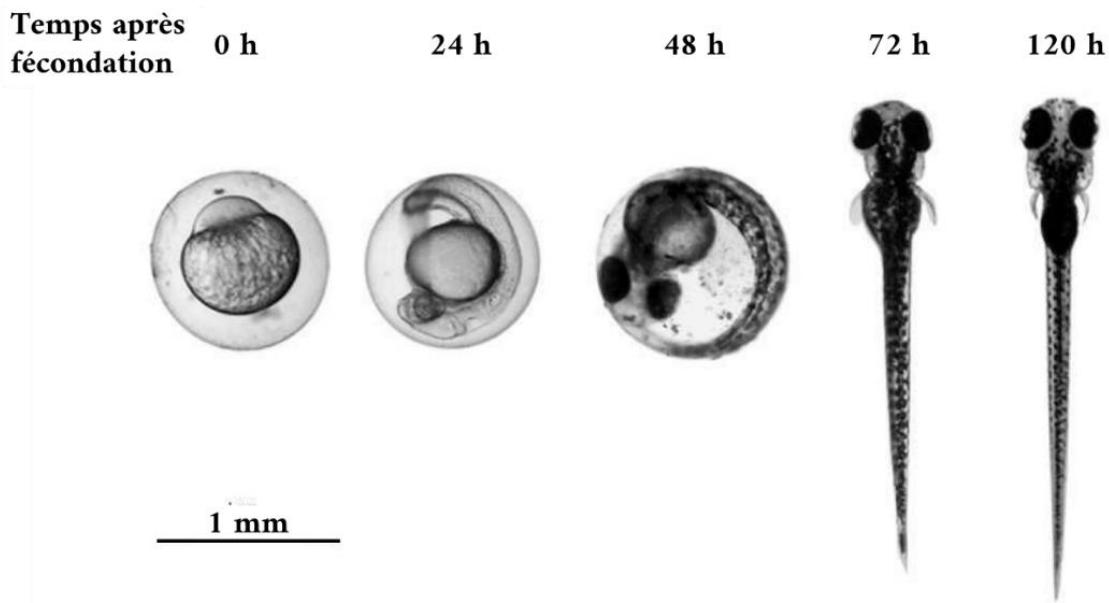


Figure 14: Principales étapes de développement embryon-larvaire du poisson zèbre (adapté de Porcher et al., 2003).

I.4.2. Cycle de vie du poisson zèbre

Le cycle biologique du poisson zèbre décrit sur la figure 15 est divisé en plusieurs périodes. Il y a tout d'abord la période de division qui commence environ trois quart d'heures après la fertilisation et peut être divisé en deux parties. La première est marquée par des divisions rapides et synchrones de l'œuf fécondé qui passe de 2 à 64 cellules, la deuxième commence avec la période blastula ($t = 2 \text{ h } 15$ environ). L'embryon est alors constitué de 128 cellules, la division du blastoderme continue, jusqu'à former plus de 1000 cellules. La blastula change ensuite de forme pour retrouver une forme sphérique. A ce stade, des cellules du sac vitellin s'enfoncent dans le blastoderme en direction du pôle animal et forment un dôme (stade bouclier figure 15). Ensuite il y a la gastrulation ($t = 5,25 \text{ h}$ environ) et l'épibolie. Ces phases sont marquées par le début des mouvements morphogénétiques d'involution, d'extension, et par le développement de l'orientation de l'axe dorso-ventral. Les rudiments de la queue, du tube neural et du cerveau sont visibles également à ce stade. À $t = 10 \text{ h}$ environ commence alors la segmentation suivie par la pharyngula ($t = 24 \text{ h}$). Les somites, les arcs pharyngés primordiaux et les neuromères se développent. La queue se détache au fur et à mesure et croît. Autour de 24 h, commence la pigmentation de la rétine, de la peau et la mise en place de la circulation du sang. Le cœur commence alors à battre et on peut voir des cellules sanguines en mouvement. L'éclosion des œufs commence à 48 heures post-fécondation, mais en général l'éclosion n'a lieu qu'à partir du dernier stade, c'est-à-dire 72 h environ. Il est important de préciser que la durée d'éclosion dépend de la température du milieu d'élevage. Ces périodes (48 – 72 h) sont

marquées par la fin de la morphogénèse des organes primaires, le développement des cartilages de la tête et des nageoires pectorales, une importante pigmentation, le battement intense du cœur rempli de sang circulant. A 120 h environ, la période de larves précoces est atteinte. Trois jours après éclosion (144 hpf), la morphogénèse de la larve est quasiment achevée et elle continue à grandir. Elle commence à nager activement, bouge ses mâchoires, ses nageoires pectorales et ses yeux. Ceci lui permet des réponses rapides à des stimuli par la fuite, et annoncent la respiration, la recherche de proies et l'alimentation (Porcher et al., 2003). A l'âge de 90 jours, la maturité sexuelle est atteinte. Les poissons adultes peuvent alors se reproduire rapidement et en grand nombre. Quelques centaines d'œufs sont produits à chaque croisement et un croisement peut être répété à quelques jours d'intervalle. La durée de vie moyenne des poissons zèbres est estimée à 3 ans lorsqu'ils évoluent en milieu naturel et de 2 ans en condition de laboratoire.

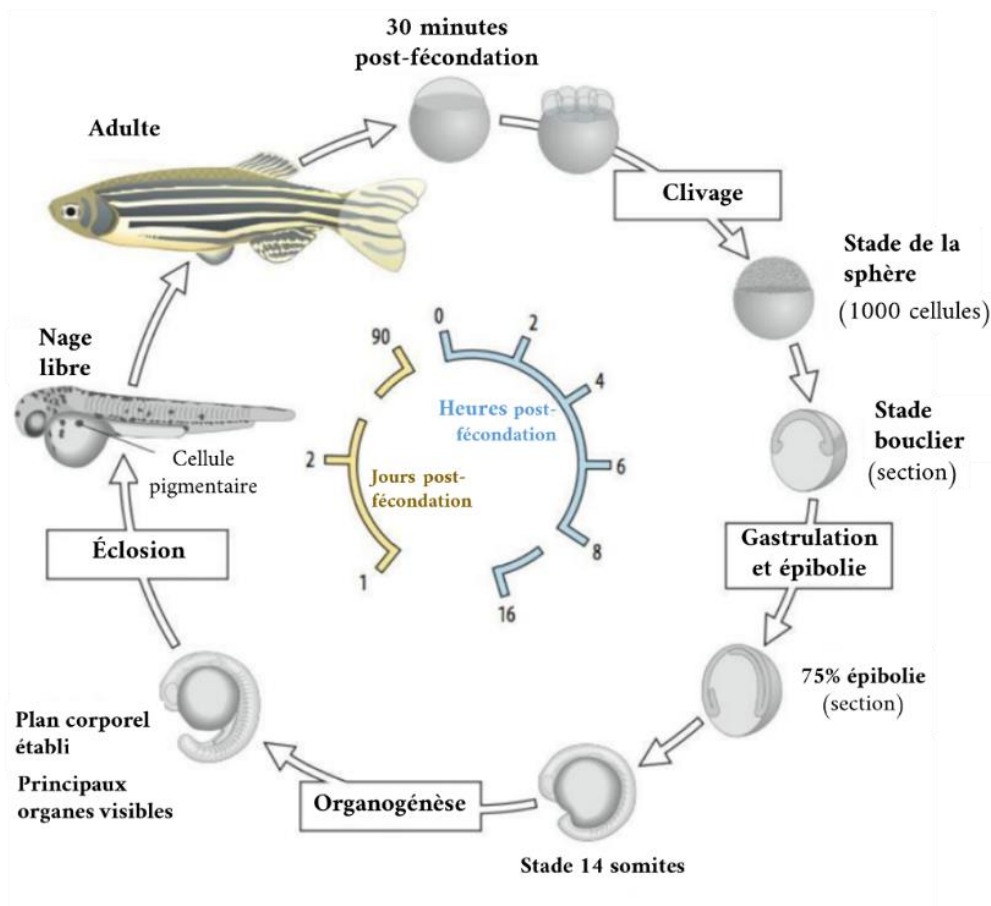


Figure 15: Description du cycle biologique de *Danio rerio* (adapté de Wolpert et al., 2015).

I.4.3. Intérêt écotoxicologique

Plusieurs bioessais d'évaluation de la toxicité des molécules y compris des CPE préconisés par les instances nationales ou internationales telles que l'Organisation pour la coopération et le développement économique (OCDE) ou l'US Environmental Protection Agency (USEPA) utilisent le poisson comme modèle y compris le poisson zèbre. C'est notamment le cas des lignes directrices de l'OCDE sur la toxicité aiguë (OCDE 203), la toxicité à un stade précoce de la vie (OCDE 210), d'essais de toxicité à court terme sur les stades d'embryons et alevins (OCDE 2012), des tests de croissance juvéniles (OCDE 215) et les essais à court terme de reproduction des poissons (OCDE 229).

Ce petit poisson bien connu des aquariophiles et des chercheurs, présente de nombreux atouts qui font de lui un modèle de choix aussi bien en recherche fondamentale qu'appliquée. Il a l'avantage d'avoir une petite taille, et, supportant bien les conditions de captivité (température, pH, dureté de l'eau), son élevage est facile et requiert peu d'espace. De plus, la plupart des caractéristiques des poissons adultes sont observables au stade juvénile (15 à 20 jours post-fécondation). Son cycle de vie relativement court permet de faire des études couvrant plusieurs générations, ce qui permet d'estimer les conséquences populationnelles d'une exposition à un contaminant. Des mutations affectant le développement telles que les effets tératogènes à tous les stades du développement peuvent être facilement observées (Egger and Akimenko, 1991). L'avantage majeur de cet organisme est que son génome est entièrement séquencé et que 71% des gènes humains ont un orthologue chez le poisson zèbre (Howe et al., 2013).

Le poisson zèbre est souvent cité comme organisme modèle de référence pour identifier les cibles ainsi que les modes d'actions des CPE (Armengaud et al., 2014; Schiller et al., 2013; Segner, 2009; Truong et al., 2014). Les propriétés moléculaires du système endocrinien et les voies de signalisation des hormones du poisson zèbre sont suffisamment similaires à celles d'autres vertébrés pour que cette espèce soit utilisée comme modèle pour les recherches mécanistiques sur la perturbation endocrinienne (Segner, 2009). Le potentiel des composés chimiques à exercer une activité de type PE est mis en évidence aussi bien par l'utilisation des poissons au stade larvaire qu'au stade adulte (Andersen et al., 2006; Örn et al., 2006; Segner, 2009). Pour toutes ces raisons, nous avons fait le choix d'utiliser le poisson zèbre comme organisme modèle pour nos recherches.

I.4.4. *Danio rerio* et CPE : état actuel des connaissances

Ce sous-chapitre a pour but de montrer la capacité du modèle *Danio rerio* à répondre par diverses voies à une exposition à un agent toxique de type CPE. Il reprend quelques exemples emblématiques retrouvés dans la littérature scientifique et justifie le choix de *D. rerio* comme modèle d'étude de ce (notre) travail de recherche.

I.4.4.1. Effets des CPE sur les récepteurs de *D. rerio*

Comme mentionnée plus haut, les récepteurs PPARs sont impliqués dans les mécanismes d'actions des phtalates. Par exemple, l'exposition des poissons mâles adultes à 5000 mg/kg de DEHP augmente les niveaux de deux gènes sensibles aux récepteurs PPARs (acyl-coenzyme A oxydase 1 et enoyl-coenzyme A, hydratase/ 3-hydroxyacyl coenzyme A déshydrogénase) (Uren-Webster et al., 2010a). L'enzyme peroxysomale ACOX est d'ailleurs très utilisée comme indicateur de l'activation des PPARs chez les poisson (Ortiz-Zarragoitia and Cajaraville, 2005). La capacité de liaison des phtalates aux PPARs peut être différente de celle de leurs métabolites. C'est notamment le cas du mono éthylhexyl phtalate (MEHP), le métabolite principal du DEHP qui se lie plus fortement aux récepteurs PPARs activés que le composé parent lui-même (DEHP) et donc capable d'induire plus d'effets néfastes chez les organismes que le composé parent (Bility, 2004; Lampen et al., 2003). Les effets médiés par les PPARs rapportés dans la littérature dépendent de plusieurs facteurs dont l'âge des individus. Par exemple, Ortiz-Zarragoitia et al., (2006) ont démontré que la 17 α -éthynylestradiol (EE2) provoquait une prolifération des peroxysomes hépatiques aux premiers stades de la vie, mais pas chez les femelles adultes de poisson zèbre (Ortiz-Zarragoitia et al., 2006). En dehors des PPARs, les récepteurs d'estrogènes (ERs) du poisson zèbre peuvent réagir aux CPE d'une manière différente de leurs homologues mammifères, y compris une absence totale de réponse transcriptionnelle aux molécules qui sont pourtant de puissants activateurs des ERs de souris (Bardet et al., 2002), d'où la nécessité d'évaluer les effets des CPE sur plusieurs organismes modèles afin d'avoir une vue plus globale de leurs mécanismes d'action.

I.4.4.2. Effets des CPE sur les biomarqueurs classiques testés chez *D. rerio*

I.4.4.2.1. Vitellogénine (VTG)

L'induction de la vitellogénine (VTG) chez les mâles est un marqueur sensible de l'exposition des poissons aux CPE (Arukwe and Goksøyr, 2003; Segner, 2009). Rose et al., (2002) ont en effet montré qu'en seulement 24 heures suivant le début de l'exposition au 17 β -estradiol (E2),

des changements quantifiables de la protéine VTG pouvaient être observés chez le poisson zèbre mâle. Ces mêmes effets sont mis en évidence chez les larves après 21 jours d'exposition à l'EE2 (10 ng/L) (H. Xu et al., 2008). Beaucoup d'études suggèrent l'induction de la vitellogénine comme marqueur de toxicité dû aux CPE, mais certains produits chimiques semblent influencer la vitellogénine de poisson d'une manière qui diffère du modèle connu (Dang, 2014). Par exemple, lorsque le poisson zèbre est exposé au DBP, l'expression de la VGT est inhibée à 4 et 6 jours post fécondation (jpf) mais augmenté à 21 jpf et n'a aucune influence à 35 jpf (Dang, 2016). L'absence d'une activité œstrogénique du DBP a également été démontrée chez le poisson zèbre mâle et la truite arc-en-ciel juvénile (*Oncorhynchus mykiss*) exposés à différentes concentration (40, 200 et 1000 µg/L de DBP) pendant trois semaines (Van den Belt et al., 2003). De même, Qiao et al., (2013) ont rapporté que la microcystine-LR, une toxine produite par les cyanobactéries induit l'expression de la VTG chez les femelles de poisson zèbre, mais entraîne une inhibition de cette protéine chez les mâles. Ces auteurs rapportent également la réduction de l'expression de l'ARNm de la VTG-1 dans le foie des poissons zèbres femelles et mâles (Qiao et al., 2013). L'âge des organismes, le type de polluant testé et sa concentration, la durée de traitement des organismes sont des facteurs qui influencent le niveau d'expression de la VTG. En plus de ces facteurs qui peuvent paraître évident, il y a également la technique de mesure utilisée (dosage enzymatique ou quantification de l'expression des gènes par qPCR) qui n'apportent pas le même niveau de résultat.

I.4.4.2.2. Les biomarqueurs de défense et enzymes de détoxification

Les biomarqueurs de défense classique ont également été mesurés chez le poisson zèbre dans le cadre de l'évaluation des effets des esters de phtalate. On sait qu'en présence des contaminants environnementaux, le stress oxydant se produit dans les systèmes biologiques et est identifié comme un déséquilibre entre la production et l'élimination des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Valavanidis et al., 2006). La capacité des phtalates à perturber l'équilibre oxydatif dans les testicules, à la fois dans les cellules somatiques et les spermatozoïdes en développement (en augmentant la production de ROS), est bien établi (Kasahara et al., 2002; Park et al., 2002; Uren-Webster et al., 2010a). Xu et al., (2013) ont rapporté que l'exposition des larves de poisson zèbre au DBP et au DEP augmentait la production de ROS ainsi que la peroxydation lipidique (LPO) de manière dépendante de la concentration. En réponse au stress causé par ces deux composés, l'activité d'enzymes antioxydantes telles que la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GPx) avait également

augmenté de manière dépendante de la concentration d'exposition aux deux composés (Xu et al., 2013c).

Le mécanisme de défense des organismes face aux contaminants implique aussi des enzymes participant à la biotransformation des contaminants organiques telles que les enzymes cytochromes P450 (CYP) appelées oxydases à fonction mixte (mixed function oxidases, MFO). Elles sont considérées comme les principales enzymes responsables du métabolisme de composés endogènes mais aussi des xénobiotiques. Suite à une exposition aux xénobiotiques, les isoenzymes CYP sont induites à la suite notamment du déclenchement de la transcription du gène *cyp1a*, médiée par les récepteurs AHR (aryl hydrocarbon receptor). Il s'en suit un accroissement de l'expression des ARN messagers correspondants, une synthèse *de novo* des isoenzymes et un accroissement de leurs activités catalytiques (Amiard and Amiard-Triquet, 2017, p. 28). De tels mécanismes ont été démontrés chez des embryons de poisson zèbre exposés au 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) (Voelker et al., 2008). L'induction du P450A1 a également été rapportée chez des larves de poisson zèbre et chez les femelles adultes exposées au DBP (Ortiz-Zarragoitia et al., 2006). En plus des effets médiés par les cytochromes P450, une induction de l'activité des glutathion-S-transférases (GST) a également été mise en évidence chez le poisson zèbre (Dong et al., 2013; Velki et al., 2017). Une inhibition significative de l'activité des enzymes telles que l'acétylcholine estérase (AChE) et la carboxylestérase (CES) appartenant à la famille des hydrolases à sérines est aussi rapportée chez des larves de poisson zèbre exposées au diazinin (insecticide) et au diuron (herbicide) (Velki et al., 2017).

I.4.4.2. Autres effets des CPE observés chez *D. rerio* : mortalité, croissance, sexe ratio, histologie des gonades, fécondité.

L'exposition des larves de poisson zèbre à l'estrogène de synthèse 17 α -éthynylestradiol (EE2) (2 et 10 ng/L) pendant une durée de 90 jours a entraîné plusieurs effets néfastes, tels qu'une augmentation de la mortalité de l'ordre de 60% par rapport au témoin, une augmentation du sexe ratio (femelle/mâle) en faveur des femelles ainsi que des perturbation de la spermatogénèse et une réduction de la fécondité (Xu et al., 2008). De même Ortiz-Zarragoitia et al., (2006) ont montré que l'EE2 (5 μ g/L) provoquait 50% de mortalité chez les larves de poisson zèbre au bout de 5 semaines d'exposition. De plus, les larves provenant des femelles exposées au DBP étaient caractérisées par des malformations (effets tératogènes) et une forte mortalité.

Des CPE, autres que des hormones de synthèse ou des plastifiants, testés sur des larves de poisson zèbre ont également montré des effets délétères sur la survie et le développement. C'est par exemple le cas du perfluorooctanesulfonate (PFOS), un composé perfluoré utilisé comme surfactant, reconnu comme CPE et inscrit sur la liste des polluants organiques persistants (Convention de Stockholm). Shi et *al.* (2008) ont montré que l'exposition des poissons du stade embryonnaire (4 heures post-fécondation) au stade larvaire (132 heures post-fécondation) à des doses croissantes de perfluorooctanesulfonate (PFOS, 1 à 5 mg/L) pouvait causer un retard d'éclosion, une diminution de la survie des larves, des malformations grossières du développement (déformation de l'épibolie, hypopigmentation, œdème du sac vitellin, malformations de la queue et du cœur) et un retard significatif de la croissance.

I.5. Utilisation de nouvelles approches protéomiques pour la compréhension des modes d'action des xénobiotiques

L'objectif majeur de l'écotoxicologie est de comprendre les effets des polluants environnementaux sur les organismes vivants afin de soutenir les politiques publiques visant à la protection de l'homme et de la faune (Groh and Suter, 2015). L'atteinte de cet objectif majeur passe par l'utilisation de diverses stratégies de recherche parmi lesquelles on retrouve celles basées sur la toxicogénomique (Garcia-Reyero et al., 2014; Groh and Suter, 2015). Ces approches visent à élucider les mécanismes moléculaires d'action de différents polluants, dans le but ultime d'utiliser ces connaissances pour développer des stratégies de test alternatives ciblées pour des groupes spécifiques de substances toxiques (Ge et al., 2013; Groh and Suter, 2015; Iwahashi et al., 2006). Elles comprennent des techniques « omiques » telles que la transcriptomique, la protéomique et la métabolomique, qui étudient les changements dans la composition et l'abondance d'un grand nombre de transcrits d'ARNm, de protéines et de petits métabolites, respectivement. Sans renier l'importance des autres techniques très utiles du fait de leur complémentarité, nous nous focaliserons sur celles qui est en lien direct avec notre problématique de recherche à savoir la protéomique.

Il est admis et bien établi que les changements physiologiques, y compris phénotypiques, et les dommages toxiques induits par les produits chimiques sont précédés et reflétés par des changements moléculaires se produisant dans les organismes exposés. A ce sujet, le protéome est perçu comme étant plus proche du phénotype que le génome ou le transcriptome (Diz et al., 2012), et en tant que tel, il reflète l'activité réelle dans les cellules et fournit des liens plus directs avec les fonctions régulées et les capacités de défense de l'organisme étudié. Pour cette

raison, les protéines sont considérées comme un niveau d'expression génique plus pertinent à étudier (Rees et al., 2011). Le but ultime de la protéomique est de tendre vers la compréhension complète du rôle de chaque protéine dans tous les processus physiologiques, dans n'importe quel type de cellule dans les conditions d'intérêt.

Les recherches en protéomique globale impliquent l'exposition/traitement des cellules ou des organismes modèles aux produits chimiques, suivie d'une analyse du protéome de la cellule souvent entière ou de l'ensemble de l'organe. Ces recherches sont attrayantes en raison de la nature de l'analyse sans a priori, de leur simplicité conceptuelle et de la faisabilité technique croissante (Bantscheff and Drewes, 2011). Dans ce genre d'études, les changements d'expression pouvant être détectés sont souvent limités par la profondeur analytique de l'analyse, c'est-à-dire par le nombre de protéines qui peuvent être quantifiées de manière différentielle dans l'expérience. Les résultats ont alors tendance à être biaisés en faveur des protéines les plus abondantes (Bantscheff and Drewes, 2011).

Une alternative attractive développée pour des recherches en protéomique est le profilage protéique basé sur l'activité (ou *activity-based protein profiling*, ABPP). Cette stratégie repose sur l'activité d'une enzyme plutôt que de ses niveaux d'expression, ce qui est important car l'abondance d'une enzyme n'est pas nécessairement liée à une activité dans les processus biologiques (Geurink et al., 2011). Cela s'explique par le fait qu'un grand nombre d'enzymes sont exprimées sous forme de proenzymes inactives et doivent donc être maturées en leurs formes actives. De plus, l'état de l'enzyme peut être commuté entre une forme active et inactive par des modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation, la glycosylation, l'acétylation, l'ubiquitylation et la méthylation ou par leurs inhibiteurs naturels (Geurink et al., 2011).

I.5.1. Principe de l'ABPP

C'est dans un contexte de compréhension du mode d'action des produits naturels (Natural products, NP) et autres petites molécules d'intérêt en vue de leurs utilisations en thérapeutique (identification de cibles de médicaments) que l'ABPP a émergé. Cette approche permet principalement de fournir des informations (activité, fonction et régulation) sur les protéines avec lesquelles un composé interagit *in vivo* ou *in vitro* (Böttcher et al., 2010; Gersch et al., 2012; Wright and Sieber, 2016; Yang and Liu, 2015; Ziegler et al., 2013).

Par définition, l'ABPP utilise la chimie de synthèse pour générer des molécules organiques relativement petites pouvant marquer une enzyme spécifique (ou famille d'enzymes) dans son

état actif. Ces molécules organiques sont appelées « sondes d'activité » (activity-based probes, ABPs). De manière classique, les ABPs comportent les 3 éléments fonctionnels suivant (Geurink et al., 2011; Murale et al., 2016; Nomura et al., 2010a; Smith and Collins, 2015; Wright and Sieber, 2016) :

- **Unité de reconnaissance** : elle a une fonction de liaison ou de sélectivité. Elle dirige l'ABP vers sa cible d'intérêt. Elle est conçue pour ressembler aux motifs structuraux et fonctionnels du substrat naturel de l'enzyme cible, de sorte qu'un certain nombre d'enzymes apparentées au sein d'une famille soient ciblées. Elle n'est cependant pas systématiquement présente.
- **Warhead** : il s'agit d'un groupe réactif qui a pour rôle de réagir dans le site actif de l'enzyme et d'établir ainsi une liaison covalente entre l'ABP et l'enzyme. Il peut être fixé à l'unité de reconnaissance.
- **Tag** : il a une fonction de rapporteur. Il permet des analyses après la liaison irréversible de la sonde à ses cibles, telles que la visualisation et/ou la purification de l'enzyme liée. Le « tag » est fixé à l'unité de reconnaissance éventuellement présente et au groupe « warhead » via un espaceur.

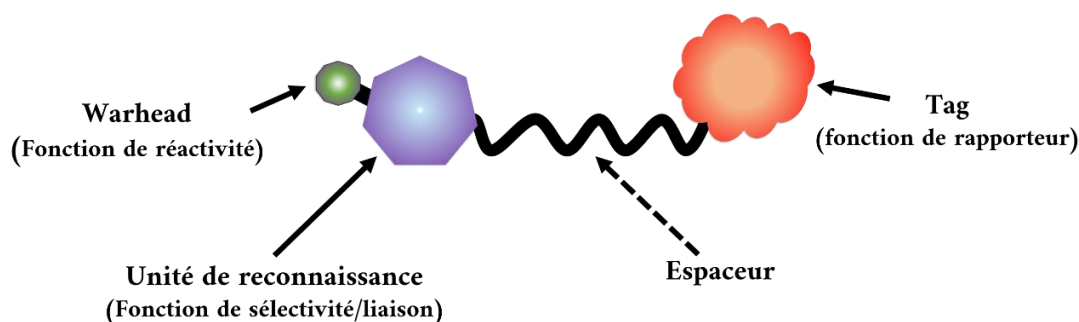


Figure 16 : Illustration de la structure classique d'une ABP. L'unité de reconnaissance n'est pas systématiquement présente.

On retrouve dans la littérature scientifique plusieurs exemples d'application de cette approche avec des spécificités très diverses. Il nous paraît important de faire deux clarifications majeures. La première concerne les types de marquages possibles avec une sonde, et la deuxième les types de sondes retrouvées classiquement dans la littérature.

On distingue deux types de marquage avec les sondes : le marquage en une étape et le marquage en deux étapes (figure 17). Dans le premier cas, le tag (fluorophore ou biotine) est directement attaché à la sonde (figure 17, haut) tandis que dans le second cas, un azoture ou un alcynes est

fixé à la sonde ; le tri des cibles marquées par la sonde nécessite alors une étape de ligation bioorthogonale (figure 17, bas) (Patterson et al., 2014). Cette technique de marquage en deux étapes a été développée pour les cas dans lesquels le tag pourrait entraver l'interaction entre la sonde et sa cible (enzyme) ou réduire considérablement sa capacité à traverser la membrane cellulaire, ce qui est particulièrement intéressant pour le marquage dans les cellules vivantes (Geurink et al., 2011).

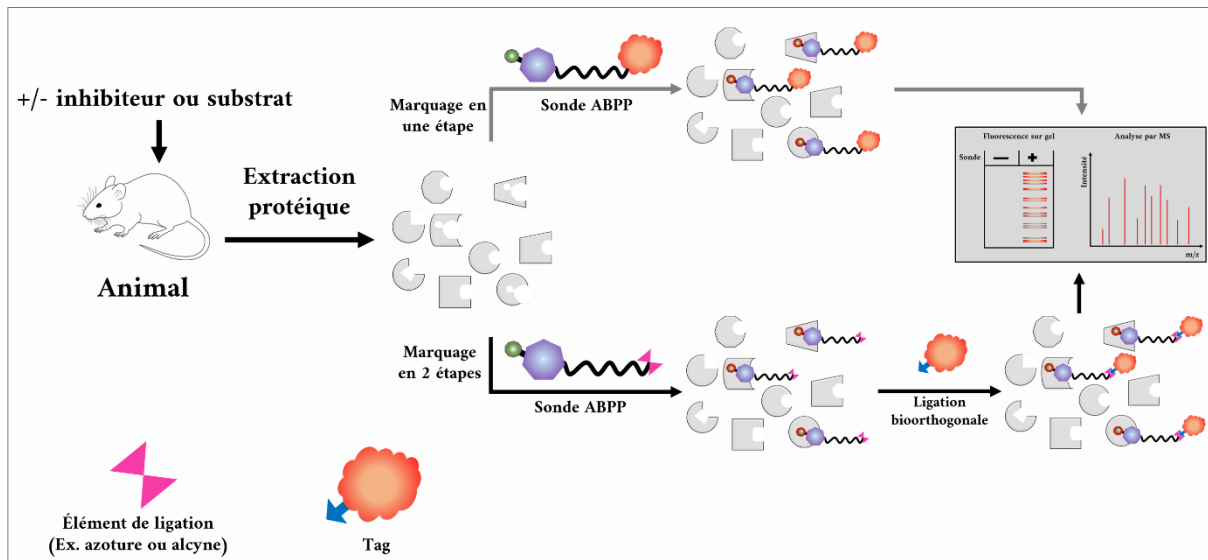


Figure 17 : Illustration de l'approche ABPP. Les deux types de marquage sont montrés. Marquage en une étape (haut) marquage en deux étapes (bas) (adapté de Geurink et al., 2011)

En fonction de la présence ou non de l'unité de reconnaissance, on peut distinguer 2 types de sondes :

- Activity-based probes (ABP) : utilisent des éléments électrophiles pour la réactivité caractéristique du mécanisme catalytique de certaines enzymes ;
- Affinity-based probes (AfBP): possèdent systématiquement une unité de reconnaissance et utilise souvent des éléments photoactivables pour la réactivité permettant la fixation covalente ;

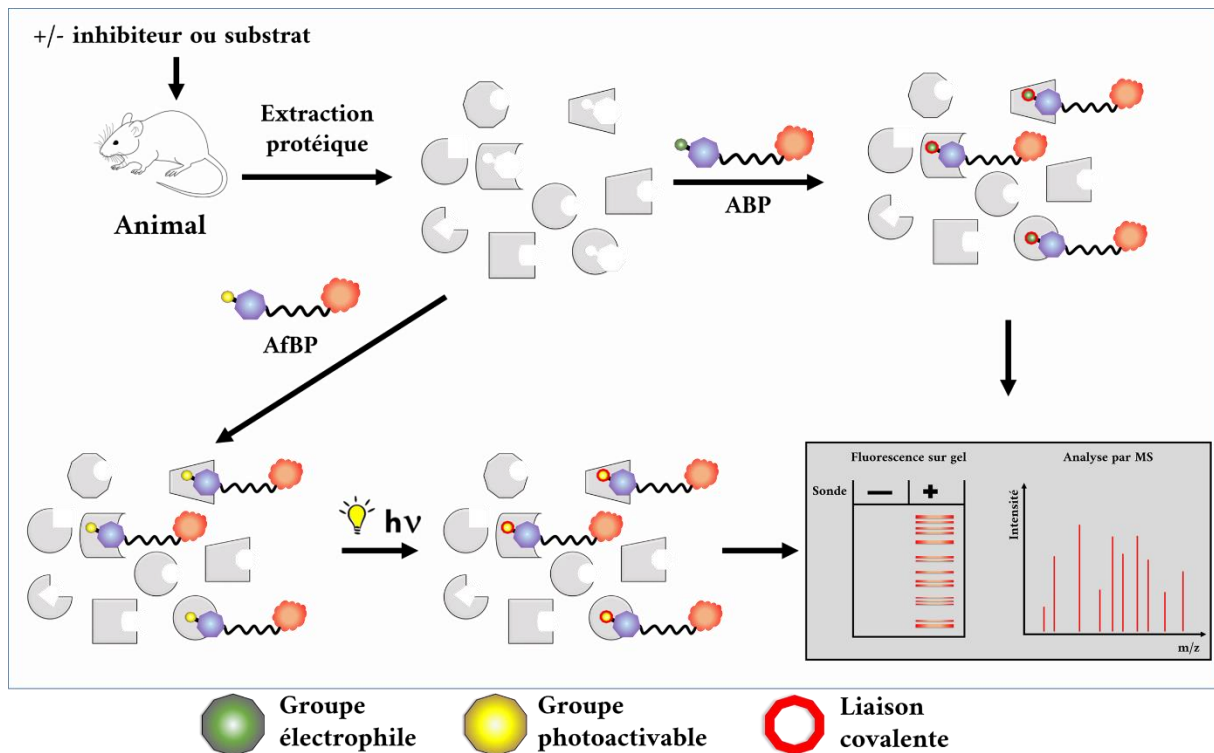


Figure 18 : Illustration du marquage avec les deux types de sondes. ABP (en haut) et AfBP (en bas).

L'utilisation des ABPs pour le marquage des enzymes est appelé « activity-based protein profiling » (ABPP) et celle des AfBPs pour le marquage des cibles protéiques est communément appelé « affinité-based protein profiling » (AfBPP). La conception des sondes (ABPs ou AfBPs) dépend donc des cibles protéiques visées, mais aussi du type de ligand d'intérêt et du niveau d'organisation biologique à étudier (*in situ*, *in vitro* ou *in vivo*). Les sous-chapitres suivants passent en revue la conception et l'utilisation de ces sondes.

I.5.2. Sondes électrophiles (activity-based probes ABPs)

Initié par les groupes de recherche dirigés par Cravatt et Bogoy en 1999, l'ABPP est une stratégie bien établie qui utilise des sondes contenant des groupes électrophiles qui réagissent de manière covalente avec les nucléophiles du site actif des enzymes (Cravatt et al., 2008; Fonović and Bogoy, 2008). L'ABPP est utilisée pour l'identification rapide, sensible et sélective de l'activité enzymatique et des inhibiteurs dans les protéomes (Böttcher et al., 2010).

De façon basique une sonde ABPP est composée de 3 éléments : un groupe réactif, un espaceur et un tag (figure 19). Il est important de noter que la présence d'une unité de reconnaissance n'est pas indispensable pour le ciblage de certaines enzymes comme nous l'avons indiqué un peu plus tôt.

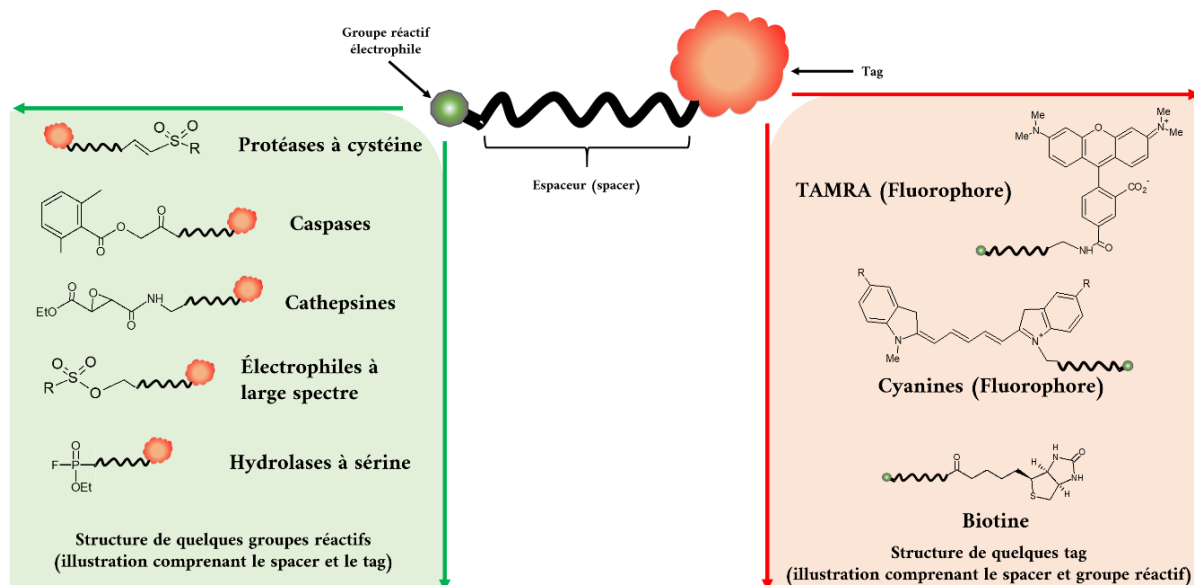


Figure 19 : Sondes ABPP : caractéristique générale et exemples (adapté de Niphakis and Cravatt, 2014).

L'élément fonctionnel indispensable à la conception des ABPs est le groupe réactif. Il est spécialement conçu pour lier et marquer de manière covalente les sites actifs de nombreux membres d'une classe d'enzyme donnée (Nomura et al., 2010a). Le marquage de la sonde est guidé par l'accessibilité du site actif de l'enzyme et la réactivité intrinsèque des résidus catalytiques favorisant le marquage sélectif des enzymes fonctionnelles dans le contexte du plus large protéome (Niphakis and Cravatt, 2014). Plusieurs groupes réactifs sont utilisés à ce jour pour cibler une multitude de classes d'enzymes (figure 19), dont beaucoup ont un rôle central dans les cancers, telles que les hydrolases et protéases (Greenbaum et al., 2002; Kidd et al., 2001; Liu et al., 1999; Sieber et al., 2006), les kinases (Liu et al., 2005; Patricelli et al., 2007), les caspases, les phosphatases (Kumar et al., 2004), les cathepsines, les histones désacétylases (Salisbury and Cravatt, 2008, 2007), les glycosidases (Hekmat et al., 2005; Vocadlo and Bertozzi, 2004), les protéases à cystéines (Kato et al., 2005) et diverses oxydoréductases (Adam et al., 2001; Weerapana et al., 2008).

L'approche ABPP tient compte de la réactivité spécifique des enzymes ainsi que des diverses modifications qui peuvent réguler la fonction enzymatique indépendamment de l'expression de

celles-ci (Niphakis and Cravatt, 2014). Par exemple, les divers niveaux de régulation, les modifications post-traductionnelles (Otlewski et al., 2005) ainsi que la présence d'inhibiteurs endogènes sont pris en compte ce qui n'est pas le cas des approches de protéomique globale, cette dernière n'étant pas basée sur la réactivité spécifique des enzymes fonctionnelles.

On retrouve dans la littérature scientifique plusieurs applications de l'ABPP, sur divers systèmes biologiques tels que : les protéomes cellulaires et tissulaires, les cellules vivantes mais aussi les organismes vivants (Niphakis and Cravatt, 2014). Cette approche est largement utilisée pour l'identification des activités enzymatiques dérégulées dans les états pathologiques (Heal and Tate, 2012, pp. 115–136; Jessani et al., 2004; Nomura et al., 2010b), la découverte et le développement d'inhibiteurs enzymatiques sélectifs (Leung et al., 2003; Li et al., 2007), la caractérisation des sites actifs enzymatiques (Adam et al., 2004; Zeiler et al., 2013), l'élucidation des cibles (Arastu-Kapur et al., 2008; Hall et al., 2011), la localisation de l'activité enzymatique dans les cellules (Chang et al., 2012) et *in vivo* (Edgington et al., 2009).

La technique de conception des sondes impliquant les trois éléments cités ci-dessus (groupe réactif électrophile, espaceur et tag) n'est parfois pas adaptée pour le marquage de certaines cibles protéiques. En effet, les protéomes regorgent de nucléophiles et donc, l'obtention d'une sélectivité avec les sondes électrophiles peut nécessiter un groupe de liaison ou d'affinité supplémentaire qui dirige la sonde vers des cibles d'intérêt (Niphakis and Cravatt, 2014) comme indiqué sur la figure 17 (unité de reconnaissance). De plus, certaines classes d'enzymes n'utilisent pas de résidus nucléophiles conservés pour la catalyse, et dans ces cas, les sondes utilisées pour le marquage des cibles doivent permettre d'obtenir un marquage covalent par un autre moyen. C'est par exemple le cas des métalloprotéases, les histones désacétylases (HDAC) et les kinases (Geurink et al., 2011). L'alternative à ce problème consiste à utiliser des sondes qui réagissent avec des résidus nucléophiles non catalytiques, natifs (Patricelli et al., 2007) ou modifiés (Blair et al., 2007) en ciblant sélectivement un site de reconnaissance d'un ligand défini. De telles sondes sont qualifiées de sondes d'affinité (Blair et al., 2007; Heal et al., 2011; Niphakis and Cravatt, 2014).

I.5.3. Sondes de photoaffinité (Afinity-based probes AfBP)

Pour les enzymes ne possédant pas de résidu de site actif réactif pour un marquage par l'approche ABPP, un groupe photochimique peut être utilisé pour assurer une liaison covalente entre la sonde et l'enzyme ou tout autre protéine non-enzymatique. Dans ce cas, l'affinité de liaison de la sonde pour ses cibles protéiques avant la liaison covalente est une condition

déterminante de son utilité et de sa sélectivité. L'unité de reconnaissance mentionnée précédemment (figure 16) contribue de manière primordiale à cette affinité pour les cibles protéiques. Les méthodes de marquage de photoaffinité encore appelé « photoaffinity labeling » (PAL) entrent dans cette catégorie de marquage basée sur l'affinité. Il est possible que le site actif d'une enzyme puisse être accessible même lorsqu'il est inactif (Niphakis and Cravatt, 2014).

Le marquage de photoaffinité (PAL) a été développé pour la première fois par Westheimer et al en 1962 (Singh et al., 1962). Cette approche fait appel à l'utilisation de sondes portant des groupes photoréactifs inertes dans les conditions chimiques de synthèse et biologiques standard, mais pouvant être activées par la lumière UV, générant ainsi des espèces transitoires hautement réactives qui lient les sondes à n'importe quelle molécule se trouvant à proximité, y compris les partenaires de liaison protéiques (Wright and Sieber, 2016).

Le nombre de groupes photoréactifs généralement utilisés pour l'approche PAL est limité. Le choix de ces groupes photoréactifs doit être basé sur les critères clés suivants (Dormán and Prestwich, 2000) :

- Une stabilité raisonnable sous lumière ambiante ;
- Un état excité généré par photoactivation avec une durée de vie plus courte que la dissociation du complexe ligand-récepteur mais suffisamment longue pour permettre une liaison covalente avec le site ciblé ;
- Un radical réactif fournissant un seul adduit covalent ; et
- Une forme activée hautement réactive qui réagit avec les groupes C-H ainsi qu'avec les liaisons nucléophiles X-H pour accroître les possibilités de fixation avec les protéines cibles.

Ce dernier critère est important afin d'obtenir une liaison covalente stable qui résiste aux méthodes d'analyses en aval au marquage et évite la diffusion ou la libération d'une forme activée qui entraînerait un marquage non spécifique (Dormán and Prestwich, 2000).

Les groupements photoactivables couramment utilisés sont les benzophénones, les aryl azides et les alkyl- ou aryl-diazirines (Smith and Collins, 2015).

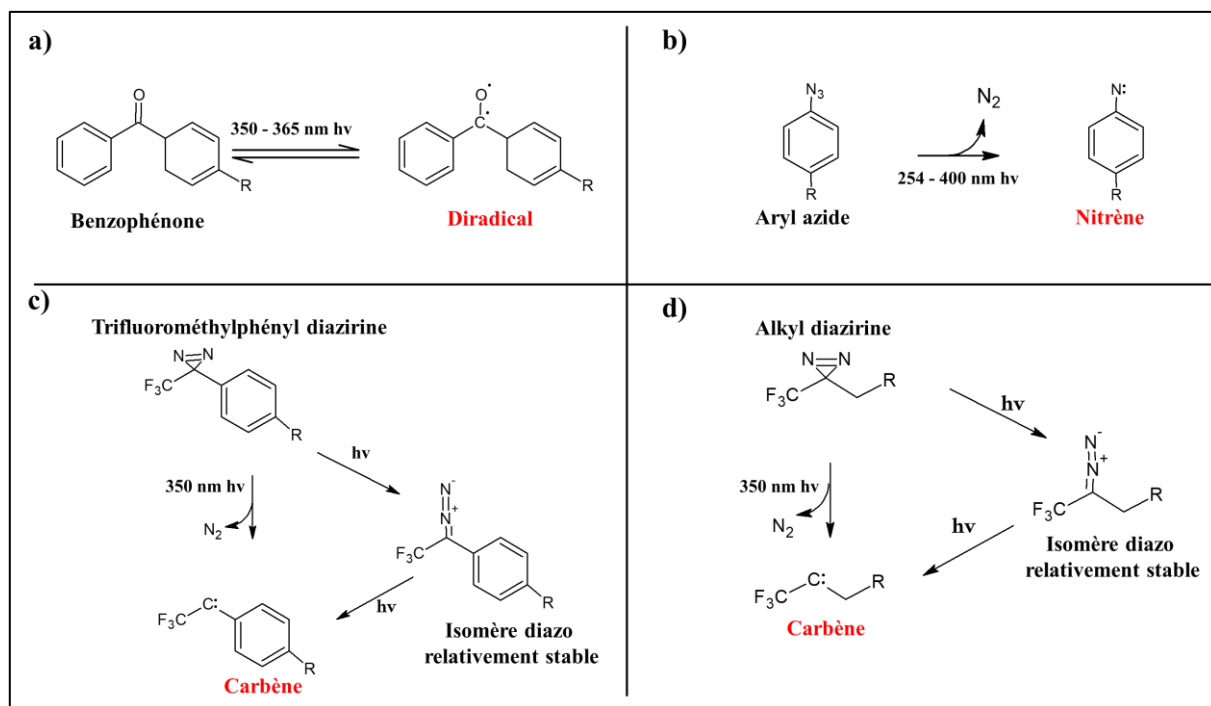


Schéma 4 : Mode d'action de quelques groupes photoactivables (Adapté de Murale et al., 2017)

I.5.3.1. Benzophénone (BP)

Utilisé pour la première fois dans les années 1970, le BP (schéma 4, a) est l'un des groupes photoactivables les plus utilisés grâce à sa sélectivité et sa grande affinité pour la méthionine (Dorman and Prestwich, 1994; Murale et al., 2016). La conversion du BP en un radical réactif se fait par une activation à des longueurs d'onde comprises entre 350 et 365 nm. Ces longueurs d'onde ont l'avantage d'être moins dommageables pour la structure primaire des protéines et donc adaptées aux applications biologiques. L'irradiation à l'UV du BP génère un triplet biradical cétyle qui réagit avec des groupes fonctionnels protéiques via un mécanisme d'abstraction-recombinaison séquentielle (Murale et al., 2016). Les BP sont aussi reconnus pour leurs réactivités vis-à-vis des liaisons C-H plus fortes que celles des nitrènes. Ils sont également moins propices à des réarrangements intramoléculaires que les carbènes. Cependant, une irradiation pendant une durée prolongée (> 30 min) est souvent nécessaire pour l'obtention d'une liaison par photoactivation raisonnable (Vodovozova, 2007).

I.5.3.2. Aryl azide (AA)

Décrit par Bayley et Knowles (1977) la photoactivation des AA (schéma 4, b) génère une espèce réactive appelée nitrène qui est formée par une perte de N_2 lors de l'irradiation UV. Cette photoactivation des AA se fait à des longueurs d'onde comprises entre 254 et 400 nm. Le nitrène peut réagir avec les liaisons C-H et hétéroatome-H voisines, formant un nouveau produit lié par covalence. Les AA sont chimiquement stables et ont des propriétés photophysiques supérieures à celles de leurs partenaires alkyle et acyle correspondants (Murale et al., 2016), mais leur réactivité est plus faible que celle des carbènes (Bayley and Knowles, 1977). L'inconvénient majeur des AA est que leur longueur d'onde d'absorption maximale est inférieure à 300 nm, l'irradiation électromagnétique à ces longueurs d'onde peut endommager considérablement le système biologique. De plus, l'irradiation UV des AA génère des voies réactionnelles non désirées et des rendements de liaison par photoactivation souvent faibles (<30%). Certains auteurs suggèrent que la popularité de son utilisation dans les études PAL est basée sur sa relative facilité de préparation et d'incorporation plutôt que sur ses propriétés photochimiques (Geurink et al., 2011).

I.5.3.3. Diazirine (DA)

Les deux types de groupes photoactivables classiquement utilisés sont les trifluorométhyl phényl DA et les alkyl DA (schéma 4, c et d). Ils peuvent tous deux générer une espèce réactive appelé carbène par la perte de N_2 lors d'une photoirradiation à 350 nm. Les carbènes sont très réactifs et peuvent être insérés dans des liaisons C-H ou hétéroatomes-H voisines pour former un adduit covalent. De plus avec une demie vie très courte de l'ordre de la nanoseconde, le carbène généré peut réagir très rapidement. Les isomères diazo des DA (schéma 4, c et d) ont aussi la capacité de générer l'espèce réactive carbène via la perte irréversible de N_2 (Murale et al., 2016). Mais les isomères diazo peuvent être transformés en carbène singulet sous l'influence de la lumière ; cependant, aux longueurs d'onde normalement utilisées (360 nm), ce processus est relativement lent. De plus la durée de vie de l'espèce diazoïque est relativement longue et a donc le temps de se diffuser, ce qui est susceptible d'entraîner soit un marquage aspécifique, soit une hydrolyse (Brunner et al., 1980).

Les DA sont stables dans une grande variété de conditions y compris les conditions fortement acides et basiques ou en présence des agents oxydants et réducteurs, ce qui constitue un gros avantage par rapport aux AA (Geurink et al., 2011). La formation de quantités substantielles (>30%) d'espèces diazoïque après la photoactivation et la réactivité intrinsèquement efficace

du carbène singulet avec des liaisons O-H (ce qui conduit souvent au piégeage des espèces réactives par l'eau) sont les deux inconvénients liés à l'utilisation des DA (Brunner et al., 1980). Il faut aussi mentionner que la synthèse des DA est plus complexe que celles des AA.

Le marquage covalent des protéines non ciblées par les groupes photoactivables induit souvent un biais dans les résultats en générant une liste massive de protéines cibles potentielles, en particulier lorsque l'activité des sondes est relativement faible (Geurink et al., 2011; Park et al., 2016). Ces interactions non spécifiques entre les sondes et d'autres protéines sont entraînées par l'effet hydrophobe et l'interaction électrostatique, qui masquent souvent la protéine cible (Smith and Collins, 2015). Le choix du groupe photoactivable dans la conception des sondes est donc une étape critique pour la mise en application de cette approche. Il n'existe pas de groupe photoactivable idéal même si certains auteurs comme Mural et al. (2016) suggèrent plus l'utilisation du BP au dépend des deux autres (AA et DA). Mais en raison des différences de préférences de site de réaction et de la nature des intermédiaires réactifs de chaque groupe réactif individuel, le type de groupe photoactivable optimal requis diffère d'un système à l'autre (Fleming, 1995). Une étape d'optimisation peut être nécessaire afin de choisir le bon groupe photoactivable pouvant assurer l'obtention de meilleurs résultats avec les sondes AfBPP.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons opté pour l'utilisation des sondes photoactivables avec la possibilité d'un marquage en deux étapes (figure 17). Le marquage en deux étapes permet d'utiliser une sonde dépourvue de tag de visualisation ou de fixation. De telles sondes permettent de minimiser les modifications à apporter sur la structure de la molécule d'intérêt. Ce faisant, on réduit les encombrements stériques et les perturbations lors de la liaison de la sonde à ses cibles protéiques tout en préservant autant que possible les propriétés physico-chimiques afin que la sonde puisse être appliquée dans un contexte *in vivo* (Wright and Sieber, 2016). L'utilisation de telles sondes exige de coupler à l'étape de marquage des protéines, une étape de ligation bioorthogonale qui permet de fixer un tag de visualisation ou de purification aux adduits formés. Le sous-chapitre suivant décrit les différents techniques de ligation classiquement utilisées et met l'accent sur la réaction de ligation catalysée par le Cu(I) dont nous avons privilégié l'utilisation (Speers et al., 2003a; Speers and Cravatt, 2004).

I.5.4. Techniques de ligation pour la détection des protéines marquées

Les réactions de ligation les plus fréquemment utilisées (figure 20) sont celles de Staudinger-Bertozzi (Saxon, 2000) et la réaction de cycloaddition 2,3-dipolaire de Huisgen encore appelé “click”. La réaction de Huisgen peut être divisée en deux voies : celle catalysée par le cuivre (« copper-catalyzed reaction ») (Rostovtsev et al., 2002; Speers et al., 2003a) et celle favorisée par la contrainte sans le cuivre (« strain-promoted reaction ») (Baskin et al., 2007; Ning et al., 2008) (figure 20, c). A cette liste de réaction, il faut ajouter celle développée par Poloukhine et al., (2009) qui utilise la cyclopropénone pour assurer la ligation par click après une irradiation à la lumière UV (350 nm) (figure 20 d) (Poloukhine et al., 2009).

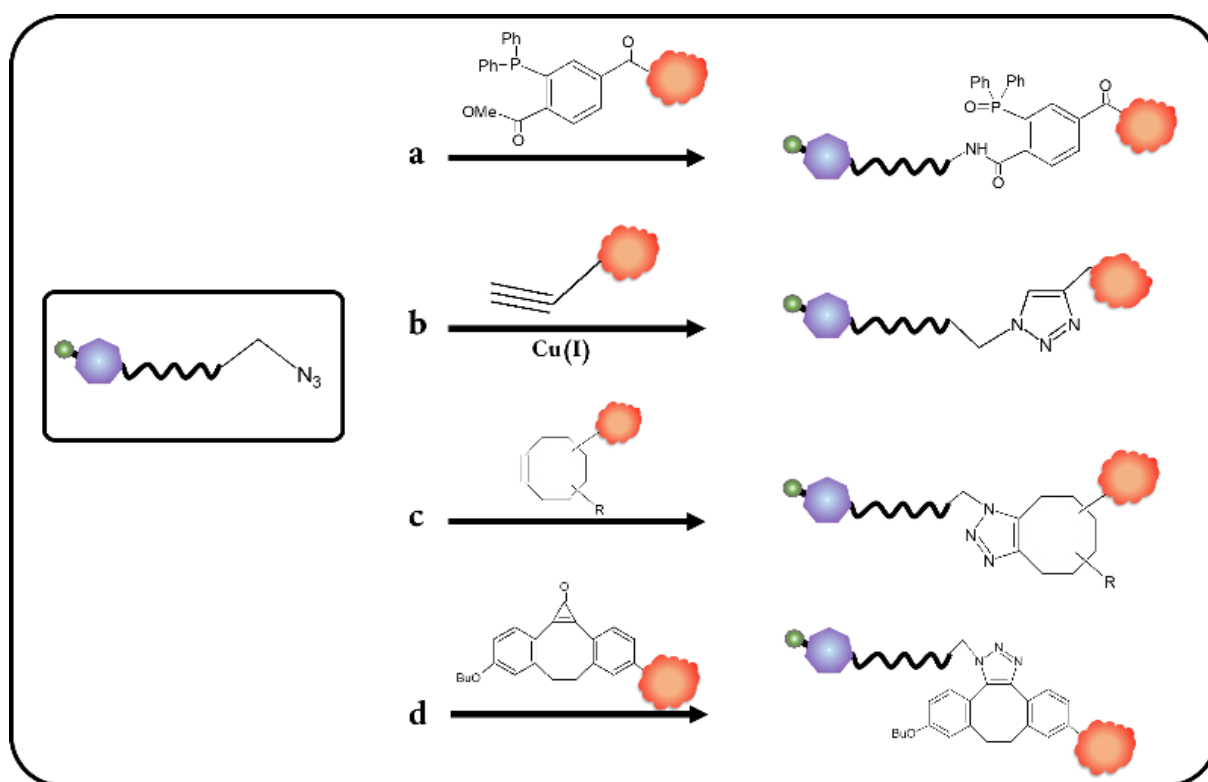


Figure 20 : Techniques de ligation fréquemment utilisées dans le marquage en deux étapes. (a) ligation de Staudinger – Bertozzi, (b) Réaction de chimie-click catalysée par le Cu(I), (c) réaction de chimie click sans Cu(I) (« copper-free click reaction »), (d) réaction de « photoclick » (adapté de Geurink et al., 2011).

En raison du fait qu'elle soit très utilisée pour la ligation bioorthogonale et de son utilisation dans ce projet de thèse, il nous paraît important d'aborder plus en détail le concept de chimie click catalysée par le Cu(I).

I.5.4.1. Réaction de ligation catalysée par le Cu(I) : la chimie-click

Les réactions de cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen (CuAAC) sont des processus de fusion exergonique qui unissent deux réactifs insaturés et fournissent un accès rapide à une énorme variété d'hétérocycles à cinq chaînons (Rostovtsev et al., 2002). Parmi celles-ci, on retrouve la réaction de cycloaddition d'azide et d'alcyne pour donner un motif 1,2,3-triazole qui est sans doute l'une des plus utilisées (Zheng et al., 2015). Le ratio entre le triazole 1,4 et le 1,5-disubstitué varie suivant les conditions expérimentales (schéma 5).

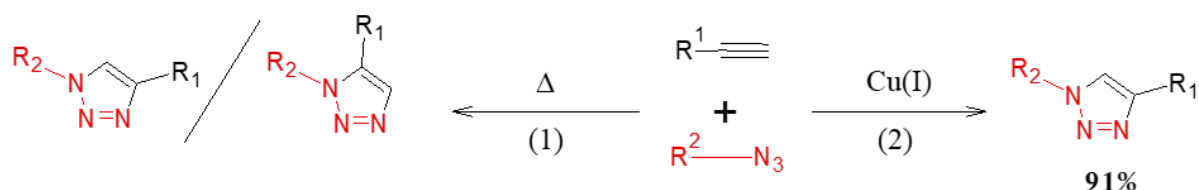


Schéma 5 : Synthèse des triazoles par la réaction de cycloaddition de Huisgen entre l'azide et l'alcyne CuAAC (adapté de Zheng et al., 2015).

Seule la réaction catalysée par le Cu(I) unit de manière régiospécifique les azotures et les acétylènes terminaux pour donner uniquement des 1,2,3-triazoles 1,4-disubstitués (Tornøe et al., 2002) selon le mécanisme suivant.

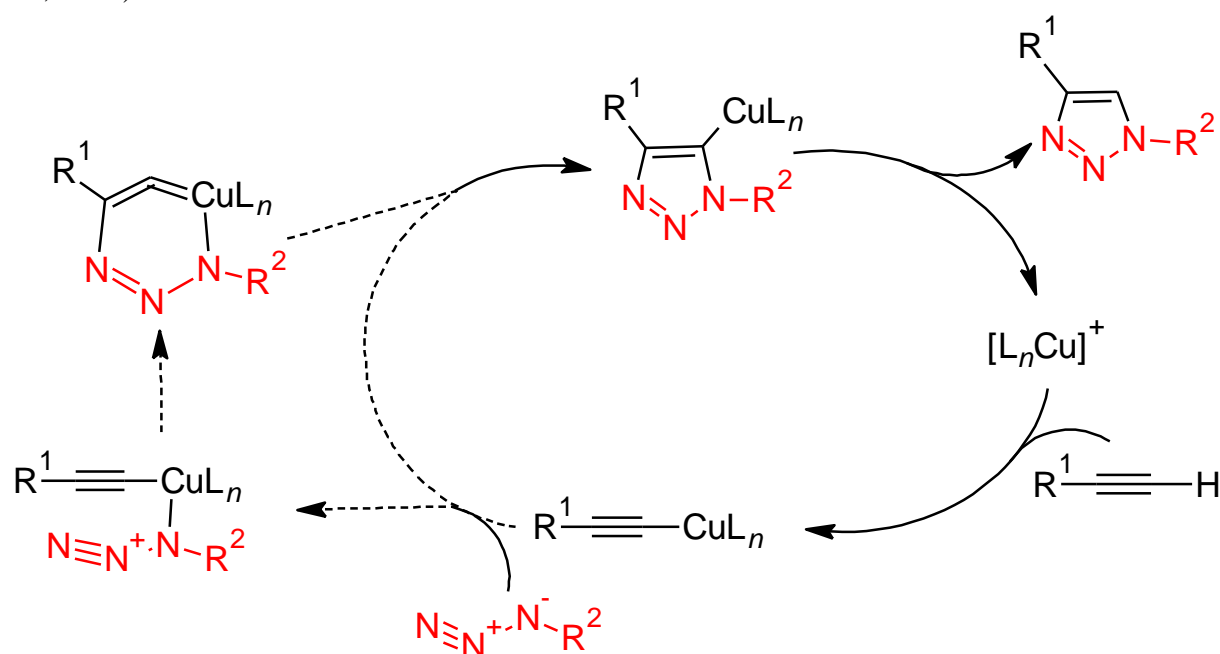


Schéma 6 : Mécanisme réactionnel de chimie click catalysée par le Cu(I) (adapté de Rostovtsev et al., 2002).

Plusieurs sources de Cuivre(I) ont initialement été utilisées directement pour catalyser la réaction de chimie click, telles que les sels de cuivre (I) CuI, CuOTf·C₆H₆, [Cu(NCCH₃)₄][PF₆] et le CuBr. Ces réactions nécessitent généralement de l'acétonitrile comme co-solvant et un équivalent d'une base azotée (triéthylamine et diisopropyléthylamine par exemple). De plus, elles génèrent des sous-produits indésirables, principalement des diacétylènes, des bis-triazoles et des hydroxytriazoles (Tornøe et al., 2002). Une alternative à l'utilisation direct des sels de Cu(I) consiste à réaliser la réduction *in situ* des sels Cu(II) telle que le CuSO₄·5H₂O pour catalyser la réaction de chimie click. Cette dernière réaction se réalise en milieu aqueux et présente l'avantage d'être moins coûteuse. L'ascorbate de sodium (NaAsc) et/ou l'acide ascorbique sont très utilisés pour la réduction en milieu aqueux du Cu(II) en Cu(I) car ils permettent la préparation d'un large spectre de produits 1,4-triazole avec de bons rendements (Presolski et al., 2011; Rostovtsev et al., 2002). Cependant d'autres auteurs préconisent l'utilisation du Tris(carboxyéthyl)phosphine (TCEP) pour la réduction du Cu(II) lors de la réaction de chimie click (Wang et al., 2003). Vila et al., (2008) ont cependant constaté que le TCEP n'était pas adapté à certaines conditions expérimentales. Ils ont pu noter par exemple que la réaction de chimie click s'est produite dans les lysats cellulaires avec l'usage du TCEP comme agent réducteur alors que la même réaction ne s'est pas produite avec les adduits peptidiques. Toutefois, les deux agents réducteurs (NaAsc et TCEP) génèrent des ions cuivre cytotoxiques qui peuvent affecter la structure des protéines. Le groupe de recherche dirigé par Finn ont en effet montré que l'utilisation d'ascorbate pouvait induire un désassemblage substantiel de la capsid du virus de la mosaïque du niébé (Cowpea mosaic, CPMV) et que le TCEP conduisait à la décomposition du virus (Wang et al., 2003). Pour contourner ce problème, l'utilisation de ligand tels que le tris(hydroxypropyltriazolylmethyl) amine (THPTA) est recommandé (Chan et al., 2004; Hong et al., 2009; Presolski et al., 2011). Pour Hong et al., (2009), l'utilisation du THPTA a le double rôle de protéger les biomolécules de l'hydrolyse par les sous-produits du Cu(II) et d'intercepter de manière sacrificielle les radicaux et/ou les peroxydes dérivés de l'O₂/Cu/ascorbate qui oxydent l'histidine et d'autres résidus. De même, ce ligand peut être utilisé en excès (5 équivalents en Cu(II)) sans compromettre l'efficacité de la réaction (Presolski et al., 2011). On retrouve dans la littérature d'autres ligands tels que le Tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl] amine (TBTA) (Chan et al., 2004; Hein et al., 2011) le bathophénanthroline disulfonate (BPDS) (Lewis et al., 2004). Sur la base de ces éléments, on peut résumer la réaction de chimie click comme suit.

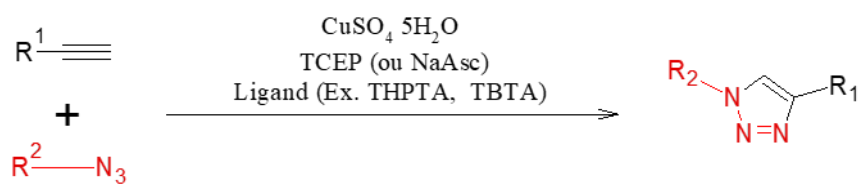


Schéma 7 : Mécanisme réactionnel de chimie click catalysée par le Cu(I) en présence du Cu(II), d'un ligand et d'un agent réducteur.

C'est cette réaction CuAAC qui permet alors le couplage d'un « tag » (fluorochrome, biotine) lors du marquage en 2 étapes (figure 17) exploité dans la stratégie ABPP.

Objectifs :

Le premier objectif de ce travail consiste en l'identification des cibles protéiques interagissant avec les esters de phtalate chez le poisson zèbre par l'utilisation d'une approche de profilage protéique basé sur l'affinité (AfBPP). Le DBP, l'un des esters de phtalate les plus utilisés et les plus retrouvés dans l'environnement (Gao and Wen, 2016; Net et al., 2015b) sera utilisé comme polluant modèle. Nous espérons à travers cet objectif, pouvoir identifier des cibles protéiques inconnues du DBP et donc contribuer à l'élucidation des mécanismes impliquant ce polluant à plus long terme.

L'interaction entre le DBP et les protéines étant réversible, le DBP ne pourra pas être utilisé directement pour l'identification de ses cibles protéiques, d'où l'intérêt de l'approche AfBPP. L'utilisation de l'AfBPP sera associée à la conception d'une sonde apparentée au ligand DBP capable d'assurer une liaison irréversible aux cibles protéiques d'une part, mais aussi capable d'autre part d'assurer la visualisation ou l'identification de ces cibles protéiques par des techniques analytique telles que le Western blot ou la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS). La fixation irréversible attendu sera strictement dépendante d'une irradiation UV de la sonde (sonde de photoaffinité).

Ce premier objectif est décliné en trois objectifs spécifiques :

- Concevoir et synthétiser des sondes de photoaffinité à utiliser dans l'approche AfBPP ;
- Tester et valider l'utilisation de ces sondes dans des expériences *in vitro* ;
- Utiliser les sondes validées pour l'identification des cibles protéiques du DBP dans le protéome du poisson zèbre ;

Le deuxième objectif de cette thèse est de cartographier les hydrolases à sérine du protéome de poisson zèbre, et d'identifier celles dont l'expression est perturbée suite à une exposition au DBP.

De nombreuses hypothèses suggèrent l'implication de certaines hydrolases à sérine dont l'acétylcholine estérase (AChE) dans les mécanismes liés à la toxicité des phtalates chez diverses espèces (Acey et al., 2002; Ghorpade et al., 2002; Jee et al., 2009; Xu et al., 2013a). Au-delà des cholinestérases (ChE) dont fait partie l'AChE, d'autres enzymes telles que la carboxylestérase et la trypsine, toutes des hydrolases à sérine, sont suspectées pour leurs rôles dans le mécanisme de toxicité liés aux xénobiotiques telles que les phtalates (Mahajan et al., 2019; Velki et al., 2017). Des hydrolases à sérine autres que celles citées ci-dessus seraient

peut-être impliquées dans le métabolisme du DBP chez l'espèce modèle *D. rerio*. Une évaluation approfondie du changement d'expression des SHs lors de l'exposition aux phtalates (DBP) pourrait aider à faire la lumière sur leurs modes d'action. Cette évaluation sera facilitée par l'utilisation d'une approche de protéomique ciblée de type ABPP qui utilise des sondes réactives aux hydrolases à sérine.

L'objectif principal 2 se décline en 2 objectifs spécifiques :

- Valider l'utilisation des sondes ABPP (disponible dans le commerce) avec le protéome de larves de poisson zèbre,
- Cartographier les hydrolases à sérine du poisson zèbre et identifier celles dont l'expression est dérégulée par une exposition au DBP.

Chapitre 2 : Matériels & Méthodes

II.1. Utilisation de l'approche « *Affinity based protein profiling* » (AfBPP)

II.1.1. Synthèse chimique des sondes

La synthèse des sondes a été réalisée par le groupe de recherche chimie biologique (dirigé par Dr A. Specht) de l'équipe de chimie et neurobiologie moléculaire (CNM) du laboratoire conception et application de molécules bioactives (CAMB, Université de Strasbourg). Fort d'une expérience dans le développement des outils photo-chimiques pour la photo-régulation d'activités biologiques et la détection de molécules, l'équipe du CNM, dans le cadre d'une collaboration, a réalisé toutes les synthèses chimiques des sondes qu'elle a ensuite mise à notre disposition pour les essais biologiques.

La figure 21 montre les 3 grandes étapes ayant conduit à la synthèse chimique des sondes. Le polluant modèle DBP a été choisi pour des raisons évoquées ci-dessus. Pour la fonctionnalisation des sondes, nous avons opté dans un premier temps pour l'utilisation de l'azide photoactivable. La synthèse des sondes avec ce groupe photoactivable étant relativement simple, elle nous a permis de disposer assez rapidement de certaines sondes nécessaires aux expériences de validation. Un deuxième lot de sonde a également été synthétisé pour pallier les problèmes rencontrés dans l'utilisation des sondes azide. Elles ont été fonctionnalisées avec la diazirine photoactivable. Le choix des groupes photoactivables et de leurs positionnements sur la structure du DBP a été fait en commun accord avec l'équipe de chimiste.

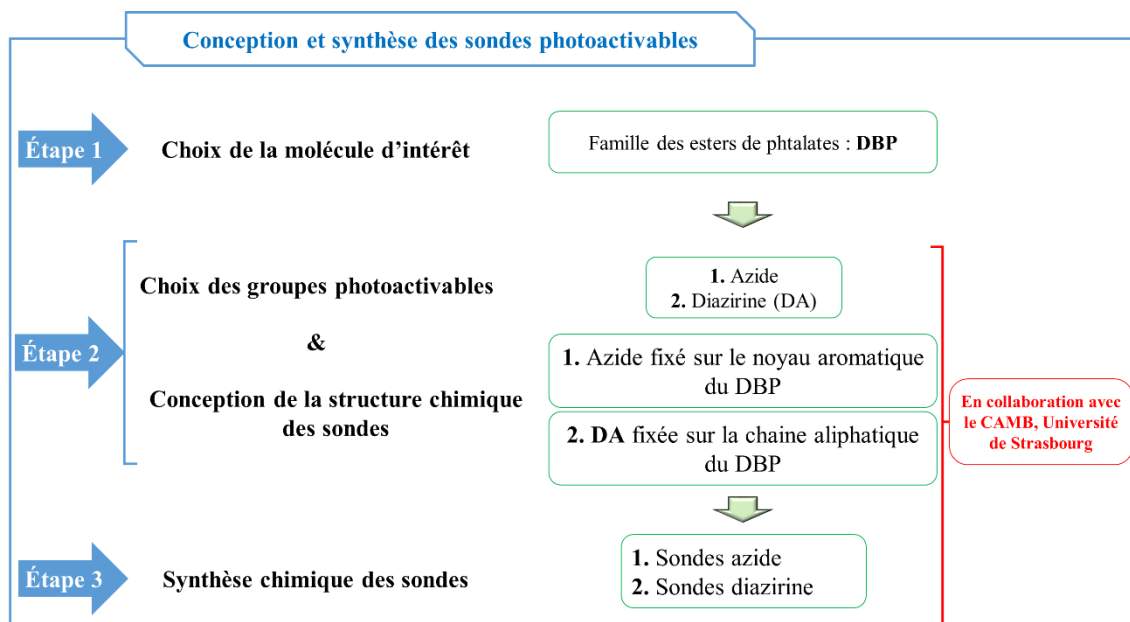


Figure 21 : Illustration des étapes liées à la conception et la synthèse des sondes photoactivables.

Cette partie concernant la synthèse des sondes est tirée du rapport de synthèse rédigé par Elodie Sprick dans le cadre de son stage de Master 2, sous la direction du Dr A. Specht. Les données ci-dessous présentent uniquement les réactions chimiques globales ayant été utilisées pour les synthèses. Les détails concernant chaque réaction (quantité, volume, temps et températures de réaction etc.) n'y sont pas abordés.

II.1.1.1. Synthèse de la sonde 1,2-bis(but-3-yn-1-yl) benzène-1,2-dicarboxylate (aDBP)

Il s'agit d'une sonde contrôle (témoin) sans groupe photoactivable mais portant des alcynes en bout de chaînes aliphatiques pour la ligation d'un tag. Elle a été obtenue par une réaction d'estérification entre l'acide phtalique et le 3-butyn-1-ol en présence du N-N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) et du 4-diméthylaminopyridine (DMAP) (schéma 8). Un produit final huileux, de couleur jaune pâle a été obtenu. Le rendement de la réaction était de 43%.



Schéma 8 : Synthèse de la sonde 1,2-bis(but-3-yn-1-yl) benzène-1,2-dicarboxylate (aDBP). Le rendement obtenu est de 43% après synthèse.

II.1.1.2. Synthèse des sondes de type aryl-azide

II.1.1.2.1. Sondes analogues au DBP

Deux sondes analogues au DBP portant un groupe photoactivable azide ont été synthétisées. L'azide a été positionné sur les carbones 3 et 4 du noyau aromatique respectivement pour les sondes 1,2-bis(but-3-yn-1-yl)3-azidobenzène-1,2-dicarboxylate (**3**) et 1,2-bis(but-3-yn-1-yl)4-azidobenzène-1,2-dicarboxylate (**6**). Pour une facilité de lecture ces sondes ont été codées comme suit : 3-N₃-aDBP pour la première sonde (**3**) et 4-N₃-aDBP pour la deuxième (**6**). Ces deux sondes portent également un alcyne au bout des deux chaînes aliphatiques.

Le schéma 9 résume les réactions de synthèse de ces deux sondes. La synthèse de chaque sonde a été faite en trois étapes à partir de l'acide 3-nitrophtalique commercial. La réaction d'obtention des produits **2** et **5** a été réalisée suivant la réaction décrite par Chiba et *al.*, (2017). Une estérification suivant la réaction décrite sur le schéma 8 a ensuite été réalisée pour obtenir

les produits finaux **3** et **6** avec des rendements respectifs de 41% et 81%. Les deux produits finaux ont un aspect jaune.

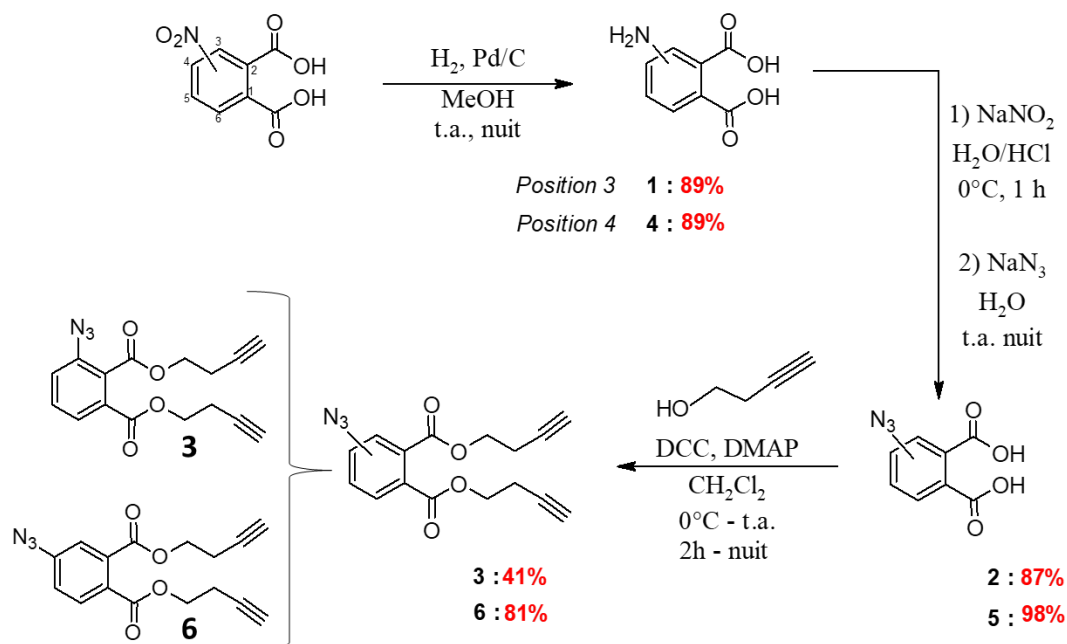


Schéma 9 : Synthèse des sondes de type aryl-azide ; 1,2-bis(but-3-yn-1-yl)3-azidobenzène-1,2-dicarboxylate (**3**) et 1,2-bis(but-3-yn-1-yl)4-azidobenzène-1,2-dicarboxylate (**6**). Les pourcentages en rouge indiquent les rendements obtenus.

II.1.1.2.2. Sondes analogues au MBP

Les sondes analogues au MBP ont été synthétisées dans le but de pouvoir cartographier aussi les cibles protéiques du MBP, le métabolite principal du DBP. Elles portent des groupes azide, et sont des intermédiaires des sondes **3** et **6** (schéma 9).

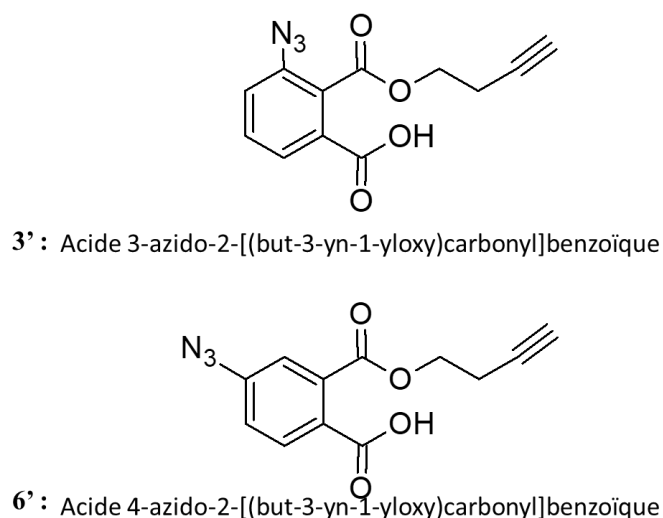


Schéma 10 : Structures des sondes azide analogues au MBP. Acide 3-azido-2-[(but-3-yn-1-yloxy)carbonyl]benzoïque (**3'**) et l'acide 4-azido-2-[(but-3-yn-1-yloxy)carbonyl]benzoïque (**6'**).

II.1.1.3. Synthèse des sondes couplées à la diazirine

Deux sondes analogues au DBP couplées à la diazirine photoactivable ont été synthétisées. La première, la but-3-yn-1-yl [3-(1,1-difluoroprop-2-yn-1-yl)-3H-diazirine-3-yl]méthyl benzène-1,2-dicarboxylate (**17**) porte une diazirine difluorée sur une chaîne aliphatique, et la deuxième, la bis{[3-(1,1-difluoroprop-2-yn-1-yl)-3H-diazirine-3-yl]méthyl} benzène-1,2-dicarboxylate (**19**) porte la diazirine difluorée sur les deux chaînes aliphatiques. Enfin une sonde analogue au MBP, l'acide 2-([3-(1,1-difluoroprop-2-yn-1-yl)-3H-diazirine-3-yl] méthoxy)carbonyl benzoïque (**18**) a également été synthétisée (schéma 13).

Les chaînes aliphatiques portant les diazirines difluorées ont un carbone supplémentaire pour permettre l'insertion du difluorure adjacent à la diazirine et à l'alcyne. Cet ajout rallonge légèrement les chaînes aliphatiques concernées (5 atomes de carbone au lieu de 4). La structure des sondes synthétisées avec la diazirine difluorée diffère donc légèrement de la structure du DBP aussi par le nombre de carbone sur les chaînes aliphatiques.

La synthèse des sondes diazirine est plus complexe que celle des sondes azide. Elle a nécessité une étape intermédiaire de synthèse de l'alcool difluoroalcyne diazirine **15**. La synthèse de la molécule **15** a été réalisée à partir de la réaction décrite par Chang *et al.*, (2018) et illustrée par le schéma 11. La molécule **15** a ensuite été utilisée pour obtenir les sondes d'intérêt (schémas 12, 13 et 14).

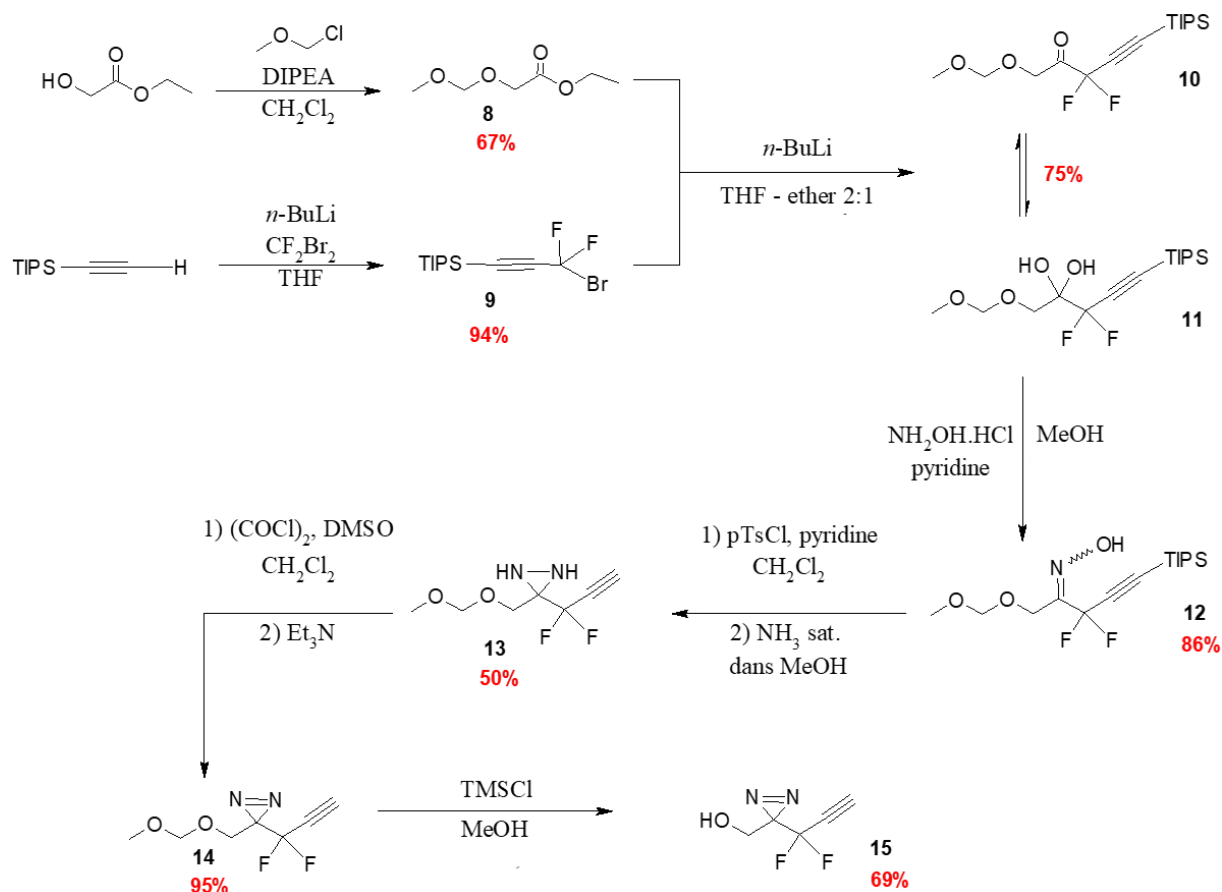


Schéma 11 : Synthèse de la molécule [3-(1,1-difluoroprop-2-yn-1-yl)-3H-diazirine-3-yl]méthanol (**15**). Les pourcentages en rouge indiquent les rendements obtenus.

II.1.1.3.1. Synthèse de la sonde diazirine-2 (but-3-yn-1-yl [3-(1,1-difluoroprop-2-yn-1-yl)-3H-diazirine-3-yl]méthyl benzène-1,2-dicarboxylate (**17**))

La synthèse de cette sonde a été réalisée en faisant réagir l'anhydride phtalique avec le 3-butyn-1-ol, en présence du DMAP et du triéthylamine (Zhang et al., 2018) pour donner l'acide 2-[(but-3-yn-1-yloxy)carbonyl]benzoïque (molécule **16**). La sonde diazirine **17** a ensuite été obtenue avec un rendement de 29% en faisant réagir la molécule **16** avec la **15** en présence du DCC et du DMAP (schéma 12). Le produit final a un aspect huileux.

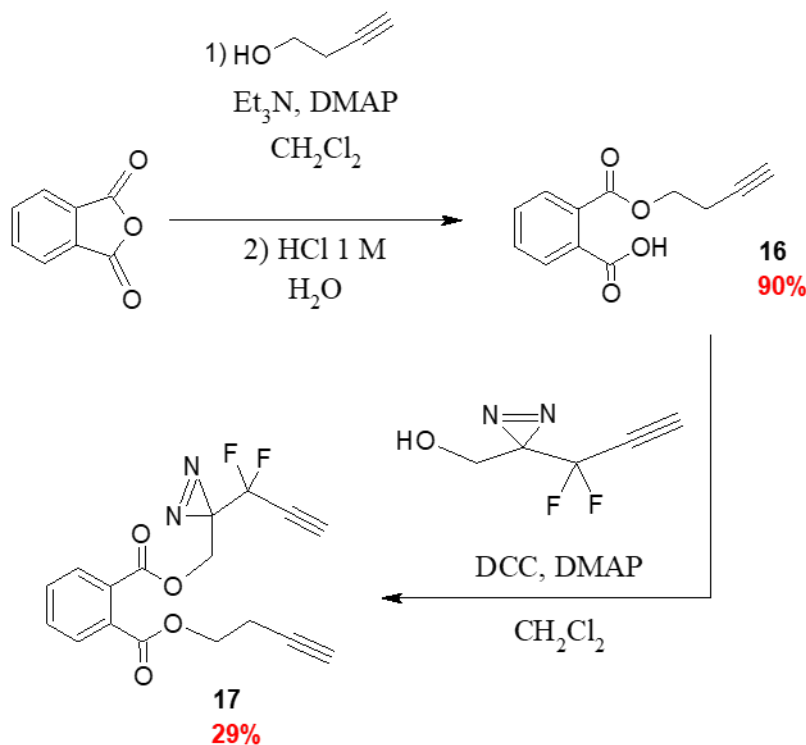


Schéma 12 : Synthèse de la sonde diazirine-2 (but-3-yn-1-yl [3-(1,1-difluoroprop-2-yn-1-yl)-3H-diazirine-3-yl]méthyl benzène-1,2-dicarboxylate (**17**)). Les pourcentages en rouge indiquent les rendements obtenus.

II.1.1.3.2. Synthèse de la sonde diazirine-1 (l'acide 2-([3-(1,1-difluoroprop-2-yn-1-yl)-3H-diazirine-3-yl]méthoxy)carbonyl)benzoïque (**18**))

Cette sonde a été synthétisée à partir de l'anhydride phtalique commercial et de la diazirine **15** avec un rendement de 22 % suivant la réaction illustrée sur le schéma 13. Le produit final a un aspect huileux.

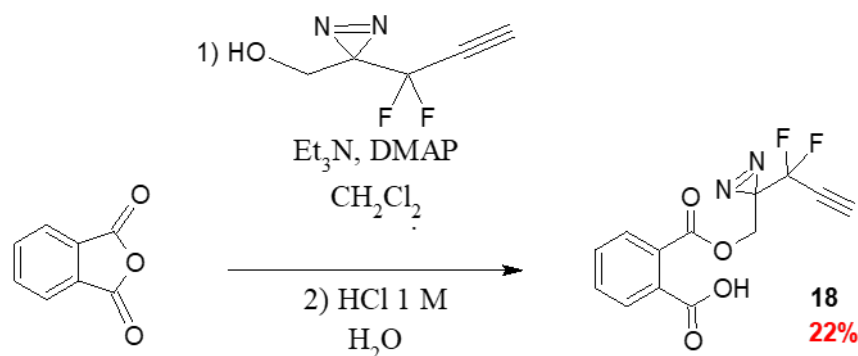


Schéma 13 : Synthèse de la sonde diazirine-1 (l'acide 2-([3-(1,1-difluoroprop-2-yn-1-yl)-3H-diazirine-3-yl]méthoxy)carbonyl)benzoïque (**18**)). Les 22% représente le rendement obtenu après synthèse.

II.1.1.3.3. Synthèse de la sonde bis{[3-(1,1-difluoroprop-2-yn-1-yl)-3H-diazirine-3-yl]méthyl} benzène-1,2-dicarboxylate (19) (diazirine-3)

La synthèse a été réalisée en faisant réagir de l'acide phtalique commercial et de la diazirine **15** en présence du DCC et du DMAP. La sonde **19** a été obtenue avec un rendement de 24 % (schéma 14). Le produit final a un aspect huileux.

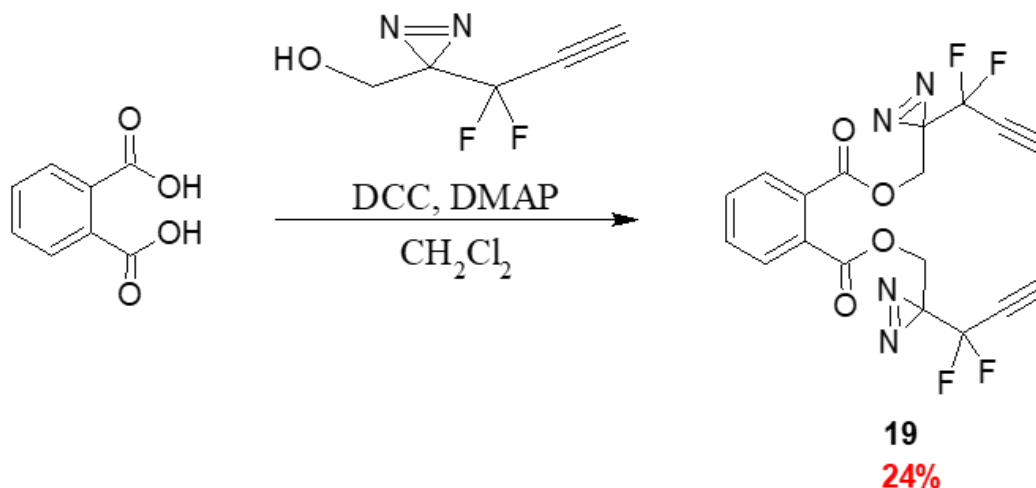


Schéma 14 : Synthèse de la sonde bis{[3-(1,1-difluoroprop-2-yn-1-yl)-3H-diazirine-3-yl]méthyl} benzène-1,2-dicarboxylate (**19**) (diazirine-3). Le rendement est de 24% après synthèse.

II.1.2. Validation *in vitro* des sondes photoactivables

II.1.2.1. Protocole générale de marquage de photoaffinité (protocole optimisé)

Le protocole général de marquage de photoaffinité utilisé a été adapté de la littérature scientifique (MacKinnon and Taunton, 2009a; Speers and Cravatt, 2009) et comprend 3 grandes étapes : le marquage de photoaffinité proprement dit, la ligation bioorthogonale et la visualisation des profils de protéines marquées (figure 22).

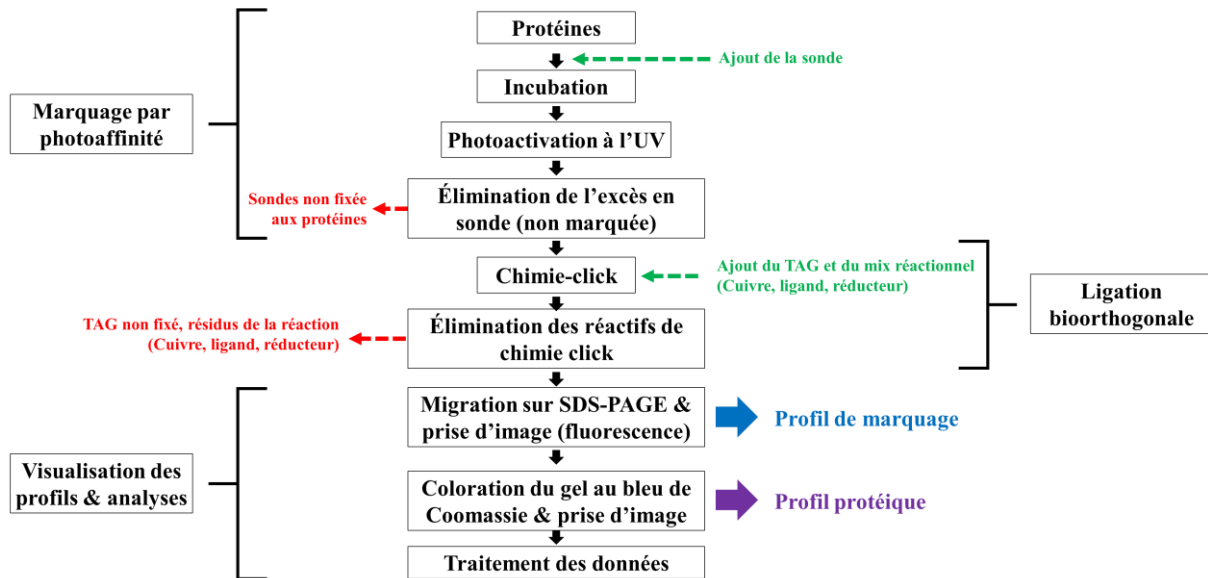


Figure 22 : Synthèse des différentes étapes de marquage de photoaffinité des protéines selon la méthode générale utilisée.

Les échantillons protéiques ont été préparés dans des tubes de 1,5 mL en mélangeant 139,25 μL de PBS (réf. n°P4417, Sigma Aldrich) et 9,25 μL de protéines (16 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; BSA, GST Pi). Le mélange a été homogénéisé au vortex (5 s) puis 1,5 μL de DMSO (réf. n°D4540 SigmaAldrich) ou de sonde (solubilisée dans du DMSO) ont été ajoutés aux échantillons qui ont été à nouveau homogénéisés au vortex (5 s) puis incubés à 25°C sous agitation douce (350 rpm) pendant 30 min. À cette étape, chaque échantillon contient environ 150 μg de protéine (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) et 1 % de DMSO (v: v). La concentration en sonde a été ajustée en fonction des essais (10 nM à 10 μM) tout en maintenant le volume de DMSO en dessous de 2 %. Après incubation, les échantillons à photoactiver ont été irradiés avec des UV (365 nm ; lampe UV ENF-260C/FE ; 230 volts, 50 HZ, 0,17 AMPS) pendant 15 min (figure 23) à 4°C. Les échantillons témoins sans irradiation ont été conservés à 4 °C à l'abri de la lumière.

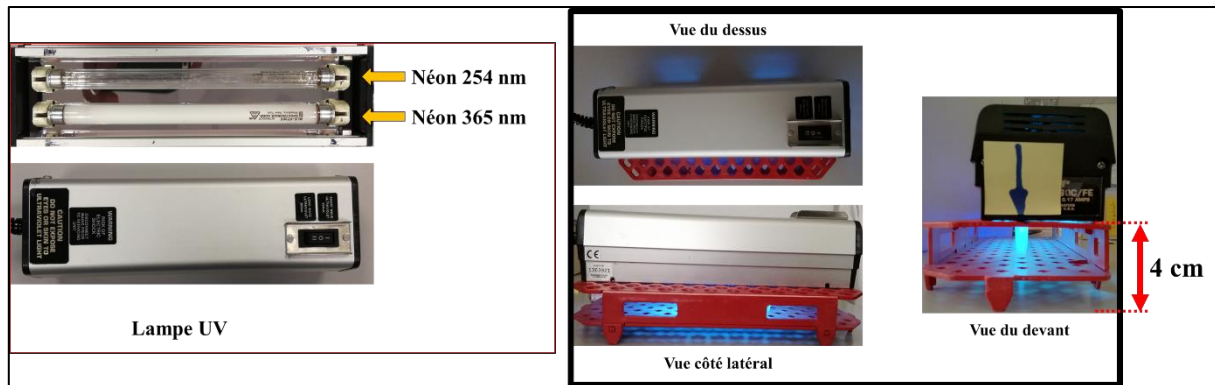


Figure 23 : Illustration de l'irradiation des tubes contenant les échantillons. À gauche, la lampe UV utilisée ; à droite, vue d'ensemble du système d'irradiation avec lampe allumée.

Après la photoactivation, l'excès de sonde non marquée a été éliminé par une précipitation à l'acétone froid. Pour cela, 4 volumes d'acétone froid (-20°C ; réf n°412502 Carlo Erba reagents) ont été ajoutés à chaque échantillon, le mélange a été homogénéisé au vortex (5 s) puis incubé à -20°C pendant 1h. Les échantillons ont ensuite été centrifugés pendant 10 min à $20000 \times g$, 4°C . Les protéines précipitées forment un culot blanc. Le surnageant a ensuite été enlevé par aspiration puis le culot a été mis à sécher pendant 10 min à température ambiante.

Pour la ligation du tag (TAMRA-azide) par chimie click, les culots ont été repris dans $97,5 \mu\text{L}$ de PBS, additionnés de $12,5 \mu\text{L}$ de SDS (10% ; v/v) puis homogénéisés au vortex (5 s). La solubilisation du culot a été finalisée dans un bain ultrason (Sonorex super RK 510 35 kHz ; 3 min), puis $2,5 \mu\text{L}$ de tag (réf n° T10182 ThermoFisher) ont été ajoutés ($10 \mu\text{M}$ finale). La réaction a été initiée en ajoutant $12,5 \mu\text{L}$ de mix 10X composé de 1 mM THPTA (réf n° 762342 – 100 MG Sigma Aldrich), 10 mM CuSO_4 (réf n°209198-100G Sigma Aldrich) et 10 mM TCEP (réf n°75259-1G Sigma Aldrich) pour un volume final de $125 \mu\text{L}$. L'ensemble a été homogénéisé puis incubé à 25°C pendant 1h sous agitation (350 rpm).

Après l'incubation, une précipitation des protéines a été réalisée en suivant le procédé décrit ci-dessous. Les culots ont été remis en solution dans du PBS. La solubilisation a été finalisée par sonication (3 min, 35 KHz, température ambiante). La séparation des protéines a été réalisée par migration sur gel dénaturant SDS-PAGE (Bio-Rad), selon le protocole du fournisseur. Dans le cadre de l'utilisation d'homogénat protéique de poisson zèbre, la quantité de protéine déposée est comprise entre 15 et $30 \mu\text{g}$. La prise d'image des gels a été réalisée à l'aide d'un appareil de type Typhoon™ FLA 9000 pour la fluorescence. Plusieurs photos ont été prises à chaque fois, en évitant une saturation des images. Après la prise d'image, les gels ont été déposés dans une solution de bleu de Coomassie (0,1% Bleu brillant Coomassie R250 ; 40% méthanol/10% acide acétique [v/v]) et mis sous agitation deux heures minimum puis décolorés dans une solution de

décoloration (40% méthanol/10% acide acétique [v/v]). L'image du gel coloré a été prise à l'aide d'un appareil de type Amersham™ Imager 600. La quantification de la fluorescence/colorimétrie des bandes protéiques à partir des photos prises a été réalisée à l'aide d'un logiciel d'analyse d'image (Image-J, GelAnalyser ou ImageQuant TL). Pour chaque échantillon, une normalisation de la fluorescence par rapport à la quantité de protéine (révélée par colorimétrie) a été faite.

II.2. Utilisation de l'approche « *Activity-based protein profiling* » (ABPP) sur des larves de poisson zèbre (5 jours post-fécondation)

Cette partie est consacrée à l'utilisation de l'approche ABPP pour cartographier les hydrolases à sérine impliquées dans le métabolisme du DBP chez les larves de poisson zèbre. Sommairement, des larves de poisson zèbre ont été exposées au DBP ou au DMSO (témoin sans DBP), les échantillons de larves destinés à la RT-qPCR et à la protéomique ont ensuite été prélevés. Trois types d'analyses ont été réalisées sur les échantillons (figure 24) : le profilage des SHs par APPB couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS), la mesure de l'expression des gènes cibles par RT-qPCR et la mesure de l'activité enzymatique de l'acétylcholine estérase (AChE). Les détails concernant chacune des étapes et des analyses sont décrits dans les paragraphes ci-dessous.

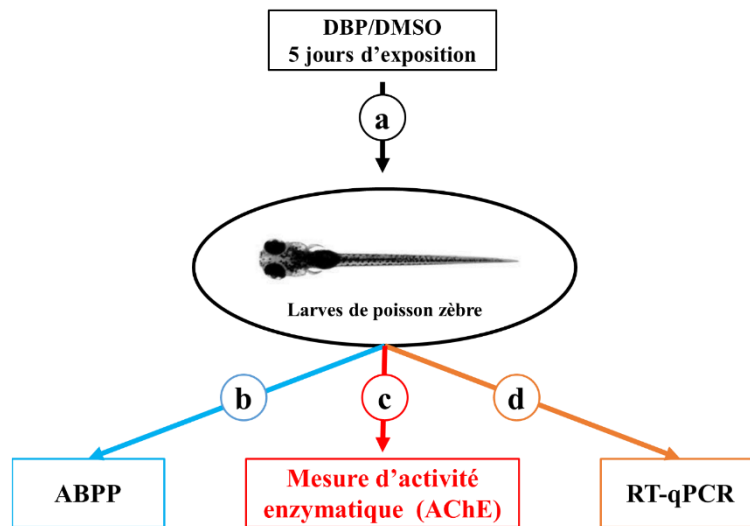


Figure 24 : Vue d'ensemble de la démarche expérimentale. (a) les larves de poisson zèbre sont exposées au DBP/DMSO pendant 5 jours ; (b), (c) et (d) indique les analyses effectuées sur les échantillons de larves après exposition au DBP.

II.2.1 Conditions d'exposition des œufs de poisson zèbre

II.2.1.1 Origine et maintenance des poissons

Les expériences *in vivo* ont été faites sur les premiers stades de vie des poissons zèbre, plus précisément du stade blastula (~4 h post-fécondation ; hpf) au stade larvaire (~124 hpf). Les œufs fécondés utilisés proviennent de parents adultes de type sauvage (souche AB). Ils ont été obtenus auprès d'un fournisseur (Luxembourg Centre for Systems Biomedicine, LCSB, Luxembourg). Les œufs fécondés ont été récupérés le jour du début d'exposition dans des flacons contenant du milieu poisson conforme à la norme NF EN ISO 7346 (294,0 mg/L CaCl₂, 2H₂O ; 123,3 mg/L MgSO₄, 7H₂O ; 63,0 mg/L NaHCO₃ et 5,5 mg/L KCL, le pH est de 7,5 ± 1) et ont fait l'objet d'un tri par observation sous une loupe binoculaire avant d'être utilisés pour les expositions afin d'éliminer les œufs non fécondés et ceux dont le développement se serait interrompu. Les conditions d'expositions étaient les suivantes : les cristallisoirs contenant les organismes ont été maintenus à 26°C dans un incubateur avec une photopériode de 14 h/10 h (lumière/obscurité, intensité lumineuse 20,0 μmol/m²/s). Compte-tenu de la durée d'exposition (4 – 124 hpf) les larves écloses n'ont pas été nourries.

II.2.1.2. Préparation des milieux d'exposition

Une solution mère (SM) de DBP (cat n°524980 ; Sigma Aldrich) à 10 mg/mL (DMSO) a d'abord été préparée, puis des dilutions ont été réalisées dans le milieu ISO à partir de cette SM pour l'obtention des autres concentrations à savoir : 2,0 et 0,1 mg/ml. Ces solutions ont été homogénéisées au vortex 2 fois 30 s à vitesse maximale. C'est en raison de ses propriétés hydrophobes que le DBP a d'abord été dissous dans du DMSO avant d'être dilué avec le milieu poisson ISO (désigné par « milieu » dans le reste du texte). Un volume de 250 mL de milieu a été réparti dans des flacons de 500 mL en verre, puis 12,5 μL des différentes concentrations de DBP ont été ajoutés (2 et 0,1 mg/mL). Les mélanges ont été mis à homogénéiser sur une table d'agitation pendant 15 min (116 rpm, 25°C). Toutes les solutions d'exposition y compris le « contrôle solvant » contiennent la même concentration de DMSO (0,005% ; v/v).

II.2.1.3. Dispositifs expérimentaux et exposition en présence de DBP

Pour obtenir les 4 réplicats par traitement nécessaires au plan d'expérience, 2 séries d'expositions de 2 réplicats chacun (15 jours séparent la première série de la deuxième) ont été réalisés (figure 25). Deux concentrations de DBP (5 et 100 μg/L ; notés C5 et C100) et un témoin avec solvant (DMSO) ont été testées.

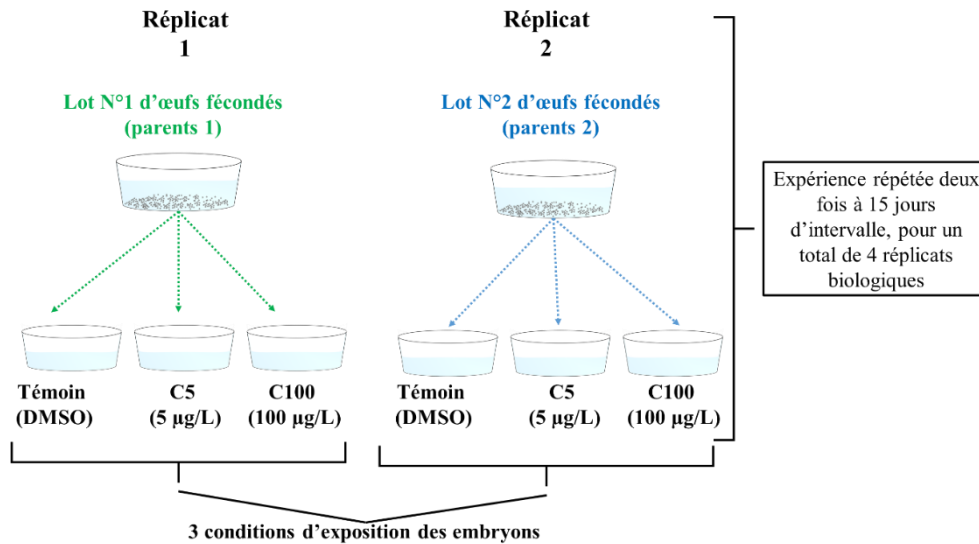


Figure 25 : Vue d'ensemble de l'expérience d'exposition des embryons de poisson zèbre au DBP.

Pour chacune des deux séries d'expositions, les œufs utilisés ont été obtenus à partir de 2 accouplements indépendants, mais conduits sur les mêmes reproducteurs. Les œufs (4 hpf) ont été transférés de manière aléatoire dans de petits cristallisoirs en verre (11 cm de diamètre, 6,5 cm de hauteur) contenant 250 mL de solution d'essai (milieu contaminé ou non par du DBP ou le DMSO pour le témoin solvant), à raison de 200 œufs par cristallisoir. Les cristallisoirs ont ensuite été placés dans un incubateur pour une durée de 120 h. Le renouvellement des milieux d'exposition a été réalisé toutes les 24 h, 80 % du milieu d'exposition ont été remplacés par le même milieu fraîchement préparé. Des observations ont été effectuées avant chaque renouvellement du milieu, afin de repérer des anomalies de croissance et de division cellulaire (retard de croissance, déformations), ainsi que les mortalités selon les critères décrits dans la norme OCDE 210 (2013). Les embryons concernés par ces anomalies (arrêt de la division cellulaire et mortalité) ont été systématiquement enlevés.

Après 120 h d'exposition (soit 124 hpf), 25 larves ont été prélevées aléatoirement et placées dans des microtubes pour les analyses de RT-qPCR. Le reste des larves a été placé dans un autre tube pour des analyses protéomiques. Les larves échantillonnées ont été congelées dans de l'azote liquide et conservées à -80°C jusqu'à analyse.

NB : le dosage des milieux d'exposition des larves n'a pas été réalisé. Les concentrations indiquées dans ce document sont des concentrations nominales. Cependant, les échantillons de milieu ont été prélevés au cours de l'exposition et conservés pour un dosage ultérieur.

II.2.2 Extraction des ARN totaux et reverse transcription

Les ARNs totaux des larves de poisson zèbre ont été extraits avec le kit RNeasy de QIAGEN® (réf. n°74104) conformément aux instructions du fournisseur avec une étape de digestion à la DNase I (réf. n°79254, Quiagen). La quantification et la vérification de la pureté des ARNs totaux ont été effectuées par mesure spectrophotométrique (NanoDrop™). Les échantillons présentant des ratio 260/280 et 230/280 inférieur à 1,8 ont été lavés par précipitation à l'éthanol. Le Nano Kit RNA 6000 (réf. n° 5067-1511 Agilent) a été utilisé pour vérifier l'intégrité des ARN ribosomiques par électrophorèse capillaire (BioAnalyseur 2100 Agilent) afin de s'assurer que les échantillons aient un « *Ratio of Integrity Number* » (RIN) compris entre 9 et 10. La reverse de transcription réverse (RT) a été réalisée à partir de 1 µg d'ARN totaux grâce à l'utilisation de la SuperScript® IV Reverse Transcriptase de Invitrogen (Life Science) conformément au protocole du fournisseur. Les cDNA générés ont été conservés à – 20°C jusqu'à utilisation.

Les gènes cibles ont été choisis à partir de données issues de la littérature. Au total, 2 gènes de ménages et 3 gènes d'intérêt ont été choisis. Les gènes d'intérêt ciblés sont ceux dont l'expression est modifiée en présence d'un CPE de type phtalate. Il s'agit de la vitellogénine (*vtg*) (Maradonna et al., 2013; Zhu et al., 2016), de la 17β-hydroxysteroid dehydrogenase (Zhu et al., 2016), et de l'Acyl-coenzyme-A-oxidase (Uren-Webster et al., 2010b). Pour la normalisation des résultats, 2 gènes de ménages reconnus pour leur stabilité ont été sélectionnés : *rpl13a* (Ribosomal protein L13a,) et *ef1α* (elongation factor 1α) (Lang et al., 2016). Les séquences d'amorces spécifiques des différents gènes (Tableau 4) ont été extraites de la littérature pour les gènes *ef1-α*, *rpl13a*, *vtg7*, tandis que pour les gènes *17b-hsd 12a* et *acox1* les amorces ont été conçues avec les outils de bio-informatique Beacon Designer™ (PREMIER Biosoft) et « Primer3Plus », puis produites par Eurofins Genomics.

Les couples d'amorces utilisés ont une efficacité PCR comprise entre 94% et 105%. Le « mix » réactionnel des PCR est composé de 250 nM d'amorces (« reverse » et « forward »), du Mix FAST SYBR® green 1X (réf. n° 4385610 ThermoFisher) et de 20 ng de cDNA. Des réactions contrôles sans cDNA ont également été réalisées (No Template Control, NTC). Les qPCR ont été réalisées avec l'équipement StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) en utilisant le programme FAST (présence d'une étape de courbe de fusion avec la programmation associée). Les valeurs de CT de chaque gène d'intérêt ont été normalisées par rapport à l'expression des gènes de ménage *rpl13a* et *ef1α* (en utilisant la moyenne géométrique

des 2 gènes), la quantification relative a été réalisée en utilisant la méthode $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen, 2001).

Tableau IV : Séquences d’amorces des gènes testés dans cette étude.

Gènes	Amorces (5' – 3')	Amplicon (pb)
Elongation factor 1 alpha (<i>efl-α</i>) (Lang et al., 2016)	Foward : TACAAATGCGGTGGAATCGAC Reverse : GTCAGCCTGAGAAGTACCAGT	248
Ribosomal protein L 13a (<i>rpl13a</i>) (Lang et al., 2016)	Foward : TCTGGAGGACTGTAAGAGGTATGC Reverse : AGACGCACAATCTTGAGAGCAG	149
Vitellogénine (<i>vlg7</i>) (Maradonna et al., 2013)	Foward : GCCAAAAAGCTGGGTAAACA Reverse : AGTTCCGTCTGGATTGATGG	210
Acyl-coenzyme-A-oxidase 1 (<i>acox-1</i>)	Foward : TCCATGAGTCCCACAACAAG Reverse : CCTTTCTTCCCCTTTCTTGC	75
17β-hydroxysteroid dehydrogenase (<i>17b-hsd 12a</i>)	Foward : ACCAGACCAACGGCTATTTC Reverse : ATCGCAGTTTTCTCCTCCTG	141

II.2.3. Marquage avec la sonde à sérine

Pour rappel, l’objectif ici est d’utiliser des sondes basées sur l’activité pour marquer et identifier les hydrolases à sérine du protéome de poisson zèbre. Un fractionnement protéique est préconisé dans le cadre de l’utilisation de l’approche ABPP, pour maximiser la réaction de la sonde avec un large panel de SHs (Dolui et al., 2020; Elahi et al., 2019). Les échantillons de larves destinés aux analyses protéomiques ont donc été utilisés pour ce fractionnement suivant le protocole ci-dessous.

II.2.3.1. Fractionnement protéique

Le tampon de lyse qui a été utilisé est composé de 25 mM Tris•HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1 mM EDTA, 5% glycérol. Ce tampon a été additionné d’un inhibiteur de phosphatase (1:100 v/v, réf. n 78450, Thermo Fisher) avant toute utilisation. Toutes les étapes relatives au fractionnement ont été réalisées à 4°C (broyage, centrifugation), les tubes et les Potter utilisés ont également été pré-refroidis à 4°C. Les échantillons (larves de poisson zèbre) dépourvus de milieu résiduel ont été broyés sur glace avec un Potter (40 rotations) en présence d’environ 50 mg de billes en verre (réf. n° G8772 Sigma Aldrich) puis 50 µL de tampon de lyse ont été ajoutés. Les échantillons ont été repris avec 450 µL de tampon de lyse puis broyés à

nouveau avec un bead-beater (2 fois 60 s ; puissance = 30 Hz, avec une pause de 60 s dans la glace entre les deux broyages). Une première centrifugation a été réalisée à 1500 x g pendant 10 min à 4°C pour l'obtention du lysat brut. Les fractions solubles et membranaires ont été obtenues par ultracentrifugation du lysat brut à 100000 x g pendant 60 min à 4°C (avec un rotor angulaire Thermo Scientific Fiberlite F50L-24x1.5).

Les surnageants (fraction soluble) ont été mis dans un tube pré-refroidi. Un aliquot de 10 µL a été prélevé pour le dosage protéique, le reste des échantillons a été rapidement congelé dans l'azote liquide puis conservé à -80°C jusqu'à utilisation. Pour l'obtention de la fraction insoluble, le culot a été remis en suspension en ajoutant 150 µL de tampon de lyse. Un volume de 5 µL de la fraction membranaire a été prélevé pour le dosage protéique. Le reste (~145 µL) a été transféré dans un tube pré-refroidi puis congelé comme précédemment. Le dosage des protéines a été réalisé avec le kit Pierce™ Rapid Gold BCA Protein Assay (réf n° A53225, ThermoFisher) suivant les instructions du fournisseur.

II.2.3.2. Marquage avec les sondes à sérines TAMRA-FP et dB-FP

II.2.3.2.1. Détermination des conditions optimales d'utilisation de sondes à sérine TAMRA-FP (cat n°88318, Thermo Fisher)

Afin de déterminer les conditions optimales d'utilisation des sondes, nous avons effectué deux types d'expérience. Dans une première expérience, nous avons testé des concentrations croissantes en sonde afin de déterminer la concentration optimale à utiliser. Nous avons ensuite réalisé une cinétique du temps d'incubation afin de déterminer le temps optimal d'incubation des sondes avec les protéines.

- **Concentration optimale en sonde** : 40 µg de fraction protéique apportés dans un volume de 20 µL ont été incubées à 25°C pendant 30 min avec des concentrations croissantes en sondes TAMRA-FP (5% v/v DMSO - 0,5 - 2 - 3,5 et 5 µM). Les réactions ont été arrêtées par ajout de 7 µL de Laemmli Buffer 4X (réf. n° 1610747 BIO RAD) suivi d'une incubation à 95°C pendant 5 min. Après incubation, 20 µL de chaque échantillon (15/30 µg) ont ensuite été mis à migrer sur gel SDS-PAGE.
- **Temps d'incubation optimal** : 40 µg de fraction protéique apportés dans un volume de 20 µL ont été incubées avec 2 µM en sonde TAMRA-FP (5% v/v DMSO) à différents temps (0,5 - 1 - 3 - 5 - 15 - 30 et 60 min). Les réactions ont été arrêtées comme précédemment et les échantillons mis à migrer sur gel SDS-PAGE.

La visualisation des profils de marquage fluorescent des hydrolases à sérine a été réalisée par balayage du gel à 532 nm avec l'imageur Typhoon™ FLA 9000 (GE Healthcare Life Science). Les gels ont ensuite été colorés avec du bleu de Coomassie suivi d'un scan pour la prise d'image comme indiqué pour les sondes photoactivables.

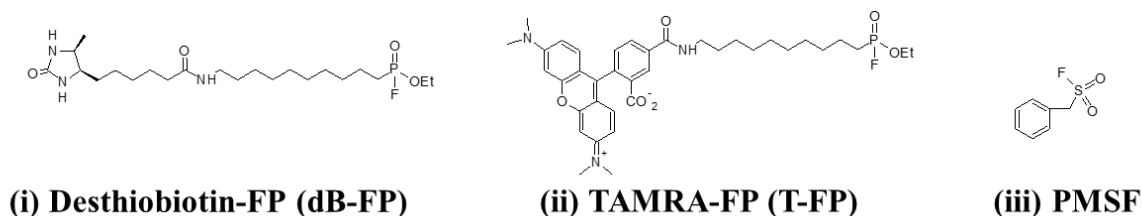


Schéma 15: Structure chimique des sondes à sérine (i, ii) et de l'inhibiteur des hydrolases à sérine (iii)

II.2.3.2.2. Marquage compétitif avec les sondes

Plusieurs expériences de marquage compétitif ont été réalisées (figure 26). Elles ont pour but de vérifier si les deux sondes FP se fixent aux mêmes cibles (réactivité spécifique du FP), de s'assurer que les cibles protéiques marquées sont des SHs et enfin d'identifier les enzymes interagissant avec le DBP.

- Pour la réactivité spécifique, la compétition a été réalisée entre la sonde dB-FP (réf. n°88317, ThermoFisher) et la T-FP,
- Pour la spécificité de fixation aux SHs, la compétition a été réalisée entre un inhibiteur irréversible connu des hydrolases à sérine, le Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF; réf. n°P7626, Sigma Aldrich) et la sonde T-FP,
- Pour l'identification des SHs inhibées par le DBP, la compétition a été réalisée entre le DBP et T-FP (1 ou 2 μM). Une large gamme de concentration en DBP a été testée (0 à 30 mM),

50 μL de protéines à 1 mg/mL (fractions soluble) ont été pré-incubées avec le compétiteur PMSF (2 mM), DBP (0 à 30 mM) ou le DMSO (control) pendant 15 min à 25°C. Après cette incubation, 2 μM de sonde T-FP ont été ajoutés dans chaque mélange réactionnel puis les échantillons ont été incubés à 25°C pendant 15 min supplémentaires. La réaction a ensuite été arrêtée par ajout de 17 μL de Laemmli buffer 4X suivi de la dénaturation à la chaleur (95°C, 5 min) ; 20 μL de protéines par échantillon (15 μg) ont ensuite été séparés sur SDS-PAGE (4-20 % Bio Rad). La visualisation des profils d'enzymes marquées a été réalisée par balayage du gel

à 532 nm avec l'imageur Typhoon™ FLA 9000 (GE Healthcare Life Science). Les gels ont ensuite été colorés avec du bleu de Coomassie suivi d'un scan pour la prise d'image.

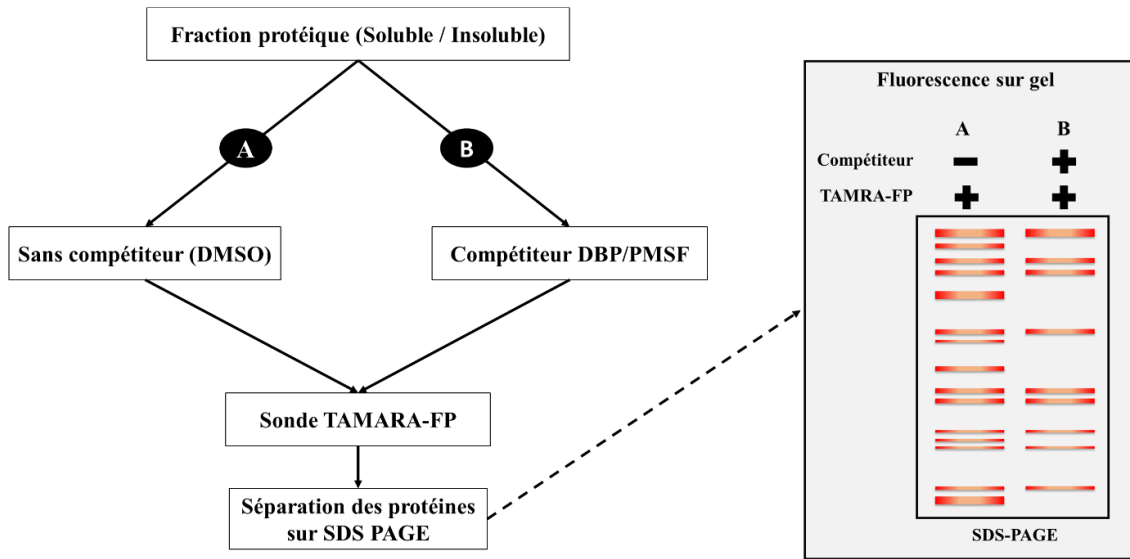


Figure 26 : Illustration de l'expérience de compétition entre la sonde TAMARA-FP (T-FP) et le DBP/PMSF/DMSO

II.2.3.2.3. Marquage avec la dB-FP et purification sur billes magnétiques des protéines desthiobiotinylées

Pour cette étape de marquage des fractions protéiques, la sonde ActivX Desthiobiotine-FP, fluorophosphate conjuguée à la desthiobiotine (dB-FP) a été utilisée (schéma 15). Les fractions solubles et insolubles préparées à partir des larves exposées ont été utilisées.

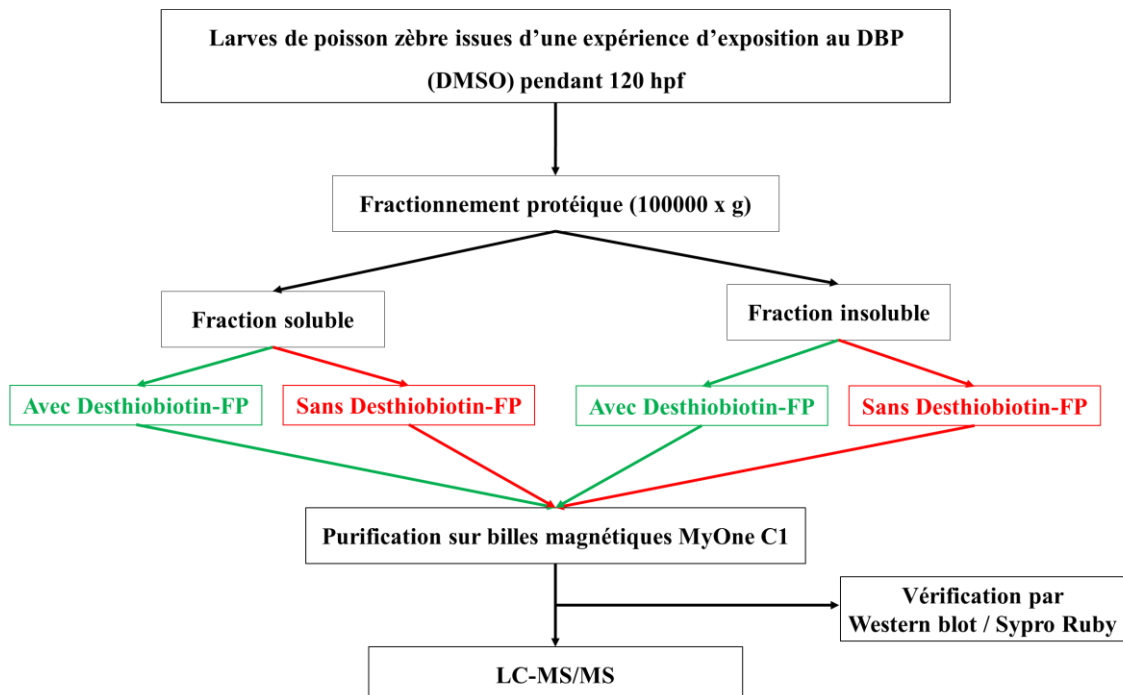


Figure 27 : Illustration de la démarche analytique utilisée pour l'identification des SHs dans le protéome des larves de poisson zèbre.

- **Protocole général de marquage avec la sonde dB-FP (cat n° 88317, Thermo Fisher)**

Les échantillons (fractions solubles/insolubles) conservés -80°C ont été décongelés dans la glace. Pour chacune des conditions (Témoin, C5 et C100 ; respectivement témoin DMSO, 5 $\mu\text{g/L}$ et 100 $\mu\text{g/L}$ de DBP), les protéines (650 μg et 150 μg , respectivement pour les fractions solubles et insolubles) ont été incubées avec 2% de DMSO (témoin sans sonde) ou 2 μM de sondes (2% DMSO) dans un volume final de 325 μL . L'incubation a été réalisée à 25°C pendant 60 min suivant les recommandations de ThermoScientific ; la réaction a été arrêtée par un ajout de 8 μL de 20% SDS ($\sim 0,5\%$ finale v/v) suivi par une dénaturation à 95°C pendant 5 min (Li et al., 2013). L'excès de sonde a été éliminé par une précipitation à l'acétone froid comme décrit pour les sondes photoactivables. Les échantillons ont été incubés à -20°C pendant 60 min avec de l'acétone froid (4 vol). Une centrifugation à 20000 x g (4°C) a ensuite été réalisée pour récupérer le culot contenant les protéines précipitées. Les culots ont été mis à sécher à température ambiante pendant 10 min. Les protéines ont ensuite été solubilisées avec 1 mL de PBS additionné de NaCl (150 mM) et de SDS (0,05% v/v) (PBS-NaCl-SDS). Pour les fractions solubles, 300 μL de PBS-NaCl-SDS ont été utilisées. Les échantillons ont ensuite été placés à 4°C avant l'ajout des billes magnétiques (voir ci-dessous). Un aliquot de 50 μL a été prélevé pour une analyse par Western blot (**Input**).

- **Purification des adduits desthiobiotinylés sur billes magnétiques de Streptavidin**

La purification des protéines marquées par la sonde à sérine dB-FP a été réalisée avec des billes magnétique couplées à la streptavidine (MyOneTM streptavidin C1, Cat n° 65992, ThermoFisher). Cette étape a fait l'objet d'une optimisation pour déterminer la quantité de billes à utiliser et définir les conditions de lavage et d'élution. Le protocole décrit ci-dessous est celui utilisé après optimisation.

Une quantité de 0,5 mg de billes a été utilisée pour la purification des échantillons provenant de la fraction soluble, et de 0,1 mg pour ceux provenant de la fraction insoluble. Les billes ont été prélevées d'une solution stock à 10 mg/ml, 50 μL et 10 μL de billes ont été prélevées respectivement pour la purification des fractions solubles et insolubles. Les billes ont d'abord été lavées avec un tampon de lavage (300 μL) composé d'un mélange de PBS et de NaCl (150 mM). Trois lavages successifs ont été effectués, puis les échantillons ont été ajoutés aux billes pour une incubation d'une nuit à 4°C . Le lendemain, les tubes contenant les échantillons ont été mis sur un portoir magnétique (cat n° 12321D Thermo Fisher) pendant 3 min pour la séparation des billes du surnageant. Un aliquot de 50 μL du **surnageant** a été prélevé dans un

nouveau tube pour une vérification de la purification par Western blot. Les billes ont de nouveau été lavées 2 fois avec le tampon de lavage puis une dernière fois avec du PBS (300 µL /lavage). Un changement de tube a été effectué avant le dernier lavage pour réduire les fixations aspécifiques (billes/protéines adsorbées sur la paroi des tubes). L'élution des cibles protéiques fixées aux billes a été réalisée en ajoutant 50 µL de tampon d'élution (50 mM Tris HCl pH 8,5, 2 % SDS v/v, 10 mM TCEP) aux billes lavées en prenant soin de bien mettre les billes en suspension avec une micropipette. Les échantillons ont été incubés à 95°C pendant 5 min sous agitation à 650 rpm (HulaMixer™ réf. n° 15920D ThermoFisher Scientific). Les billes ont été séparées de l'éluât sur le portoir magnétique pendant 2 min. L'**éluât** a été prélevé dans un nouveau tube. Pour la fraction soluble, les mêmes étapes ont été mises en œuvre, mais avec 0,1 mg de billes pour la purification et 25 µL de tampon pour l'élution.

- **Vérification de la purification par coloration au Sypro Ruby et Western blot**

Des échantillons ont été prélevés à différentes étapes de la purification pour des vérifications (input, surnageant et éluât). La séparation des protéines a été réalisée par migration sur 2 gels dénaturant SDS-PAGE (Bio-Rad). Le 1^{er} gel a été coloré au Sypro Ruby (cat n° S12000, ThermoFisher) suivant le protocole du fournisseur puis la photo du gel a été prise avec un appareil Typhoon™ FLA 9000. Le 2^{ème} gel a été utilisé pour un Western blot visant à visualiser les protéines desthiobiotinylées. Le protocole utilisé est inspiré de Hung et al., (2016, 2014), il fait appel à l'utilisation d'un conjugué de la streptavidine à la peroxydase de raifort (Cat n° S-911 ThermoFisher). Pour cela, un transfert semi-sec sur membrane de nitrocellulose à température ambiante a d'abord été réalisé (0,8 mA/cm² - 1 h), suivi d'une coloration au rouge Ponceau pendant 10 min (0,1% Rouge Ponceau, 5% acide acétique). La membrane a ensuite été bloquée 1h à température ambiante dans 10 mL de TBS-Tween 0,1%, 3% BSA (v/v) sur un « roller mixer ». Après le blocage, 3 µL de streptavidine-HRP à 1 mg/mL (soit une dilution au 1/3000) ont été ajoutés puis le tube a été remis sur le « roller mixer » à 4°C toute la nuit. Le lendemain, la membrane a été lavée 4 fois 5 min avec 10 mL de TBS-Tween 0,1 %. La révélation a été faite en incubant la membrane dans un mix d'ECL (cat n° GERPN2232 Sigma Aldrich) pendant 60 sec ; l'image de la membrane a été immédiatement prise avec un appareil de chimiluminescence (Amersham™ Imager 600).

NB : Le matériel et les méthodes associés à l'analyse par LC-MS/MS sont détaillés dans la publication "First identification of a large set of serine hydrolases by activity-based protein profiling in dibutyl phthalate-exposed zebrafish larvae" soumise dans "Zebrafish" et présentée en annexe 1.

Chapitre 3 : Résultats

III.1. Utilisation des sondes photoactivables (AfBPP)

III.1.1. Mise au point d'un protocole standard de marquage de photoaffinité

On retrouve dans la littérature scientifique une diversité de protocoles de marquage de photoaffinité couplée à une ligation bioorthogonale. Afin de garantir des résultats fiables et reproductibles, nous avons mis au point un protocole de marquage optimisé en nous inspirant des protocoles décrits par MacKinnon and Taunton, (2009), Speers and Cravatt, (2009) et Presolski *et al.*, (2011). Pour rappel, les grandes étapes du marquage de photoaffinité illustrées sur la figure 22 (page 86 dans le chapitre matériels et méthodes) comprennent : le marquage par photoaffinité proprement dit, la ligation bioorthogonale d'un tag (par CuAAC ou chimie click) et la visualisation des protéines marquées après séparation sur un gel SDS-PAGE. Les paragraphes suivants présentent les résultats clés des conditions expérimentales optimisées pour la mise au point du protocole.

III.1.1.1. Choix des protéines modèles pour les marquages *in vitro*

L'approche AfBPP fait appel à l'utilisation d'une sonde photoactivable analogue d'un ligand pour lier par covalence ses cibles protéiques. Dans notre cas, nous avons d'abord fait le choix d'utiliser deux protéines modèles, l'albumine sérique bovine (BSA) et la glutathion S-transférase Pi (GST Pi), connus pour interagir avec les phtalates dont le DBP (Law and Moody, 1991; Zhang and Liu, 2012). Nous partons du postulat que ces deux protéines présentent des sites de fixation spécifique au ligand DBP ; celui de la BSA est d'ailleurs bien décrit et caractérisé (Wang *et al.*, 2020; Zhang and Liu, 2012). Ces choix sont également motivés par la disponibilité de la protéine BSA purifiée dans le commerce (réf. A6003, Sigma Aldrich) et de la GST Pi recombinante humaine exprimée sous forme recombinante et purifiée dans notre laboratoire.

III.1.1.2. Marquage par photoaffinité : choix de la température, du temps d'incubation et de la longueur d'onde d'irradiation des sondes

III.1.1.2.1. Température et temps d'incubation du mélange protéine – sonde

De manière classique, la température d'incubation est comprise entre 4°C et 37°C et le temps d'incubation entre 15 et 60 min (Hein *et al.*, 2005; MacKinnon and Taunton, 2009). Ces deux paramètres peuvent nécessiter dans certains cas une optimisation. Dans le cadre des essais préliminaires, aucune amélioration significative du marquage de la BSA n'a été observé entre 4°C et 25°C pour la température d'incubation et entre 15 min et 30 min pour le temps

d'incubation (résultats non montrés). Une incubation du mélange protéine plus sonde pendant 30 min à 25°C a été privilégiée sauf indication contraire (West et al., 2021).

III.1.1.2.2. Longueur d'onde d'irradiation du mélange protéine plus sonde

Comme mentionné plus haut, la longueur d'onde nécessaire pour générer les espèces réactives est comprise entre 254 nm et 400 nm pour l'azide et entre 350 nm et 365 nm pour la diazirine. Les sondes azide qui sont les premières sondes synthétisées et donc disponibles ont été utilisées pour le test de photosensibilité par mesure du spectre d'absorption. La longueur d'onde d'absorption maximale des azides est inférieure à 300 nm. Cependant, cette longueur d'onde peut causer des dommages aux systèmes biologiques (Geurink et al., 2011), donc deux longueurs d'onde ont été testées afin de trouver le meilleur compromis : 254 nm et 365 nm.

Afin de mieux apprécier la photosensibilité des sondes, le DBP (ligand d'intérêt) et la sonde aDBP (sonde sans groupe photoactivable) ont été utilisés comme témoins. La figure 27 illustre les spectres d'absorption UV de la sonde 3-N₃-aDBP en absence et présence d'une irradiation à la lumière UV à différents temps. Les spectres d'absorption mesurés après irradiation à 254 nm varient pour le DBP ainsi que pour la sonde témoin (aDBP), ainsi que de manière encore plus marquée pour la sonde photoactivable (3-N₃-aDBP) (figure 28, A). Ces variations de spectre à 254 nm du DBP et de l'aDBP suggèrent des modifications dans leurs structures chimiques. Ces modifications sont à dissocier de celle attendue pour les sondes photoactivables et peuvent être assimilées à une photo-dégradation du DBP (Lau et al., 2005) et de l'aDBP à 254 nm. Par contre, lorsque l'irradiation a lieu à 365 nm, le profil des spectres d'absorption ne varie quasiment pas pour le DBP et la sonde témoin (aDBP). Seul le spectre de la sonde photoactivable varie après irradiation (figure 28, B). Ces observations sont conformes à ce qui est attendu, c'est-à-dire une modification du spectre qui peut être assimilée à la présence d'une espèce réactive générée par l'irradiation à l'UV. L'absence de modification des spectres du DBP et de l'aDBP à 365 nm suggère une stabilité de ces molécules à cette longueur d'onde et donc une dégradation très négligeable. De plus, le spectre de la sonde 3-N₃-aDBP ne varie quasiment pas après 20 min et 30 min d'irradiation, ce qui suggère qu'une prolongation du temps d'irradiation au-delà de 10 min (temps minimum testé) n'a pas d'impact sur la photoactivation dans ces conditions. La modification du spectre d'absorption sous irradiation UV observée serait due à la présence d'espèce hautement énergétique et hautement réactive (nitrene) mais aussi à la présence d'intermédiaires provoquée par un réarrangement du noyau aromatique en benzazirine ou ketenimine (Buchmueller et al., 2003; Kotzyba-Hibert et al., 1995).

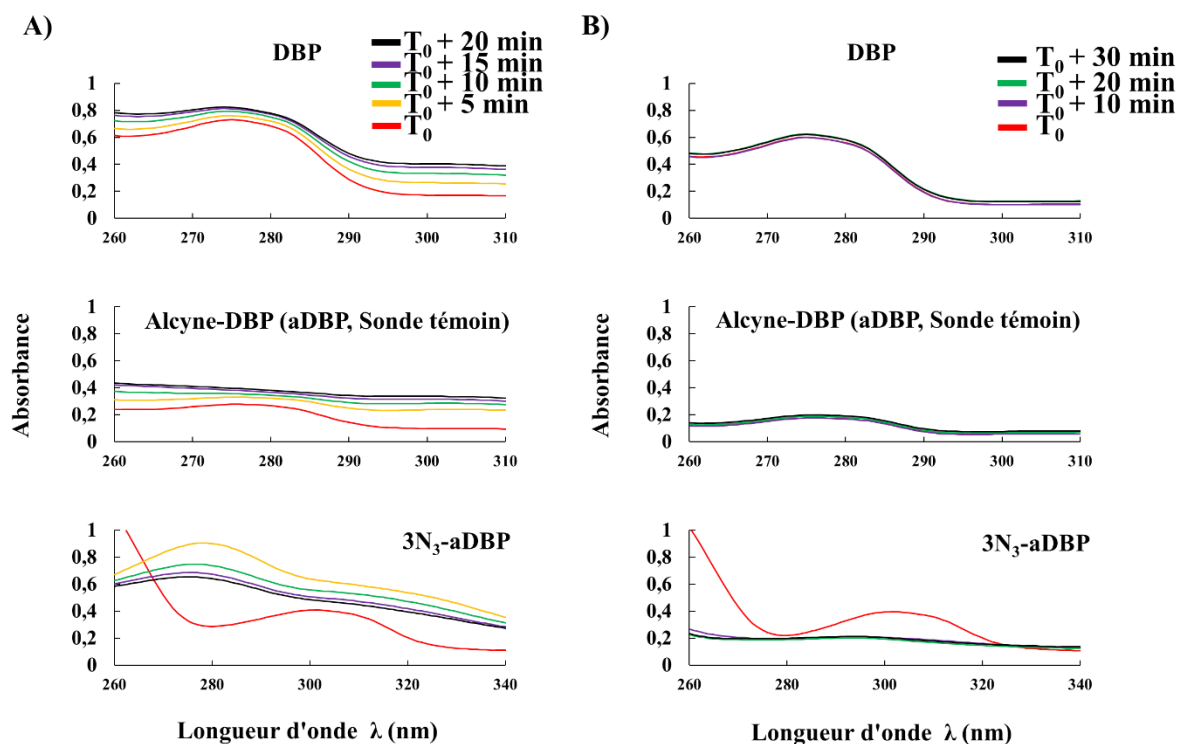


Figure 28 : Spectres d'absorption de la sonde 3-N₃-aDBP avec ou sans UV à 254 nm (A) et 365 nm (B). Une concentration de 125 μM de chacun des composés (DBP, aDBP et 3-N₃-aDBP) a été préparée dans de l'éthanol absolu puis les spectres d'absorption ont été déterminés sans et avec irradiation UV pendant les temps indiqués.

Compte tenu des résultats obtenus avec une irradiation à 254 nm, de la photodégradation du DBP à cette longueur d'onde (Kaneco et al., 2006; Lau et al., 2005) et des dommages qu'elle peut induire sur les biomolécules (protéines notamment), le choix s'est porté sur une photoactivation des sondes en présence des protéines à 365 nm. Un temps optimal de 15 min a de plus été retenu en prenant en compte la puissance de la lampe UV utilisée (< 100 Watts) (MacKinnon and Taunton, 2009) et les essais de stabilité des spectres du DBP montrés ci-dessus pour ces expériences de marquage de photoaffinité des protéines.

Il faut souligner que ces essais de photosensibilité avec la mesure des spectres d'absorption n'ont pas été réalisés de manière systématique sur toutes les sondes apparentées. Nous avons privilégié des marquages *in vitro* directement entre protéines modèles et sondes pour les tests ultérieurs de photosensibilité.

III.1.1.3. Elimination des sondes libres non fixées aux cibles protéiques

Après la photoactivation, une extraction des sondes non fixées aux récepteurs protéiques (sondes libre) est préconisée (MacKinnon and Taunton, 2009) afin de privilégier la ligation exclusive des tags aux adduits formés (sonde-protéines) lors de la réaction de chimie click

(CuAAC). Dans notre cas, cette étape est capitale dans le sens où les sondes azide portent à la fois un azide et un alcyne. En occultant l'étape d'élimination des sondes libres, la chimie click pourrait favoriser la liaison entre deux sondes (ou entre sondes libres et tags) au détriment de la liaison entre les adduits et les tags. Cette élimination des sondes libres se fait classiquement par l'utilisation des colonnes de dessalage (Speers and Cravatt, 2009) ou par une technique de précipitation des protéines (MacKinnon and Taunton, 2009). Pour des raisons liées à leur coût d'utilisation, la première option a été testée puis abandonnée au profit de la deuxième, c'est-à-dire une précipitation des protéines. Plusieurs techniques de précipitation ont été testées afin de choisir celle qui permet d'obtenir un meilleur rendement en ce qui concerne la quantité de protéines précipitées.

De manière classique on retrouve au moins deux étapes de précipitation dans les protocoles de marquage de photoaffinité (MacKinnon and Taunton, 2009a). Dans le but de trouver le meilleur compromis, trois techniques de précipitations ont été testées : la précipitation au chloroforme/méthanol, à l'acide trichloracétique (TCA) et à l'acétone froid (Fic et al., 2010). Ce sont des techniques standard rapides et peu coûteuses classiquement utilisées. La première a l'avantage d'être plus rapide mais occasionne des pertes de protéines de l'ordre de 40% (après la première précipitation, résultats non montrées), ce qui réduit considérablement la quantité de protéines après deux précipitations successives. La deuxième technique induit moins de perte de protéines (moins de 50% après deux précipitations successives, résultats non montrées) mais génère un culot très difficile à solubiliser. L'utilisation d'une forte concentration de SDS (10% v/v) et d'une sonication prolongée est parfois nécessaire pour dissoudre les protéines précipitées. Selon MacKinnon et Taunton (2009a), la précipitation à l'acétone est idéale pour l'élimination de l'excès en sonde ou en tag respectivement après la photoactivation et la réaction de couplage par chimie-click. L'azide est soluble dans l'acétone tandis que les protéines ne le sont pas, permettant ainsi leur séparation (MacKinnon and Taunton, 2009). Dans notre cas cette fonction azide se trouve sur les sondes libres et sur les tags (fluorochrome ou biotinylés). La précipitation à l'acétone froid donne également un bon rendement de précipitation protéique de l'ordre de 68% (Fic et al., 2010). Compte-tenu de sa facilité de réalisation, de son efficacité d'élimination de l'excès en sonde et en tag, la précipitation à l'acétone froid a été testée puis intégrée dans le protocole final.

Deux étapes de précipitation des protéines sont incluses dans les protocoles classiques (figure 22, page 86 ; chapitre matériels et méthodes). Une première précipitation est réalisée après la photoactivation afin d'éliminer les sondes libres avant la réaction de ligation du tag (pour des

raisons évoquées précédemment) (MacKinnon and Taunton, 2009a; Speers et al., 2003a). Quant à la deuxième précipitation, elle est réalisée après la ligation bioorthogonale pour enlever l'excès en tag qui pourrait perturber la visualisation des protéines marquées en induisant un bruit de fond sur gel (tag fluorescent) ou l'étape de purification en aval en favorisant par exemple la liaison des tags (biotinylés) non fixés aux adduits à la streptavidine (dans le cadre de l'utilisation des billes couplées à la streptavidine) (MacKinnon and Taunton, 2009a; Speers et al., 2003a).

III.1.1.4. Ligation bioorthogonale par CuAAC (chimie-click)

La réaction de ligation bioorthogonale catalysée par le cuivre I (CuI) encore appelée chimie click (CuAAC) permet de fixer un tag de visualisation (ex. azide-fluorochrome) ou de purification (ex. azide-biotine) aux adduits formés par photoactivation (Geurink et al., 2011). Cette réaction de cycloaddition a lieu précisément entre les alcynes portés par les sondes et l'azide porté par les tags. Le mix réactionnel qui permet la réalisation de cette cycloaddition entre l'alcyne et l'azide est composé d'un agent réducteur (TCEP ou ascorbate de sodium – AscNa), d'un ligand (THPTA ou TBTA) et du cuivre (Cu_2SO_4).

Note : *L'utilisation de l'expression « chimie-click » dans le reste du document fait allusion à la réaction de CuAAC (d'autres réactions de couplage par chimie click sont possibles mais n'ont pas été appliquées ici).*

L'utilisation de l'ascorbate de sodium (AscNa) pour la réduction du cuivre(II) en cuivre(I), indispensable à la réaction de cycloaddition par chimie-click, est souvent rapportée dans la littérature. C'est par exemple le cas du protocole proposé par Presolski et al., (2011) qui a été utilisé pour nos premiers essais de marquage. Les résultats issus de l'utilisation de ce composé dans la réaction de chimie click montraient une dégradation protéique partielle après coloration des gels (SDS-PAGE) au bleu de Coomassie (exemple de la BSA, figure 29A) comme le montre la présence de plusieurs polypeptides de taille inférieure à la BSA (<66 kDa). Dans le cas de la BSA, cette dégradation représente 40% de la masse totale de la protéine. De même, avec l'utilisation d'un homogénat protéique de poisson zèbre, on observe cette dégradation des protéines (figure 29 B). Cet effet de dégradation des biomolécules dû à l'utilisation de l'ascorbate de sodium dans la réaction de ligation par CuAAC a déjà été rapporté par Wang et al., (2002). Contrairement à l'AscNa, aucune dégradation de protéine n'a été observée avec l'utilisation du TCEP, un agent réducteur préconisé par d'autres auteurs tels que MacKinnon and Taunton, (2009a) et Speers and Cravatt, (2009) (figure 29). L'utilisation de l'ascorbate de sodium a donc été abandonnée au profit du TCEP.

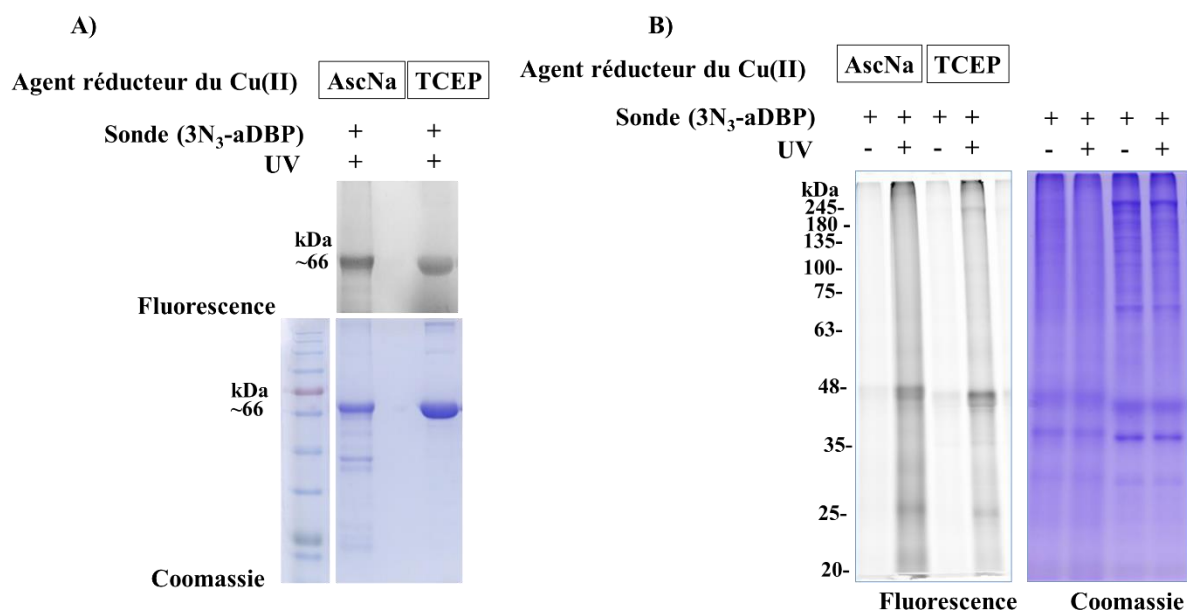


Figure 29 : Marquage de photoaffinité de la BSA (A) et de l'homogénat protéique de poisson zèbre (B) avec la sonde 3-N₃-aDBP. Comparaison entre l'utilisation de l'AscNa et du TCEP dans la réaction de CuAAC.

III.1.1.5. Visualisation des protéines marquées par l'utilisation d'un tag fluorescent

La visualisation des protéines par l'utilisation d'un tag fluorescent a également été optimisée dans le cadre de la mise au point du protocole de marquage des protéines. Les premiers essais de ligature du tag « Alexa Fluor-488 Azide » aux adduits formés entre les protéines purifiées (BSA et GST Pi) et les sondes faisaient apparaître un bruit de fond sur SDS-PAGE rendant difficile l'interprétation des résultats. En effet comme on peut le voir sur la figure 30 (A), avec l'exemple de la GST Pi, il y a une forte fluorescence autour des protéines marquées dans une région correspondant aux protéines de faibles poids moléculaire liée à l'utilisation de ce fluorochrome. Ce bruit de fond est occasionné par une co-migration du fluorochrome libre avec la GST Pi (une protéine de faible poids moléculaire). Ces fluorescences parasites ont des intensités 3 fois supérieures à celles des protéines marquées (astérisque rouge, fig. 30 A). De tels bruits de fond peuvent fortement perturber la visualisation des protéines de faibles poids moléculaires dans des homogénats protéiques. Avant de tester un autre tag azide-fluorochrome, plusieurs expériences d'optimisation ont été réalisées avec l'Alexa Fluor-488. Il s'agissait notamment de la réduction de la quantité de tag utilisée qui est passé de 20 μ M à 5 μ M et de l'élimination de l'excès en tag après la réaction de chimie click par une précipitation suivie de 3 lavages successives des protéines précipitées à l'acétone froid. En absence d'une amélioration significative des résultats, un autre tag a été testé : l'azide-TAMRA. L'objectif étant de trouver un tag qui soit facile à éliminer avec la précipitation à l'acétone froid, de sorte à éviter une co-

migration avec les protéines de faibles poids moléculaires. L'utilisation de l'azide-TAMRA améliore très significativement l'observation des protéines marquées sans faire apparaître de bruit de fond (figure 30, B). Ces observations suggèrent que soit, ce tag est facile à éliminer sous forme libre par une précipitation à l'acétone froid, soit il se colocalise avec le front de migration et donc migre facilement hors du gel en amont des protéines. Le choix définitif du tag fluorochrome à utiliser pour la visualisation des protéines marquées par photoactivation sur SDS-PAGE a donc été porté sur l'azide-TAMRA.

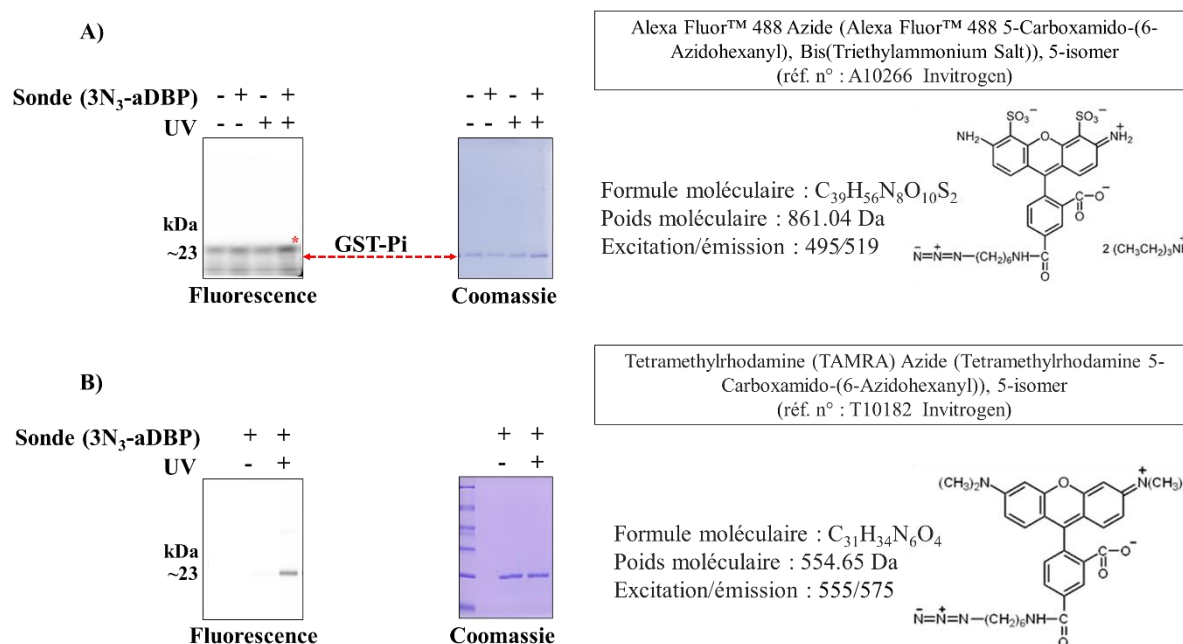


Figure 30 : Marquage de photoaffinité de la GST Pi avec la sonde 3-N₃-aDBP. **A)** La GST Pi (10 µg) a été incubée avec la sonde (10 µM) suivi d'une photoactivation à 365 nm (15 min ; 4°C) pour les échantillons « + UV », les échantillons sans UV ont été protégés de la lumière, le couplage par chimie-click a ensuite été réalisé avec le tag Alexa Fluor- 488 (20 µM) puis les protéines marquées ont été séparées sur SDS-PAGE. **B)** Même protocole que « A » à la différence de la chimie click qui a été réalisée avec l'azide-TAMRA.

Le ligand utilisé pour la réaction de chimie click a aussi fait l'objet d'une optimisation. Le choix définitif s'est porté sur le THPTA soluble dans l'eau au détriment du TBTA qui nécessite une préparation plus complexe, un mélange de solvant entre le ter-butanol et le DMSO (ratio 4 : 1) (Speers and Cravatt, 2004).

III.1.1.6. Visualisation des protéines marquées par Western blot avec l'utilisation du tag azide-biotine (tag non fluorescent)

Un tag azide-biotine peut être aussi couplé aux adduits par la réaction de ligation bioorthogonale catalysée par le cuivre (I) (CuAAC). Dans ce dernier cas, les protéines marquées sont

visualisées par Western blot. L'utilisation du tag azide-biotine permet également de réaliser la purification des cibles protéiques marquées par les sondes par chromatographie d'affinité avec la streptavidine avant leurs analyses par la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS). Le protocole de Western blot couplé au marquage de photoaffinité a donc été optimisé. Les concentrations en anticorps (l'anticorps monoclonal anti-biotine-peroxydase produit chez la souris ; MABP) et en streptavidine (streptavidine-peroxydase de *Streptomyces avidinii* ; SP) ont été optimisées afin d'obtenir une visualisation satisfaisante en termes de sensibilité et de spécificité de marquage.

Les protéines marquées sont visibles par Western blot aussi bien avec l'utilisation de l'anticorps MABP dilué au 1/250 qu'avec la streptavidine-peroxydase diluée au 1/1000 (figure 31). Ces différentes dilutions ont été retenues suite à une série d'expériences d'optimisation (dilutions de l'anticorps, de la streptavidine modifiée, solution de saturation). De plus, les profils de protéines observés par Western blot sont similaires à ceux obtenus avec l'utilisation du tag azide-TAMRA fluorescent (figure 31 C).

Le protocole de marquage de photoaffinité mis au point permet donc la visualisation des protéines marquées par l'utilisation d'un tag fluorescent mais aussi par celle d'un tag de purification et de visualisation par Western blot tel que l'azide-biotine. Ce protocole optimisé est celui décrit dans la partie « matériels et méthodes ». L'étape de validation des sondes issues de synthèse chimique a donc été réalisée avec ce protocole optimisé.

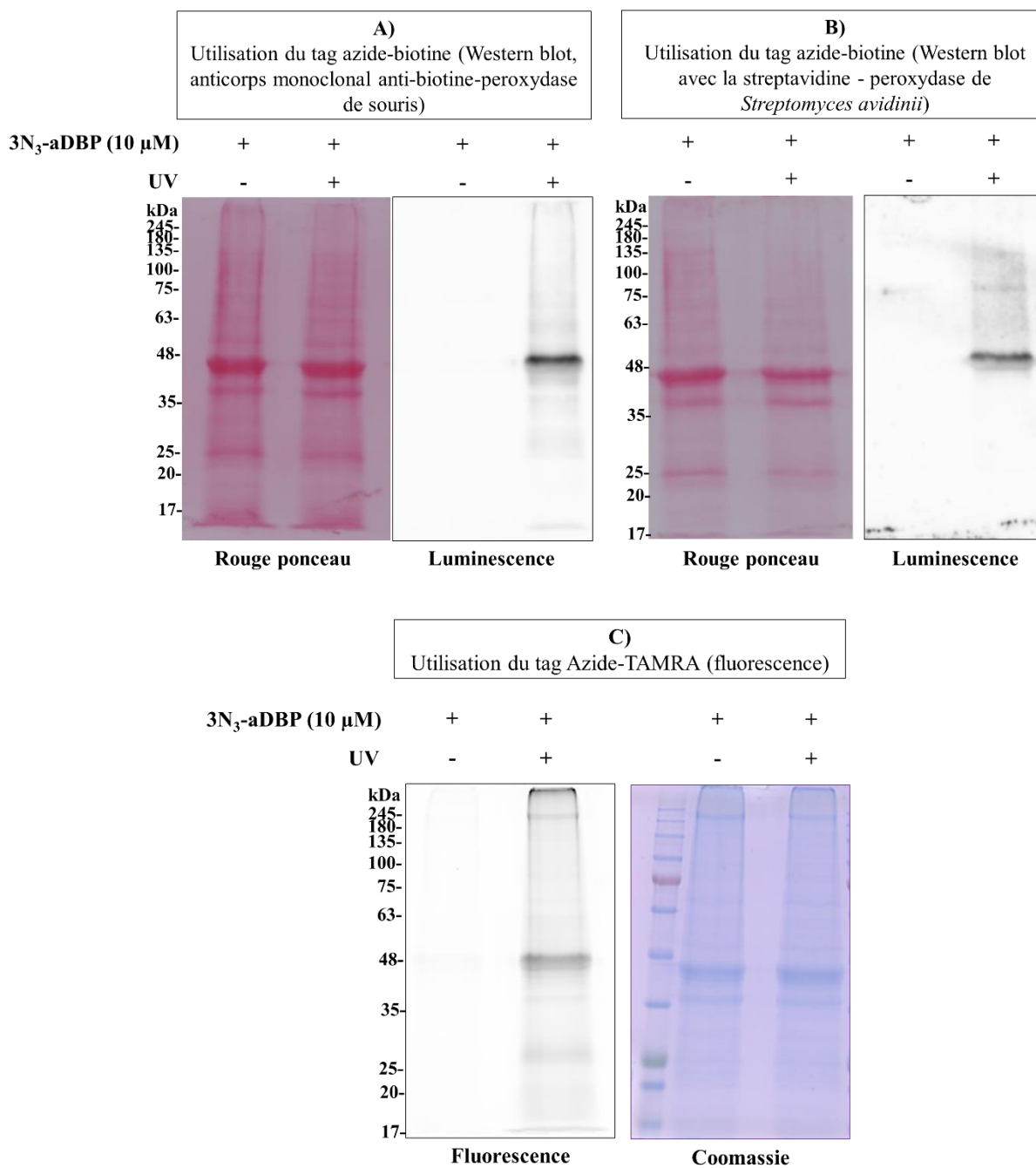


Figure 31 : Marquage de photoaffinité d'homogénat protéique de poisson zèbre avec la sonde 3-N₃-aDBP. A) Western blot après ligation de l'azide-biotine aux adduits, l'anticorps MABP a été dilué au 1/250. B) Western blot après ligation de l'azide-biotine aux adduits, la SP a été diluée au 1/1000. C) Utilisation du tag azide-TAMRA fluorescent pour la visualisation des adduits.

III.1.2. Conception de la sonde sans groupe photoactivable (sonde témoin)

La sonde qualifiée de sonde témoin est une sonde analogue au ligand DBP. Elle est caractérisée par une absence de groupe photoactivable contrairement aux sondes AfBPP classiques qui portent un groupe photoactivable. Elle a été fonctionnalisée uniquement avec des fonctions alcyne aux extrémités des deux chaînes aliphatiques (figure 32). Le but est de disposer d'une sonde témoin qui puisse permettre de vérifier que la fixation des sondes AfBPP sur leur cible protéique est bien une liaison spécifique du groupe photoactivable.

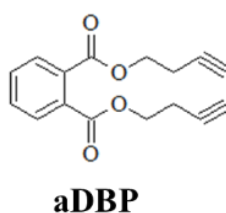


Figure 32 : Structure de la sonde témoin aDBP (sans groupe photoactivable).

III.1.2.1. Propriétés physicochimiques de la sonde témoin aDBP

Les propriétés physicochimiques de la sonde aDBP sont légèrement différentes de celles du ligand d'intérêt DBP (tableau 5). Le coefficient de partage octanol-eau ($\log K_{ow}$) permettant d'appréhender le caractère hydrophile ou hydrophobe (lipophile) d'une molécule a été estimée. Avec une valeur de 3,07, il est légèrement plus bas que celui du DBP (4,61). La solubilité théorique dans l'eau de aDBP est ~19 fois plus élevée que celle du DBP (2,351). La fonctionnalisation de la structure du DBP avec un alcyne au bout de chacune des chaînes aliphatiques influence donc les paramètres physicochimiques de la sonde aDBP.

III.1.3. Conception des sondes azide

Le choix des groupements photoactivables est une étape critique dans la conception des sondes AfBPP. En considérant la structure relativement simple de notre molécule d'intérêt (DBP) nous avons écarté l'utilisation du groupement benzophénone (schéma 4, page 69) qui pourrait engendrer un encombrement stérique trop important par rapport au ligand DBP alors que le principe de l'AfBPP repose sur l'utilisation d'un analogue du ligand d'intérêt. Notre premier choix s'est porté sur l'azide beaucoup moins encombrant. L'azide est capable de générer des nitrènes réactifs après irradiation à des longueurs d'onde comprises entre 254 et 400 nm (Bayley and Knowles, 1977).

Pour la fonctionnalisation de ces sondes, l'azide (N_3) photoactivable a été fixé en position 3 et 4 du noyau aromatique du DBP, respectivement pour la sonde 3- N_3 -aDBP et la 4- N_3 -aDBP (figure 33). L'alcyne destiné à la réaction de ligation bioorthogonale (chimie click) a été positionné au bout de chacune des deux chaînes aliphatiques. Le positionnement de l'alcyne au bout des chaînes aliphatiques est plus adapté car il devrait permettre de minimiser les modifications apportées à la sonde par rapport à la structure du ligand DBP. En cas d'hydrolyse du DBP, nous avons la perte d'une chaîne aliphatique et la formation d'un mono ester (Staples et al., 2011). Ainsi la fixation de l'alcyne aux deux chaînes aliphatique nous assure la possibilité de pouvoir réaliser une ligation du tag par la réaction de cycloaddition couplée par le cuivre I (CuAAC) aussi bien sur l'analogue du DBP que du MBP. La conception des sondes analogues au principal métabolite du DBP (le MBP) a été réalisée suivant le même schéma de positionnement de l'azide et de l'alcyne. Le noyau aromatique ainsi que les chaînes aliphatiques du DBP ont donc été légèrement modifiés. Au total, nous avons ainsi 2 sondes azide photoactivables analogues au DBP et 2 autres analogues au MBP.

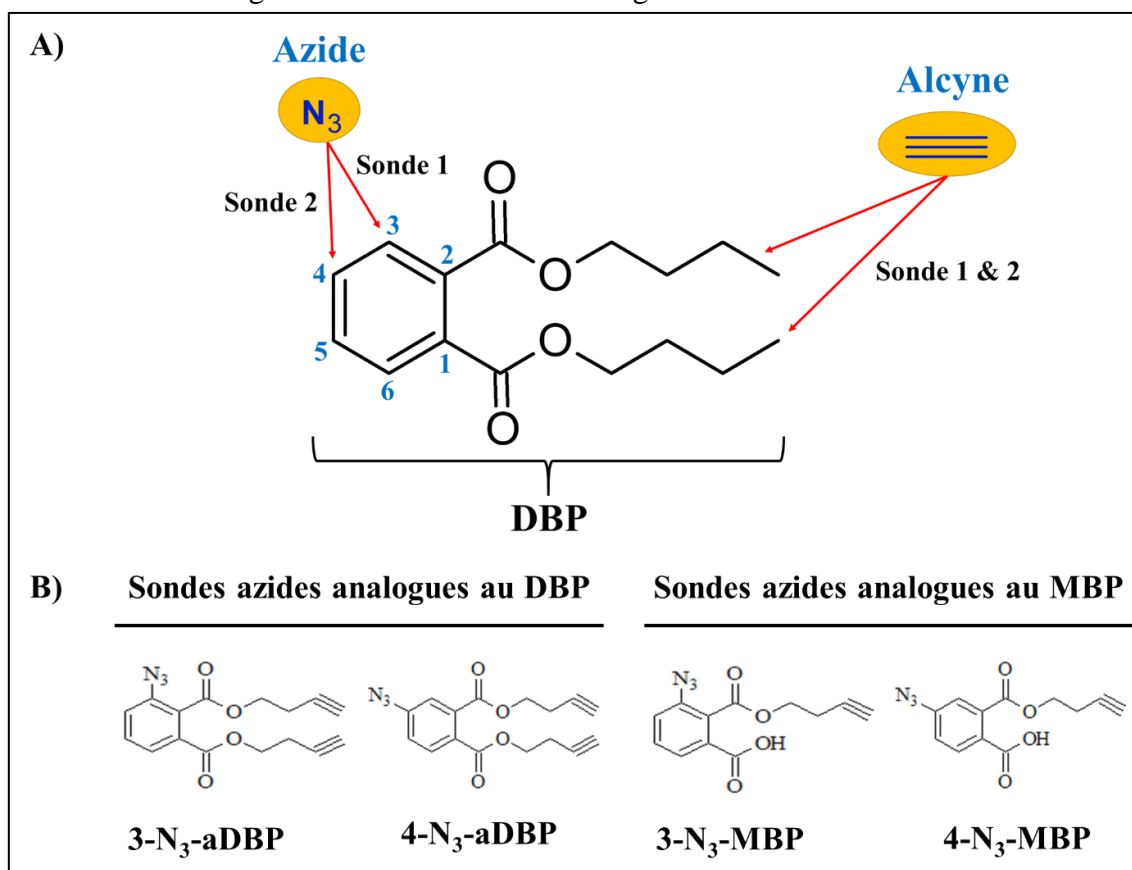


Figure 33 : Conception des sondes azide. **A)** positionnement des groupes fonctionnels ; **B)** structure des sondes azide : deux sondes basées sur la structure du DBP (analogues au DBP) et deux autres analogues au MBP.

Après l'étape de synthèse réalisée par les chimistes de l'équipe de chimie et neurobiologie moléculaire du laboratoire conception et application de molécules bioactives (Université de Strasbourg), les sondes mises à notre disposition ont fait l'objet de plusieurs tests de vérifications pour nous assurer qu'elles sont en mesure d'être utilisées pour cartographier les cibles protéiques du DBP dans le protéome du poisson zèbre. Nous avons retenu deux paramètres clés pour cette étape de validation *in vitro* des sondes : la liaison covalente aux cibles protéiques par photoactivation et la spécificité de liaison aux sites de fixation du DBP.

NB : la pureté des sondes synthétisées est $\geq 95\%$.

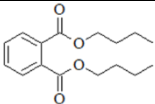
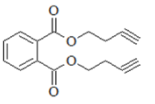
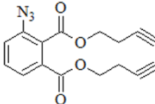
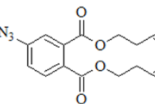
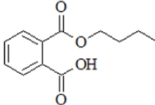
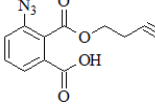
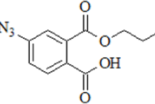
III.1.4. Propriétés physicochimiques des sondes azide

Afin de nous assurer que les sondes ont des structures chimiques similaires au ligand DBP (ou MBP) et donc des attributs physiques et des effets biologiques similaires, nous avons effectué des vérifications avec des modèles nommés « quantitative structure activity relationship » ((Q)SAR). Il s'agit de modèles mathématiques pouvant être utilisés pour prédire les propriétés physico-chimiques, biologiques et le devenir dans l'environnement des composés à partir des connaissances relatives à leurs structures chimiques ("Modèles QSAR - ECHA," n.d.). Pour cela, nous avons utilisé le logiciel EPI SuiteTM (Version 4.11) de l'agence américaine de la protection de l'environnement (US EPA, 2015). Deux paramètres principaux ont été retenus pour cette analyse : Coefficient de partage octanol-eau (K_{ow}) et la solubilité dans l'eau (Parkerton and Konkell, 2000).

Le tableau 5 résume l'ensemble des résultats pour les sondes azide et les ligands (DBP et MBP). Comme mentionné dans le paragraphe précédent, la fixation de l'alcyne au bout de chacune des deux chaînes aliphatiques du DBP diminue de 33% le K_{ow} et augmente très fortement (~19 fois) la solubilité aqueuse de la sonde témoin (aDBP) par rapport au DBP. L'ajout d'un azide photoactivable sur le noyau aromatique du DBP en plus des alcynes en bout de chaîne aliphatique pour générer des sondes de types aryl-azide (analogues au DBP) diminue légèrement le K_{ow} de 13% et la solubilité dans l'eau de 36,5% par rapport au DBP. Les résultats identiques obtenus pour les 2 sondes azide suggèrent que le positionnement de l'azide sur le carbone 3 ou 4 du noyau aromatique ne modifie pas les propriétés physicochimiques de ces sondes. En ce qui concerne les sondes analogues au MBP, le K_{ow} des sondes aryl-azide varie très faiblement (augmentation de 5,6%) par rapport au MBP. Quant à la solubilité dans l'eau, elle diminue de 83%.

L'analyse par (Q)SAR des sondes synthétisées chimiquement suggèrent ainsi des effets biologiques similaire entre les sondes de type aryl-azide et les ligands dont ils sont des analogues (DBP et MBP). Cette analyse étant basée sur des modèles mathématiques et donc théoriques, mérite d'être complétée et approfondie par des essais biologiques *in vitro* puis *in vivo*. L'étape de validation *in vitro* qui suit permettra d'approfondir l'évaluation des sondes.

Tableau V : Propriétés physicochimiques des ligands DBP et MBP et des sondes azide AfBPP issues de synthèse chimique.

N°	ID molécule	Structure chimique	Log K_{ow} *	Solubilité dans l'eau** (mg/L)
1	Dibutyl phtalate (DBP)		4,61	2,351
2	1,2-bis(but-3-yn-1-yl)benzène-1,2-dicarboxylate (aDBP)		3,07	43,76
3	1,2-bis(but-3-yn-1-yl)3-azidobenzène-1,2-dicarboxylate (3-N ₃ -aDBP)		4,00	1,493
4	1,2-bis(but-3-yn-1-yl)4-azidobenzène-1,2-dicarboxylate (4-N ₃ -aDBP)		4,00	1,493
5	Monobutyl phtalate (MBP)		2,84	125,7
5	Acide 3-azido-2-[(but-3-yn-1-yloxy)carbonyl]benzoïque (3-N ₃ -aMBP)		3,00	21,19
7	Acide 4-azido-2-[(but-3-yn-1-yloxy)carbonyl]benzoïque (4-N ₃ -aMBP)		3,00	21,19

*calculé avec le logiciel EPI SuiteTM; ** solubilité estimée (différent de solubilité expérimentale)

III.1.5. Validation *in vitro* des sondes azide photoactivables 3-N₃-aDBP et 4-N₃-aDBP

III.1.5.1. Utilisation de protéines modèles (BSA et GST Pi) pour la validation des sondes azide

Pour la validation des sondes chimiques, nous nous sommes focalisés dans un premier temps sur les sondes analogues au DBP, notre molécule d'intérêt. Ces sondes ont été comparées entre elles en fonction des critères de sélections définis : photoactivation, saturation et spécificité du marquage de photoaffinité vis-à-vis des potentielles cibles protéiques du DBP. À l'issue de cette validation, une sonde candidate analogue au DBP sera choisie dans un premier temps puis la sonde MBP correspondante fera l'objet d'une validation à son tour dans un second temps. L'objectif est d'avoir *in fine* un couple de sonde DBP/MBP pouvant être utilisée pour cartographier les cibles protéiques du DBP (et du MBP) à l'échelle du protéome du poisson zèbre.

Les premières sondes synthétisées sont les sondes azide. Elles ont une structure plus simple et leurs synthèses a été plus facile. La mesure des spectres d'absorption sans et avec UV suggère une photosensibilité des sondes lorsqu'elles portent un groupe photoactivable (en occurrence l'azide, figure 28). Afin de confirmer ces observations, des essais de marquage de protéine modèle (BSA) ont été réalisés *in vitro* avec les 2 sondes azide en plus de la sonde aDBP utilisée comme témoin. La figure 34 montre les résultats obtenus pour ces essais. Les sondes 3-N₃-aDBP et 4-N₃-aDBP portant l'azide photoactivable se fixent de manière covalente à la BSA uniquement en présence d'une irradiation UV. Par contre, en présence de la sonde sans groupe photoactivable (sonde aDBP), aucune fixation covalente avec la BSA n'est observée que ce soit en présence ou en absence d'UV. Les fixations covalentes des sondes 3-N₃-aDBP et 4-N₃-aDBP à la BSA en présence d'UV sont alors attribuées à la présence de l'azide et non à un processus de fixation indépendant de l'azide et de l'irradiation lumineuse. Ces adduits formés par irradiation d'aryl azide (AA) sont obtenus via la formation d'un nitrène hautement réactif (Bayley and Knowles, 1977).

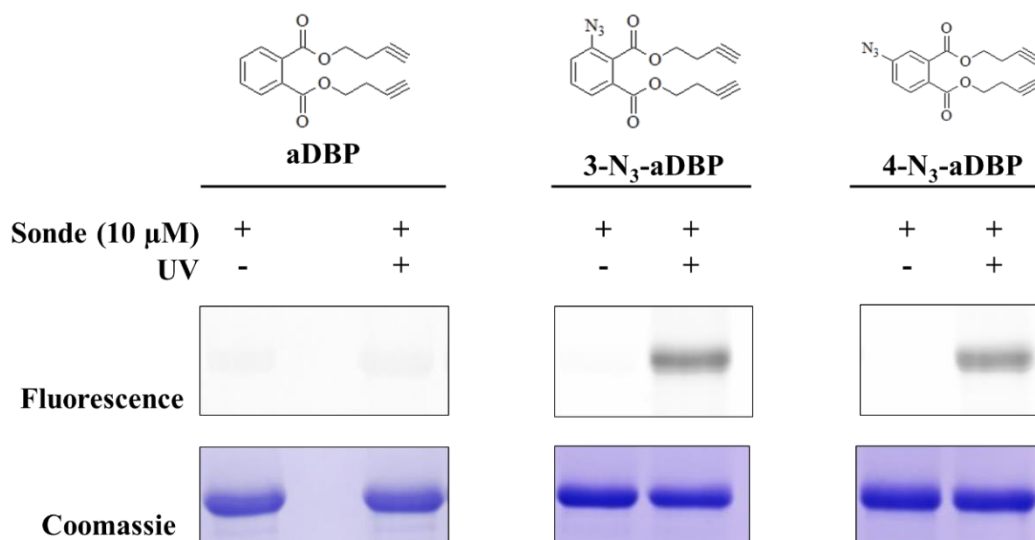


Figure 34: Marquage de la BSA par les sondes azide (3-N₃-aDBP, 4-N₃-aDBP) et la sonde témoin (aDBP). La BSA a été incubée avec 10 μM de sonde (30 min), puis irradiée à l'UV pendant 15 min (365 nm) à l'exception des échantillons sans UV protégés de la lumière. Le couplage du fluorochrome par chimie click aux adduits formés a ensuite été réalisé sur tous les échantillons et 5 μg de protéines ont été séparés sur SDS-PAGE. La prise d'image de la fluorescence a été faite avec un Imager Typhon™ FLA 9000 puis les gels ont été colorés au bleu de Coomassie, suivi d'une deuxième prise d'image en colorimétrie.

III.5.1.1. Evaluation de la saturation des sondes azide : 3-N₃-aDBP et 4-N₃-aDBP

Dans le paragraphe précédent, nous avons montré que le marquage des protéines était dépendant non seulement de la présence d'une sonde photoactivable, mais aussi de l'irradiation à l'UV. Ces premiers résultats sont concluants par rapport à l'approche AfBPP que nous utilisons et permettent de passer aux essais de saturation. L'objectif ici est de voir si les sites de fixation des sondes sur les protéines telle que la BSA sont saturables. Nous aurons ainsi une indication sur l'affinité des sondes pour leurs récepteurs protéiques. La mesure de l'affinité de liaison et des constantes de dissociations qui peuvent s'avérer nécessaires dans certains cas (Hein et al., 2005) ne sont pas abordées dans le cadre de cette thèse (évaluation des sondes).

L'irradiation UV de la BSA en présence de concentrations croissantes en sonde 3-N₃-aDBP (Figure 35 A) et 4-N₃-aDBP (figure 35 B) conduit à un marquage dépendant de la concentration. Les protéines marquées augmentent de 124% entre 10 μM et 100 μM (3-N₃-aDBP) et de 263% dans le cas de la sonde 4-N₃-aDBP (figure 35 C). Un faible marquage est visible en présence de sonde et en absence d'irradiation UV, ce qui a été aussi observé par d'autres auteurs dans le cadre de marquage de photoaffinité combiné à un couplage par chimie click (CuAAC) (Yang et al., 2013). Le marquage apparaît cependant fortement dépendant de la présence simultanée

de sonde et d'irradiation UV (Figure 35). A partir de 50 μM de sonde le marquage tend vers une saturation, ce qui suggère que les sondes se fixent sur un site saturable sur la BSA (figure 35 C). En outre, le profil des courbes de quantification (figure 35 C) diffère entre les deux sondes, la tendance vers une saturation est d'ailleurs plus claire pour la 3- N_3 -aDBP que pour la sonde 4- N_3 -aDBP. De plus fortes concentrations en sonde de l'ordre du millimolaire (mM) nous aurait permis de vérifier l'effectivité de la saturation, mais elles n'ont pas été testées étant donné que ces concentrations auraient été largement au-dessus de la limite de solubilité des sondes.

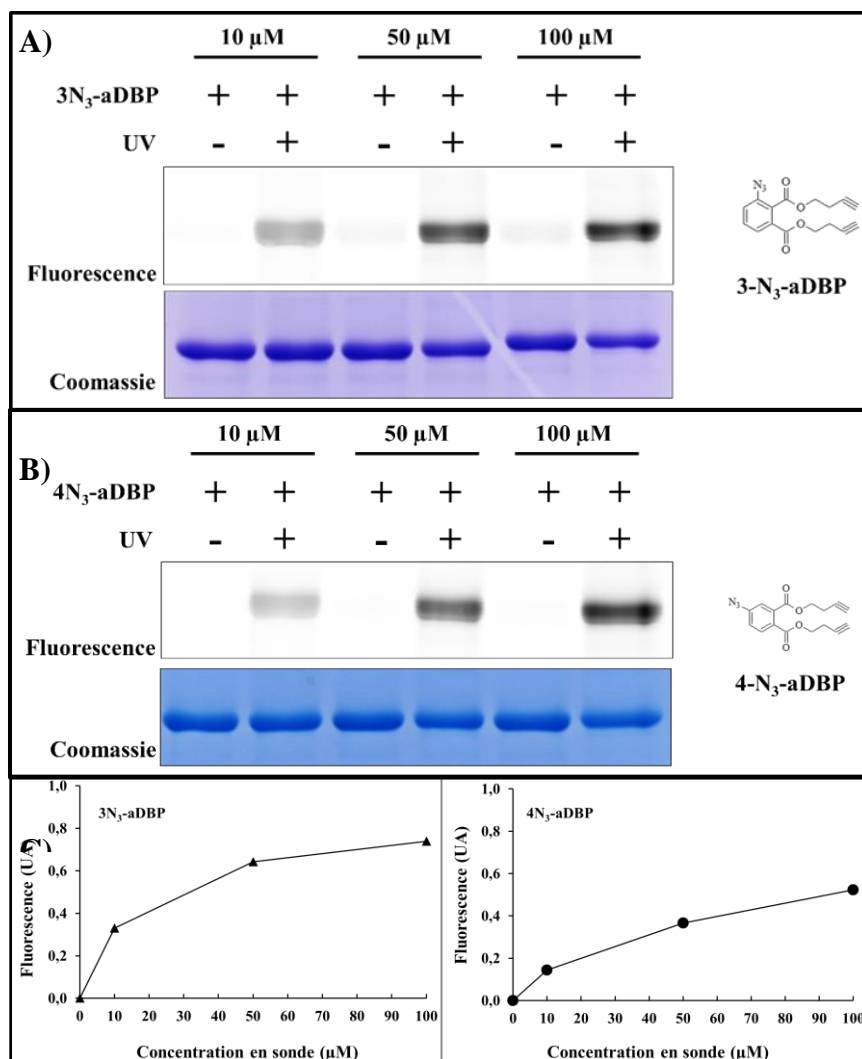


Figure 35 : Marquage de photoaffinité avec les sondes azide. **A)** 3- N_3 -aDBP, **B)** 4- N_3 -aDBP ; **C)** Quantification de la fluorescence des protéines marquées (valeurs de fluorescence normalisées par rapport à la quantité de protéine). La BSA a été incubée avec les sondes à différentes concentrations (10, 50 et 100 μM), puis les échantillons ont été irradiés 15 min à 365 nm à l'exception des échantillons sans UV qui ont été protégés de la lumière. Le tag a ensuite été fixé aux adduits par la réaction de CuAAC puis 5 μg de protéines ont été déposés sur gel SDS-PAGE.

3.5.1.2. Evaluation de la spécificité du marquage par les sondes azide (3-N₃-aDBP et 4-N₃-aDBP)

La spécificité structurelle de liaison entre les sondes et leur cible a été évaluée par des essais de compétition avec le DBP. Il s'agit d'un critère de validation important, car il permet de s'assurer que les sondes se fixent aux récepteurs sur le même site de fixation que le DBP. Ceci permet de valider expérimentalement le fait que les sondes sont *in fine* des analogues du phtalate de référence dont elles dérivent. Contrairement aux essais de saturation, les essais de compétition ont été réalisés entre chacune des 2 sondes (10 µM) et des concentrations croissantes en DBP (0 µM, 10 µM, 50 µM et 100 µM) soit des rapports DBP/sonde de 0X, 1X, 5X et 10X. Des concentrations plus élevées en DBP n'ont pas été testées compte tenu de la limite de solubilité du DBP (~36 µM). Les résultats des essais de compétition sont illustrés sur la figure 36. La diminution du marquage de la BSA et de la GST Pi en fonction de la concentration en DBP attendue dans le cas d'une compétition n'est pas observée avec l'utilisation de la sonde 3-N₃-aDBP (figure 36 A). Au contraire, on observe une tendance à la hausse des protéines marquées en fonction de l'augmentation du rapport DBP/sonde (figure 36 A). Ces observations sont identiques à celles qui sont faites avec la sonde 4-N₃-aDBP (figure 36 B) à l'exception d'une légère baisse observée avec la BSA à 50 µM de DBP. Que ce soit avec la BSA ou la GST Pi, deux protéines de structure et de fonctions différentes, les tendances vers une augmentation du marquage en apparence non compatible avec une compétition entre le DBP et les sondes ont été observées. Les mêmes observations ont été faites lorsque des homogénats protéiques de poisson zèbre sont utilisés (confère paragraphes suivants). L'absence de compétition dans ces conditions expérimentales suggèrerait que ces sondes ne sont pas des analogues du DBP.

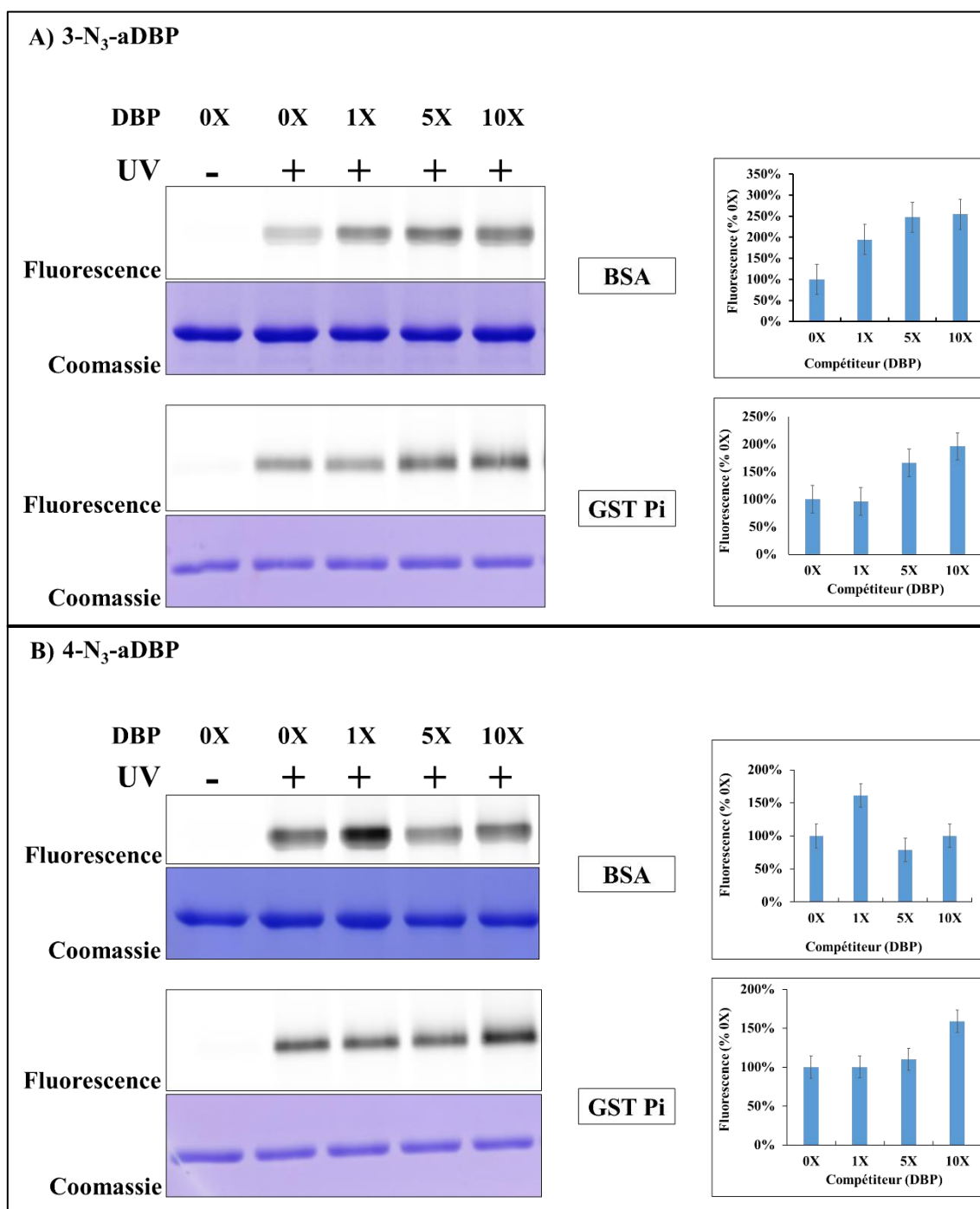


Figure 36: Marquage compétitif entre le DBP et les sonde azide. **A)** 3-N₃-aDBP vs DBP réalisé avec la BSA et la GST Pi ; **B)** 4-N₃-aDBP vs DBP réalisé avec la BSA et la GST Pi. Dans un premier temps les protéines ont été incubées (15 min ; 37°C) avec différentes concentrations en DBP (10, 50, 100 et 1000 µM), tandis que du DMSO est incubé avec les échantillons témoins (sans DBP). Dans un deuxième temps les sondes (10 µM) ont été ajoutées aux réactions puis les échantillons incubés à nouveau (15 min), avant d'être tous irradiés à l'UV (365 nm, 15 min ; 4°C). La ligation avec un tag fluorescent a ensuite été réalisée puis les profils visualisés sur SDS-PAGE (5 µg de BSA et 2,5 µg de GST Pi déposées par puits).

III.1.5.2. Utilisation d'homogénat protéique de poisson zèbre pour la validation des sondes azide

III.1.5.2.1. Marquage avec les sondes azide

L'objectif que nous poursuivons en utilisant l'approche AfBPP est de cartographier les cibles protéiques du DBP dans le protéome du poisson zèbre. Afin de valider l'utilisation des sondes qui ont été synthétisées, une série de test a été réalisée avec des protéines modèles telles que la BSA et la GST Pi connues pour leurs interactions avec les phtalates (Law and Moody, 1991; Zhang and Liu, 2012). Bien qu'elles soient en mesure de se fixer sur les protéines modèles de manière dépendante de la lumière UV, les sondes azide ne semblent pas être des analogues du DBP comme nous avons pu le montrer avec les expériences de compétition. Toutefois, ces observations méritent d'être validées avec l'utilisation d'homogénat protéique de poisson zèbre. Pour cela, un homogénat protéique extrait de poisson zèbre adulte a été utilisé. Le marquage des protéines a été réalisé en suivant le même protocole que celui utilisé pour les protéines purifiées.

La figure 37 montre les résultats obtenus avec l'utilisation des 2 sondes azide. Chacune des sondes est en mesure de marquer les protéines dans l'homogénat de poisson zèbre. Comme observé pour les protéines purifiées, le marquage est dépendant de la présence des sondes et de leur photoactivation. Le profil des protéines marquées est quasiment le même pour les deux sondes. Toutes les protéines présentes dans l'homogénat n'ont pas été marquées par les sondes, et les protéines fortement marquées ne sont pas non plus les plus abondantes. Cette différence de profil entre protéines marquées et protéines présentes dans l'homogénat suggère une certaine sélectivité des sondes. Les sondes azide seraient donc sélectives vis-à-vis des protéines.

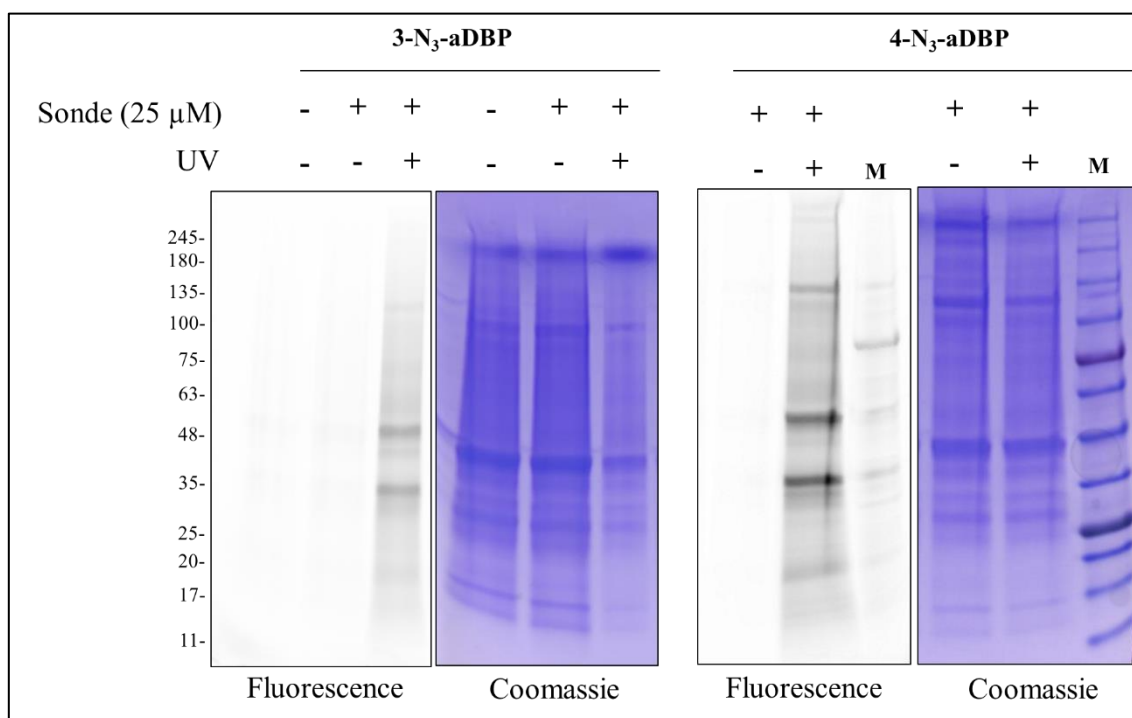


Figure 37 : Marquage de photoaffinité sur des homogénats protéiques de poisson zèbre. Les protéines (150 μg) ont été incubées avec 25 μM de sonde pendant 30 min à 25°C (température ambiante). Les échantillons « + UV » ont été irradiés à 365 nm pendant 15 min (4°C), les autres échantillons ont été conservés à 4°C à l’abri de la lumière. Le couplage du tag fluorochrome a ensuite été réalisé par chimie click puis 20 μg de protéines ont été séparés sur SDS-PAGE. Marqueur de poids moléculaire noté « M ».

III.1.5.2.2. Evaluation de la spécificité du marquage par les sondes azide

Les observations faites avec les protéines purifiées (BSA et GST Pi) suggèrent qu’elles ne sont pas des analogues du DBP, car il n’y a pas de compétition pour le site de fixation du DBP dans les conditions expérimentales testées. Ces conditions sont d’ailleurs limitées par la solubilité du DBP qui ne permet pas de tester des concentrations élevées (ratio maximum DBP/sonde testé est égale à 10). Afin d’augmenter le ratio DBP/sonde à tester sur les homogénats sans augmenter la concentration du DBP, nous avons opté pour la diminution de la concentration en sonde à utiliser. Des essais de marquage ont alors été réalisés sans DBP afin d’évaluer la capacité des sondes à marquer des protéines à de faibles concentrations. La figure 38 montre les résultats obtenus pour un marquage avec 0,1 μM de sonde. Lorsque l’on compare les deux sondes, on observe que la sonde 3-N₃-aDBP marque beaucoup plus de protéines que dans le cas de 4-N₃-aDBP et que les protéines marquées présentent un profil similaire à ceux obtenus à de fortes concentrations (25 μM, figure 37).

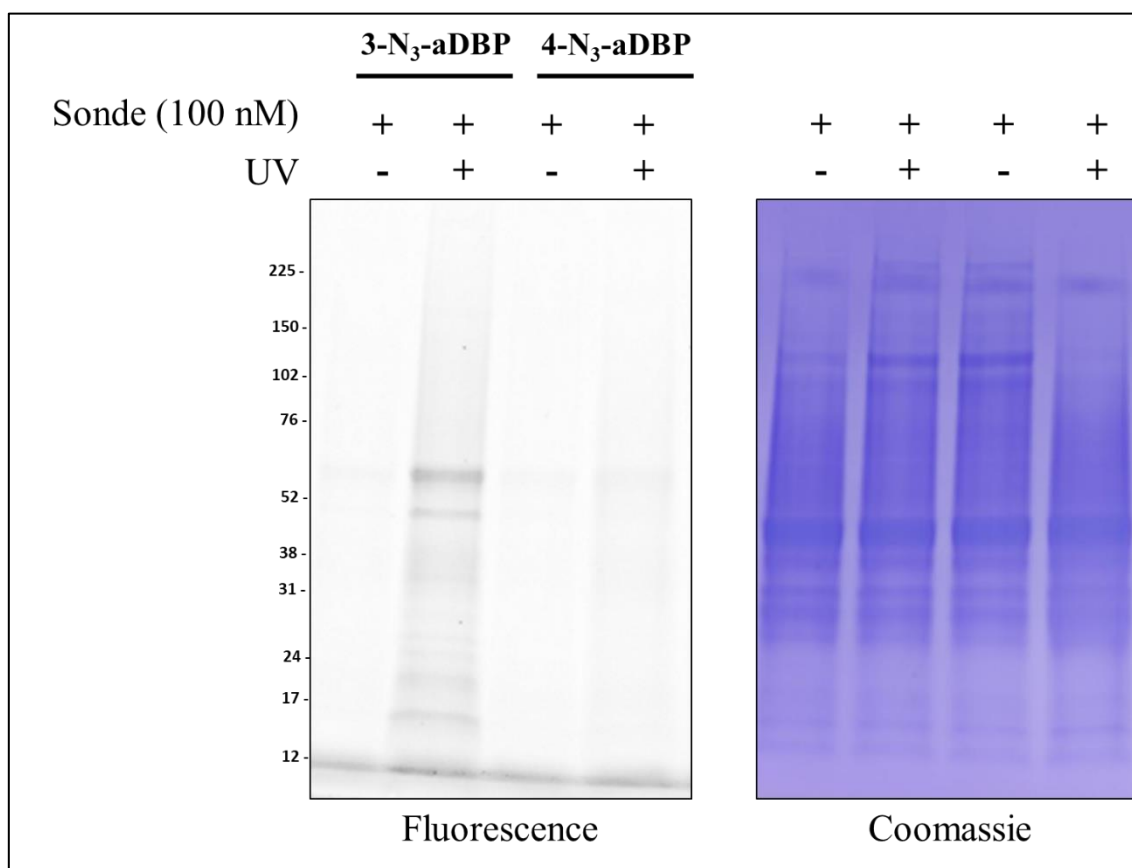


Figure 38 : Marquage de photoaffinité sur des homogénats protéiques de poisson zèbre. Les protéines (150 µg) ont été incubées avec 0,1 µM de sonde pendant 30 min à 25°C (température ambiante). Les échantillons « + UV » ont été irradiés à 365 nm pendant 15 min (4°C), les autres échantillons ont été conservés à 4°C à l’abri de la lumière. Le couplage du tag fluorochrome a ensuite été réalisé par chimie click puis 20 µg de protéines ont été séparés sur SDS-PAGE.

Différents essais de compétition ont ensuite été réalisés avec les sondes. Divers ratio DBP/sonde ont été testés tout en gardant une concentration en sonde qui puisse permettre d’observer les protéines marquées sur SDS-PAGE. La figure 39 illustre les résultats obtenus avec la sonde 3-N₃-aDBP à 0,5 µM avec un ratio DBP/sonde de 50X et 100X. Compte tenu de la faible concentration en sonde utilisée, le contraste de la fluorescence a été légèrement augmenté avec ImageJ pour faciliter l’analyse d’image. Quel que soit le ratio testé nous arrivons aux mêmes observations, c’est-à-dire une augmentation du marquage des protéines après une pré-incubation de celles-ci avec du DBP. La compétition pour le site de fixation caractérisée par une diminution du marquage en fonction du DBP n’a pas été observée. Ces différentes observations faites avec l’homogénat protéique de poisson zèbre sont en accord avec celles qui ont été faites avec les protéines modèles.

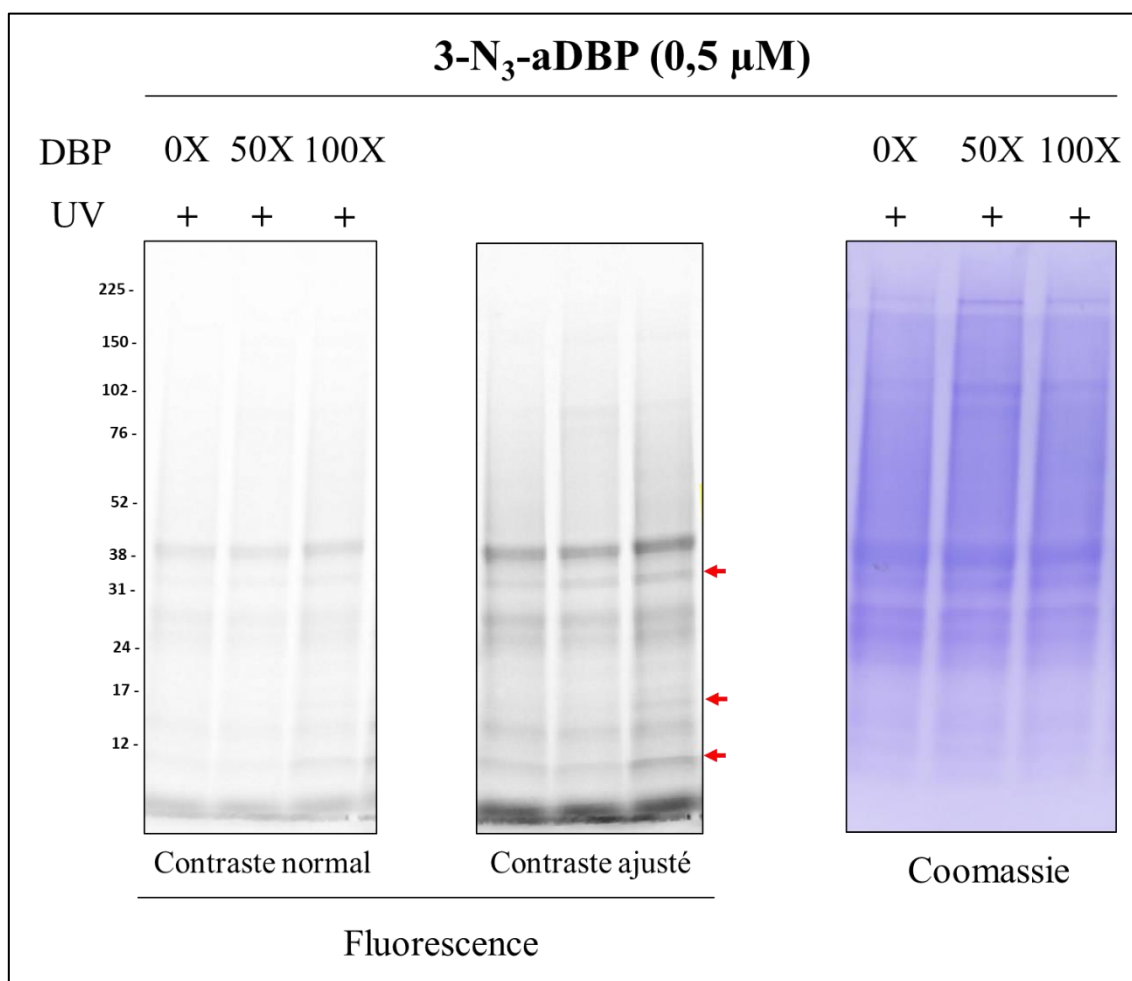


Figure 39 : Marquage compétitif entre le DBP et la sonde azide 3-N₃-aDBP : utilisation d'homogénat protéique de poisson zèbre. Dans un premier temps les homogénats ont été incubés (30 min ; 25°C) avec différentes concentrations en DBP (25 μM et 50 μM), tandis que du DMSO est incubé avec l'échantillon témoin (sans DBP). Dans un deuxième temps la sonde (0,5 μM) a été ajoutée aux mélanges puis les échantillons incubés à nouveau (30 min), avant d'être tous irradiés à l'UV (365 nm, 15 min ; 4°C). La ligature avec un tag fluorescent a ensuite été réalisée puis les profils visualisés sur SDS-PAGE (20 μg de protéine déposées par puits). Les flèches rouges indiquent les protéines fortement marquées en présence du DBP.

En somme, les sondes azide sont en mesure de se fixer de manière covalente (BSA, GST Pi, et homogénats) et probablement sélective (homogénats) à des cibles protéiques lorsqu'elles sont activées par la lumière UV. Elles remplissent donc un premier critère compatible avec leurs utilisations dans l'approche AfBPP. Cependant, elles ne seraient pas analogues au DBP et ne peuvent pas être utilisées dans l'optique d'identifier les cibles protéiques du DBP dans le protéome du poisson zèbre. Nous discuterons les résultats a priori inattendus ayant montré une augmentation du marquage en présence de DBP. La structure chimique des sondes azide serait significativement différente de celle du ligand DBP à cause de la modification apportée sur le noyau aromatique. Cette situation a été anticipée, raison pour laquelle nous avons conçu d'autres

sondes. Elles ont été fonctionnalisées avec un groupe photoactivable différent de l'azide, le groupe diazirine. De plus le positionnement du groupe photoactivable sur la structure du DBP a été modifié compte-tenu des résultats obtenus avec les sondes azide. Le paragraphe suivant aborde la conception de ces nouvelles sondes, il est suivi d'une étape de validation suivant la démarche méthodologique adoptée pour les sondes azide.

III.1.6. Conception des sondes diazirine (DA)

Les sondes diazirine de synthèse plus complexe ont été conçues et synthétisées précisément dans le cas où les sondes azido ne conviendrait pas. Elles ont été fonctionnalisées avec la fonction difluorodiazirine (CF₂N₂) comme très souvent retrouvée dans la littérature (Chang et al., 2018; Conway et al., 2021; Tachrim et al., 2021; Terrabuio et al., 2016). Le positionnement d'un fluor adjacent à l'alcyne et la diazirine contribue à la stabilisation des électrons du carbène réactif généré après photoactivation (Brunner et al., 1980; Chang et al., 2018) et par conséquent augmente sa réactivité. Afin de faciliter ce positionnement, la chaîne aliphatique du DBP a été rallongée, elle est passé de 4 à 5 atomes de carbone.

Deux sondes analogues au DBP fonctionnalisées avec la difluorodiazirine ont été synthétisées. Pour la première sonde, la difluorodiazirine a été placée sur une seule chaîne aliphatique pour donner la « diazirine 2 » et sur les deux chaînes aliphatiques pour la deuxième sonde « diazirine 3 » (figure 40). Nous avons opté pour une fixation du groupe photoactivable sur les chaînes aliphatiques pour mimer le plus possible le DBP en évitant une modification du noyau aromatique. De manière classique, un seul groupe photoactivable est nécessaire pour générer une sonde AfBPP (Dormán and Prestwich, 2000; Wright and Sieber, 2016). Nous avons fait le choix d'avoir une deuxième sonde diazirine (3) avec deux groupes photoactivables, pour anticiper d'éventuels problèmes de fixation avec la première sonde diazirine (2) en permettant d'accroître en théorie sa capacité de photoactivation. Une sonde analogue au MBP portant la difluorodiazirine a également été synthétisée (diazirine-1) (figure 40).

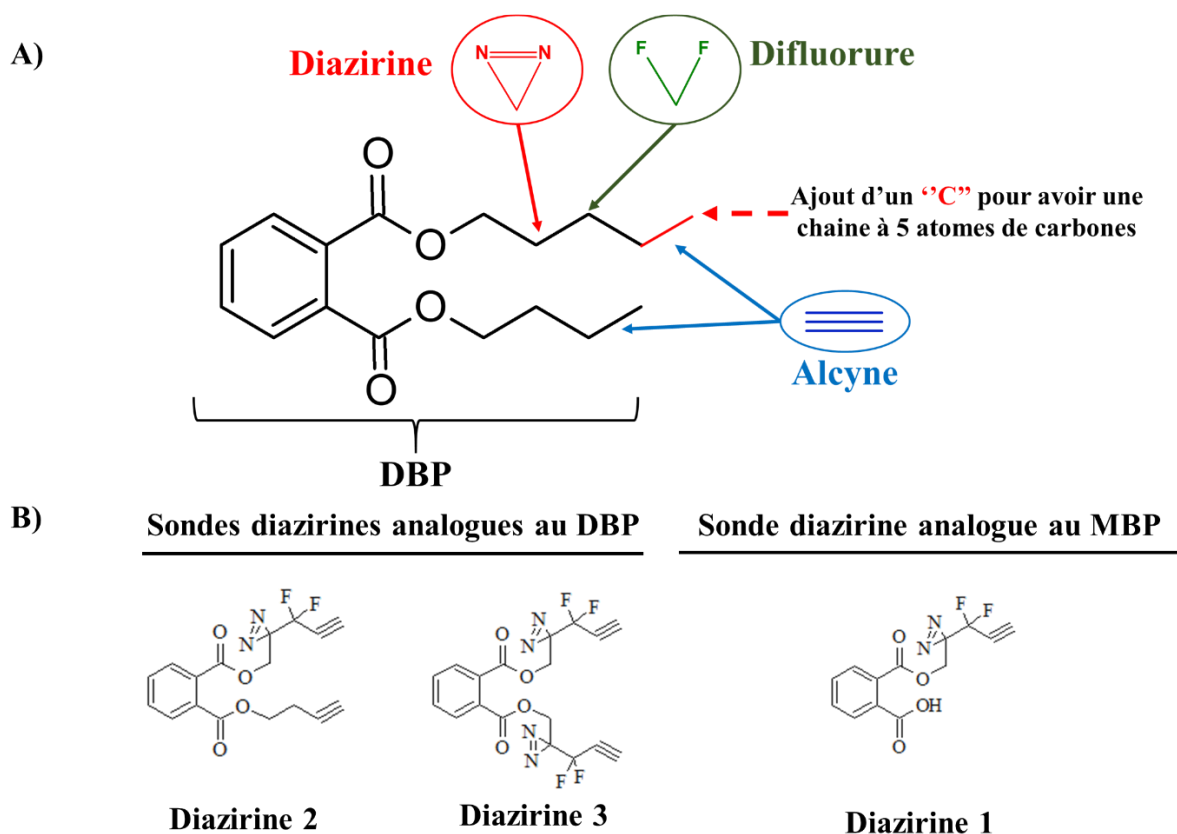


Figure 40 : Conception des sondes diazirine. **A)** positionnement des groupes fonctionnels. **B)** structure des sondes diazirine : deux sondes basées sur la structure du DBP (analogues au DBP) et une sonde analogue au MBP.

NB : les sondes synthétisées ont une pureté $\geq 95\%$.

III.1.6.1. Longueur d'onde d'irradiation du mélange protéine – sonde

Comme mentionné au chapitre 5 (I.5.3.3 ; page 70) le groupe photoactivable DA génère un carbène réactif par la perte de N_2 lors d'une photo-irradiation à 350 nm (Murale et al., 2016). Cependant, on retrouve dans la littérature l'utilisation fréquente d'une photo-irradiation à 365 nm pendant des temps qui varient de 5 à 30 min (Gomes and Gozzo, 2010; MacKinnon and Taunton, 2009a; Park et al., 2016). Contrairement aux sondes azide, on n'observe pas une modification du spectre d'absorption des sondes diazirine après irradiation à 365 nm (figure 41). Ceci serait dû non pas à une absence de photosensibilité de la sonde, mais plutôt une absence de modification du noyau aromatique puisque la diazirine est fixée sur la chaîne aliphatique et non sur le noyau aromatique comme c'est le cas des sondes azide. Un temps moyen de 15 min d'irradiation à la lumière UV classiquement retrouvé dans la littérature (MacKinnon and Taunton, 2009) a été retenu pour la photoactivation des sondes diazirine. Le protocole utilisé pour le marquage des cibles protéiques est le même que celui utilisé pour les sondes azide.

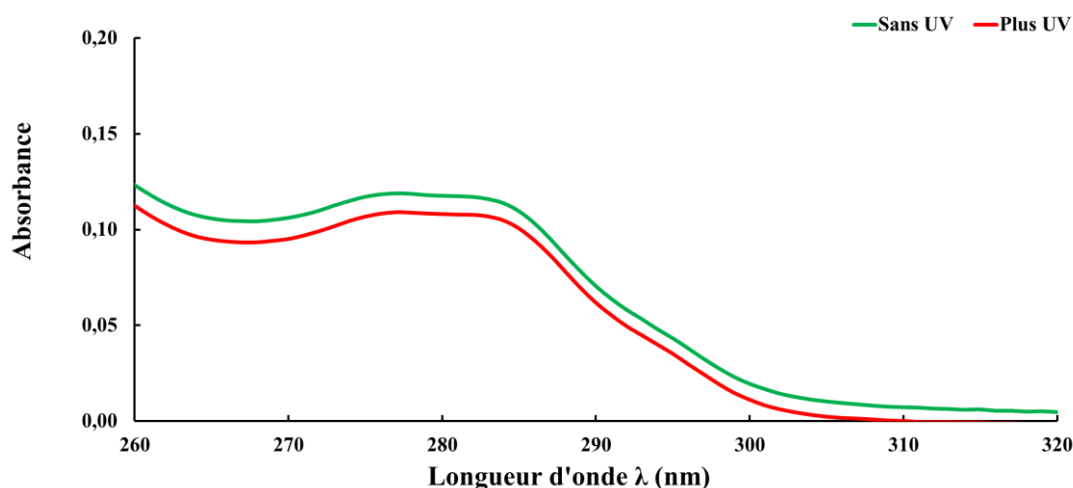
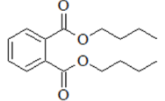
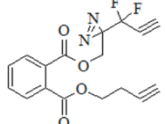
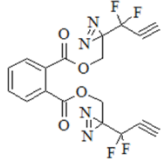
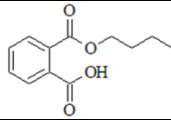
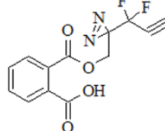


Figure 41 : Spectres d'absorption de la sonde diazirine 2 avec ou sans UV à 365 nm. Une concentration de 75 μM de la sonde a été préparée dans de l'éthanol absolu puis les spectres d'absorption ont été déterminés sans et avec irradiation UV pendant 15 min.

3.7 Propriétés physicochimiques des sondes diazirine

Le tableau 6 résume certaines propriétés physicochimiques pour les sondes diazirine et les ligands (DBP et MBP). Concernant les sondes diazirine (2 et 3), le K_{ow} augmente de 6% et 45% et la solubilité aqueuse baisse de 93% à presque 0% (0,07%) respectivement pour la diazirine 2 et 3 par rapport aux données de références du ligand DBP. La fonctionnalisation des sondes avec la difluoro-diazirine diminue fortement la solubilité des sondes par rapport aux sondes de type aryl-azide. De plus, les propriétés physicochimiques varient fortement entre la diazirine 2 et la diazirine 3. En ce qui concerne la sonde analogue au MBP (diazirine 1), son $\log K_{ow}$ augmente de 36% par rapport à celui du MBP et sa solubilité dans l'eau diminue de 98%.

Tableau VI : Propriétés physicochimiques des ligands DBP et MBP et des sondes diazirine AfBPP issues de synthèse chimique.

N°	ID molécule	Structure chimique	Log K _{ow} *	Solubilité dans l'eau** (mg/L)
1	Dibutyl phtalate (DBP)		4,61	2,351
2	sonde but-3-yn-1-yl [3-(1,1-difluoroprop-2-yn-1-yl)-3H-diazirine-3-yl]méthyl benzène-1,2-dicarboxylate (Diazirine 2)		4,87	0,1679
3	bis{[3-(1,1-difluoroprop-2-yn-1-yl)-3H-diazirine-3-yl]méthyl} benzène-1,2-dicarboxylate (Diazirine 3)		6,67	0,001657
4	Monobutyl phtalate (MBP)		2,84	125,7
5	Acide 2-([3-(1,1-difluoroprop-2-yn-1-yl)-3H-diazirine-3-yl]méthoxy)carbonyl)benzoïque (Diazirine 1)		3,87	2,43

*calculé avec le logiciel EPI Suite™; ** solubilité estimée (différent de solubilité expérimentale)

III.1.8. Validation *in vitro* des sondes diazirine photoactivables (diazirine 2 et 3)

III.1.8.1. Utilisation de protéines modèles (BSA et GST Pi) pour la validation des sondes diazirine

Le protocole de marquage utilisé ici est le même que celui décrit pour les sondes azide. Brièvement, les protéines sont incubées (aux concentrations indiquées) avec les différentes sondes, puis la photoactivation des sondes est réalisée avec la lumière UV à 365 nm pendant 15 min pour permettre la formation des adduits, tandis que les échantillons témoins sans irradiation sont protégés de la lumière. Après l'extraction des sondes libres, la ligation du tag fluorescent est réalisée par la réaction CuAAC suivie d'une élimination de l'excès en tag puis les protéines sont séparées sur SDS-PAGE.

Le premier critère de validation des sondes pour leurs utilisations dans l'approche AfBPP, est la vérification du marquage en présence de la sonde et d'une photoactivation à la lumière UV. La sonde diazirine 2 se fixe de manière covalente aux protéines (figure 42) indépendamment d'une irradiation à la lumière UV. Ce marquage en absence d'UV de sonde portant le groupe

photoactivable diazirine est très inhabituel et n'a jamais été rapporté dans la littérature scientifique. En ce qui concerne la sonde diazirine 3, elle marque très faiblement les protéines et ne permet donc pas de vérifier sa photosensibilité dans la limite des concentrations testées (< 100 μM). Les tests de saturation permettent de mieux apprécier ce faible marquage de la sonde diazirine 3 (figure 43).

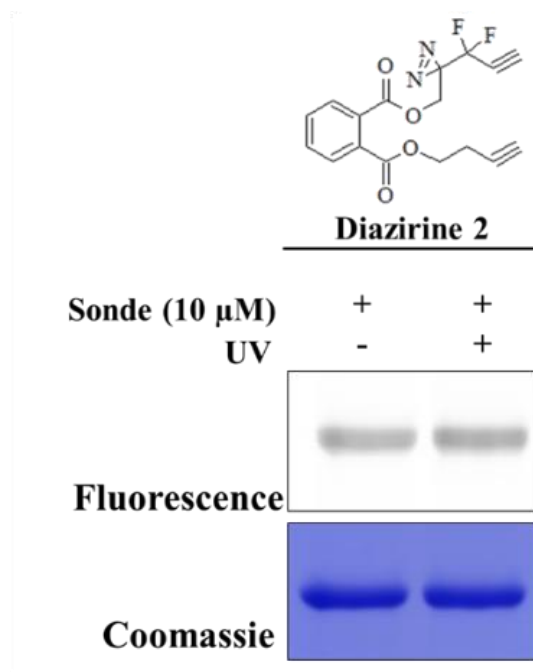


Figure 42: Marquage par photoaffinité de la BSA avec la sonde diazirine 2. La BSA a été incubée avec 10 μM de sonde (30 min), puis irradiée à l'UV pendant 15 min (365 nm) à l'exception des échantillons sans UV qui ont été protégés de la lumière. Le couplage du fluorochrome par chimie click aux adduits formés a ensuite été réalisé sur tous les échantillons et 5 μg de protéines ont été séparés sur SDS-PAGE. La prise d'image de la fluorescence a été faite avec un Imager TyphonTM FLA 9000 puis les gels ont été colorés au bleu de Coomassie, suivi d'une deuxième prise d'image en colorimétrie.

III.1.8.1.1. Evaluation de la saturation des sondes diazirine (2 et 3)

La saturation du marquage par les sondes diazirine a été étudiée en présence d'UV bien que nous avons précédemment observé une fixation en absence d'UV (figure 43). En effet, comme nous le montrerons plus tard (figure 45), le marquage covalent peut être néanmoins augmenté en présence d'une irradiation. La figure 43 montre qu'aucune des deux protéines modèles (BSA ou GST Pi) n'a été marquée par la diazirine 3 pour des concentrations comprises entre 10 nM et 100 μM (figure 43 A et B). Quant à la sonde diazirine 2, on note une augmentation du marquage de 320 % et 170 % respectivement pour la BSA et la GST Pi entre 10 μM et 100 μM (figure 43 B). Aucune saturation n'a été observée avec la sonde diazirine 2. Des concentrations intermédiaires entre 10 μM et 100 μM aurait peut-être permis d'observer les tendances à la saturation comme c'est le cas avec les sondes azide mais ces concentrations intermédiaires

n'ont pas été testées. L'absence de marquage avec la sonde diazirine 3 suggère une très faible affinité de cette sonde pour les deux protéines modèles testées. En raison de sa faible affinité pour les protéines modèles, la spécificité de marquage de la sonde diazirine 3 n'a été évaluée.

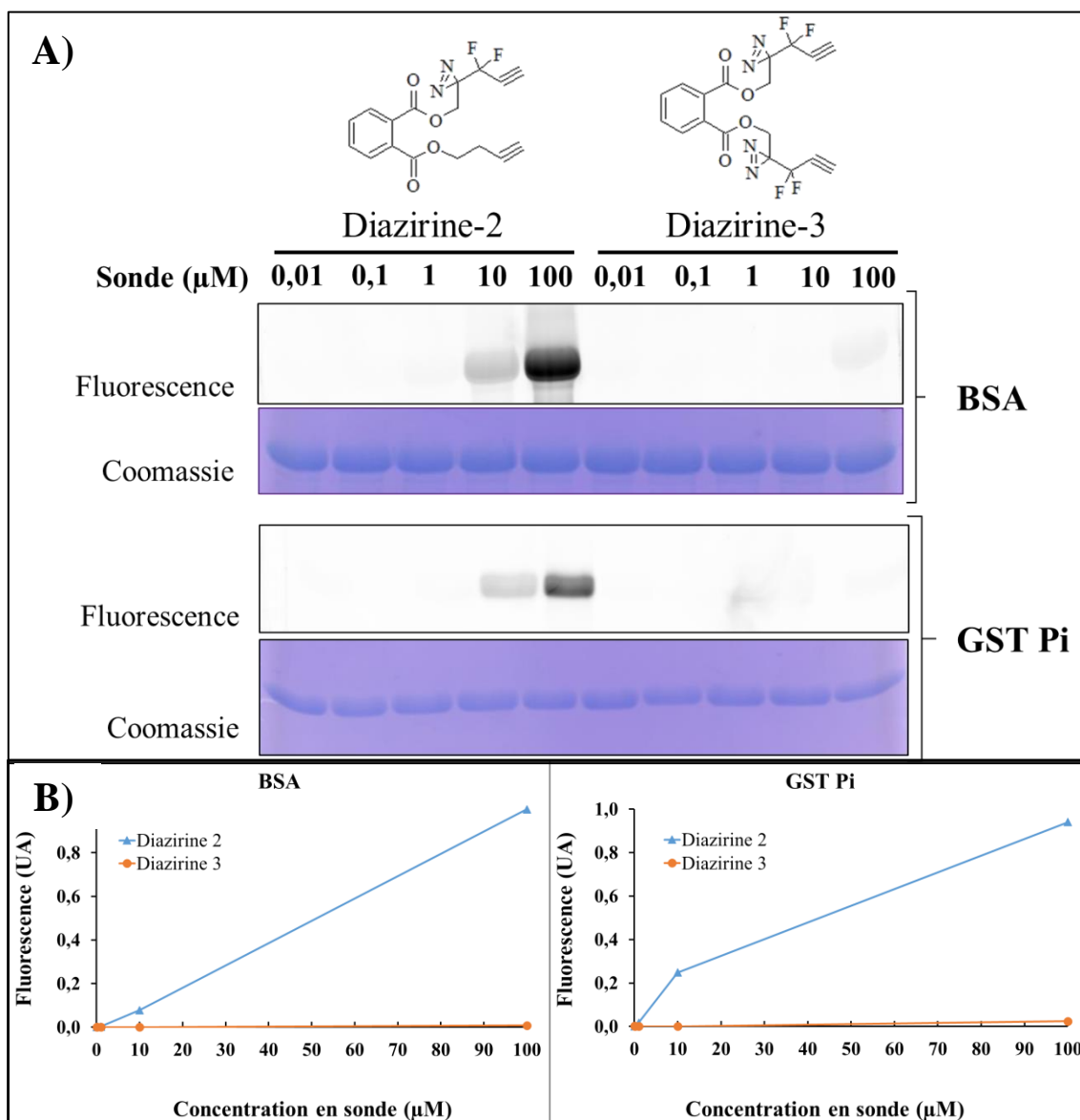


Figure 43: Marquage par photoaffinité avec les sondes diazirine. **A)** visualisation des protéines marquées sur SDS-PAGE ; **B)** quantification de la fluorescence des protéines marquées (valeurs de fluorescence normalisées par rapport à la quantité de protéine). Les protéines ont été incubées avec différentes concentrations en sondes (0,01 ; 0,1 ; 1 ; 10 et 100 μM) puis irradiées à l'UV (365 nm ; 15 min) ; la réaction de ligation par CuAAC a ensuite été réalisée pour coupler le tag fluorescent aux adduits puis les échantillons (5 μg /puits) ont été séparés sur SDS-PAGE.

III.1.8.1.2. Evaluation de la spécificité du marquage par la sonde diazirine 2

Pour rappel, aucune diminution du marquage compatible avec une compétition entre sonde et DBP n'a été observée avec l'utilisation des sondes azide (figure 36). Contrairement aux sondes

azide, une réduction du marquage est observée après une pré-incubation des protéines avec du DBP (figure 44 A). La quantification de la fluorescence avec ImageJ (suivie d'une normalisation avec la quantité de protéine dans chaque puits) a permis d'estimer cette réduction de marquage par rapport au témoin sans DBP (DMSO).

La réduction du marquage en présence du DBP est estimée à 90% entre le témoin (DMSO) et 1 mM de DBP (soit un rapport DBP/sonde de 100X), et à 50 % lorsque le rapport DBP/sonde est de 5X (figure 44 B). Nous avons donc des résultats cohérents avec une possible compétition entre la diazirine 2 et le DBP. De plus, on observe que le marquage covalent de la sonde en absence d'irradiation (figure 44, puits 1 et 2) est levé par la présence du ligand DBP (compétiteur). Cette observation suggère une possible fixation spécifique irréversible de la sonde dans le site de fixation du DBP indépendamment de l'irradiation.

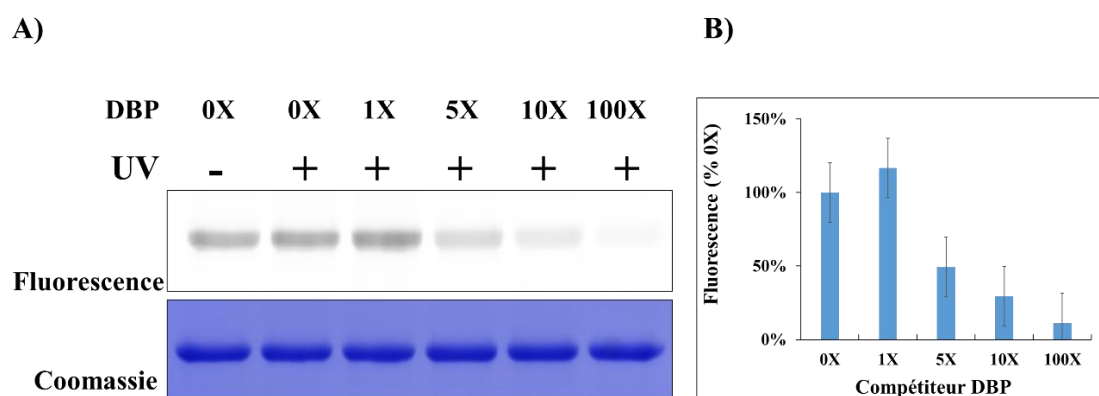


Figure 44 : Marquage compétitif entre le DBP et la sonde diazirine 2 pour le site de fixation sur la BSA. Dans un premier temps les protéines ont été incubées (15 min ; 37°C) avec différentes concentrations en DBP (10, 50, 100 et 1000 μ M), ou DMSO (échantillons témoins sans DBP). Dans un deuxième temps la sonde (10 μ M) a été ajoutée aux réactions puis les échantillons incubés à nouveau (15 min), avant d'être irradiés à l'UV (365 nm, 15 min ; 4°C), l'échantillon témoin sans UV n'a pas été irradié. La ligation avec un tag fluorescent a ensuite été réalisée sur tous les échantillons puis les profils visualisés sur SDS-PAGE (5 μ g/puits).

III.8.1.3. Evaluation de la cinétique du temps d'incubation du mélange protéine plus sonde

Pour tenter de comprendre l'origine de la fixation covalente de la diazirine 2 en absence d'irradiation UV, nous avons fait l'hypothèse que la fixation en absence d'UV serait favorisée par le temps d'incubation entre la protéine modèle et la sonde. Une cinétique du temps d'incubation pour le mélange protéine plus sonde a alors été testée. On observe sur la figure 45 (A) que les protéines sont marquées de manière covalente en absence d'UV, et que ce marquage est dépendant du temps d'incubation « sonde + BSA ». De plus, quel que soit le temps

d'incubation, on a toujours un marquage plus intense avec « + UV » par rapport à « - UV » (figure 45 B). Nous avons donc une combinaison de marquage covalent non-dépendant des UV et dans une moindre mesure dépendant des UV.

Cette liaison covalente de la sonde diazirine 2 en absence d'irradiation UV, pourrait être due au positionnement des 2 atomes de fluor adjacents au groupe fonctionnel diazirine pour améliorer le caractère photoactivable de la sonde (augmentation de la réactivité), ainsi qu'à la proximité de la diazirine avec le groupe fonctionnel $-(C=O)-O-$ (ester) du DBP (Korneev, 2011). Nous faisons donc l'hypothèse que la réactivité intramoléculaire des groupes fonctionnels présents sur la sonde ait favorisée une liaison covalente avec les cibles protéiques indépendamment d'une activation à la lumière (UV).

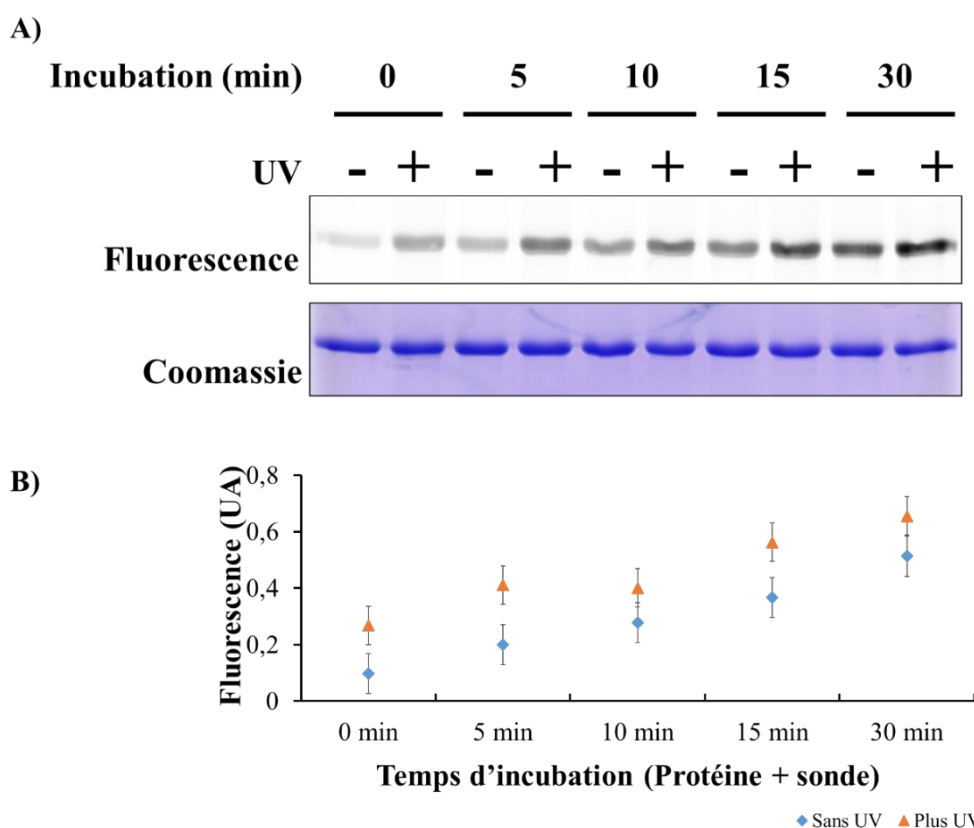


Figure 45 : Marquage de photoaffinité avec la sonde diazirine 2. La BSA a été incubée avec la sonde à différents temps (0, 5, 10, 15 et 30 min). Les échantillons destinés à l'irradiation l'ont été pendant 15 min à 365 nm, les autres ont été placés à l'abri de la lumière. La ligature avec un tag fluorescent a ensuite été réalisée sur tous les échantillons puis les profils visualisés sur SDS-PAGE (5 µg/puits). **A)** Image du SDS-PAGE en fluorescence et en colorimétrie ; **B)** Fluorescence quantifiée et normalisée par rapport à la quantité de protéine (avec et sans irradiation UV).

III.1.8.2. Utilisation d'homogénat protéique de poisson zèbre pour la validation des sondes diazirine

Les observations faites avec l'utilisation des protéines purifiées ont été validées avec l'homogénat protéique de poisson zèbre. Comme on peut le voir sur la figure 46, la sonde diazirine 2 (25 μM) se fixe de manière covalente à plusieurs protéines indépendamment d'une irradiation (figure 46 A). Quant à la diazirine 3, aucun marquage de protéines n'est observable sur SDS-PAGE comme c'est déjà le cas avec les protéines purifiées (BSA et GST Pi). Les observations faites avec les protéines purifiées se confirment donc avec l'utilisation de l'homogénat protéique de poisson zèbre pour les sondes diazirine.

De manière similaire à la BSA, le marquage covalent de la sonde diazirine 2 en absence d'irradiation est levé par la présence du ligand DBP (compétiteur potentiel) (figure 46 B, puits 1 et 3). En absence d'UV, la levée de la fixation covalente par le DBP est également observée (données non montrées). La possible compétition pour le site de fixation du DBP sur la BSA est également observée pour les protéines du protéome du poisson zèbre. Ceci permettrait de valider expérimentalement le fait que la sonde diazirine 2 est un analogue du DBP dont elle dérive.

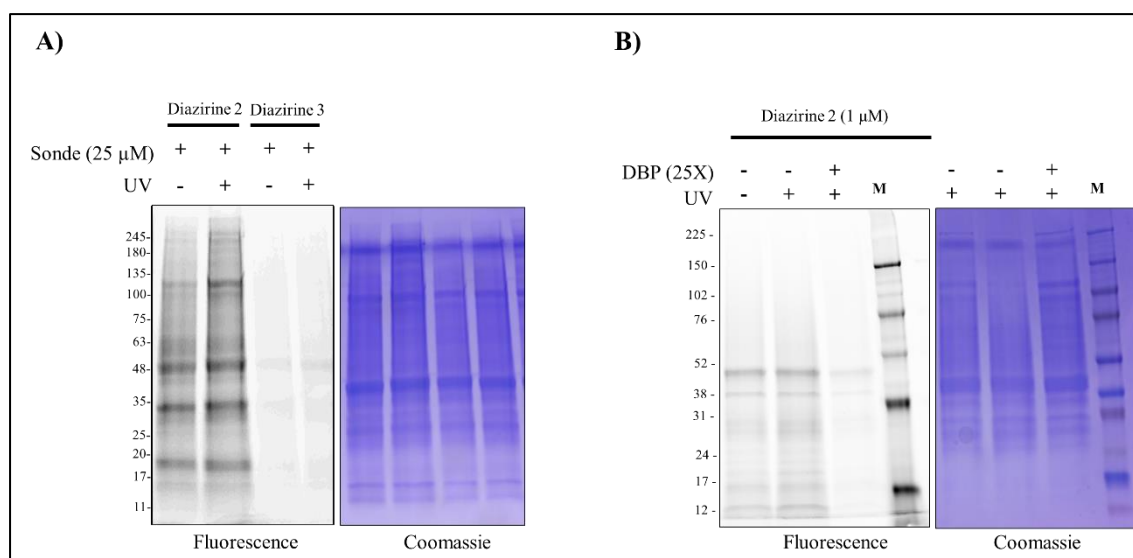


Figure 46 : Marquage de photoaffinité avec les sondes diazirine à partir d'homogénat protéique de poisson zèbre (les figures A et B représentent deux expériences indépendantes réalisées séparément). **A)** Utilisation des deux sondes diazirine avec et sans irradiation UV. Les protéines (150 μg) ont été incubées avec 25 μM de sonde pendant 30 min à 25°C (température ambiante), puis les échantillons « + UV » ont été irradiés à 365 nm pendant 15 min (4°C), tandis que les autres échantillons ont été conservés à 4°C à l'abri de la lumière ; **B)** Compétition entre le DBP et la sonde diazirine 2. L'homogénat a été incubé (30 min ; 25°C) avec 25 μM de DBP, du DMSO a été incubé avec les échantillons témoins (sans DBP), puis la sonde (1 μM finale) a été

ajoutée aux réactions et les échantillons incubés à nouveau (30 min), avant d'être tous irradiés à l'UV (365 nm, 15 min ; 4°C). Pour chacune des deux expérimentations (A et B), la ligation avec un tag fluorescent a été réalisée puis les profils visualisés sur SDS-PAGE (20 µg de protéine déposées par puits).

III.1.9. Bilan de la validation *in vitro* des sondes photoactivables

Les deux sondes azide sont photosensibles et donc marquent les protéines de façon dépendante d'une irradiation UV (365 nm, 15 min). De plus le marquage des cibles est dépendant de la concentration en sonde, et une tendance vers la saturation est également observée. Les sites de fixation des sondes aryl azide sur les protéines purifiées testées (BSA et GST Pi) sont considérés comme susceptibles d'être saturables. Cependant, aucune spécificité du marquage par rapport au site de fixation du DBP sur ces protéines n'a été observée. En absence d'une spécificité de marquage, il n'est pas pertinent de les utiliser pour cartographier les cibles protéiques du DBP chez le poisson zèbre. En ce qui concerne les sondes diazirine, nous avons observé que la diazirine-3 ne marquait pas du tout ou très faiblement (à de fortes concentrations ~ 100 µM) la BSA et la GST Pi. Quant à la diazirine 2 elle marque les protéines avec une bonne spécificité (possible compétition pour le site de fixation du DBP), mais génère des marquages en absence d'UV. Le marquage par photoactivation caractéristique de l'approche que nous utilisons n'est donc pas effectif avec la diazirine 2. Les résultats obtenus avec les protéines purifiées ont été confirmées avec l'utilisation de l'homogénat protéique de poisson zèbre. Nous détaillerons dans le cadre de la discussion et des perspectives de recherche les possibles conditions d'utilisation de ces sondes azido et diazirine.

III.2. Utilisation des sondes réactives aux hydrolases à sérines (ABPP)

III.2.1. Identification des protéines réactives aux sondes TAMRA-FP et dB-FP dans le protéome de poisson zèbre

III.2.1.1. Optimisation de la réactivité spécifique de la sonde TAMRA- FP : Cinétique de marquage

Nous avons utilisé des sondes d'hydrolases à sérine pour l'identification de ces enzymes dans les larves de poisson zèbre et la recherche de biomarqueurs d'exposition au DBP. Les sondes ABPP sont caractérisées par la réactivité de leur groupe électrophile vis-à-vis de leurs cibles protéiques. Pour le profilage des hydrolases à sérine (SHs) dans le protéome du poisson zèbre, nous avons opté pour l'utilisation de sondes disponibles dans le commerce (fournies par Thermo Scientific). Elles portent le fluorophosphonate (FP) comme groupe électrophile, et leur utilisation est très souvent rapportée dans la littérature scientifique car elles ont une réactivité et spécificité élevées vis-à-vis des SHs. Un temps d'incubation entre cibles protéiques et sonde compris entre 15 min et 30 min est recommandé par le fournisseur (à température ambiante), mais une prolongation de ce temps peut être nécessaire pour le marquage de certaines hydrolases à sérine suivant la réactivité intrinsèque des résidus sérine propre à chaque enzyme. Afin d'avoir un bon compromis sur le temps d'incubation à appliquer, nous avons fait une analyse cinétique du marquage par la sonde TAMRA-FP des protéines issues d'homogénats de poisson zèbre. D'une manière générale, le marquage des protéines est dépendant du temps d'incubation (figure 47). La différence de profil entre le marquage fluorescent et la coloration des protéines totales à l'aide du bleu de Coomassie suggère une sélectivité de la sonde vis-à-vis de certaines protéines présentes dans l'homogénat. Cette analyse cinétique montre également que plusieurs hydrolases à sérine réagissent à des vitesses différentes avec la sonde TAMRA-FP (figure 47, C). Toutefois, on observe une saturation du marquage des enzymes après 30 min d'incubation. Par conséquent, une incubation de 30 min peut être considérée comme optimale pour une réaction maximale entre la sonde et le protéome du poisson zèbre. De plus, le profil des protéines marquées à T_0 suggère que la sonde TAMRA-FP est très réactive vis-à-vis des hydrolases à sérine du protéome du poisson zèbre (la désactivation ou *quenching* de la réaction est effectuée immédiatement après ajout de la sonde à la solution protéique).

NB : la pureté des sondes commerciales est $\geq 85\%$, celle du DBP est de 99%.

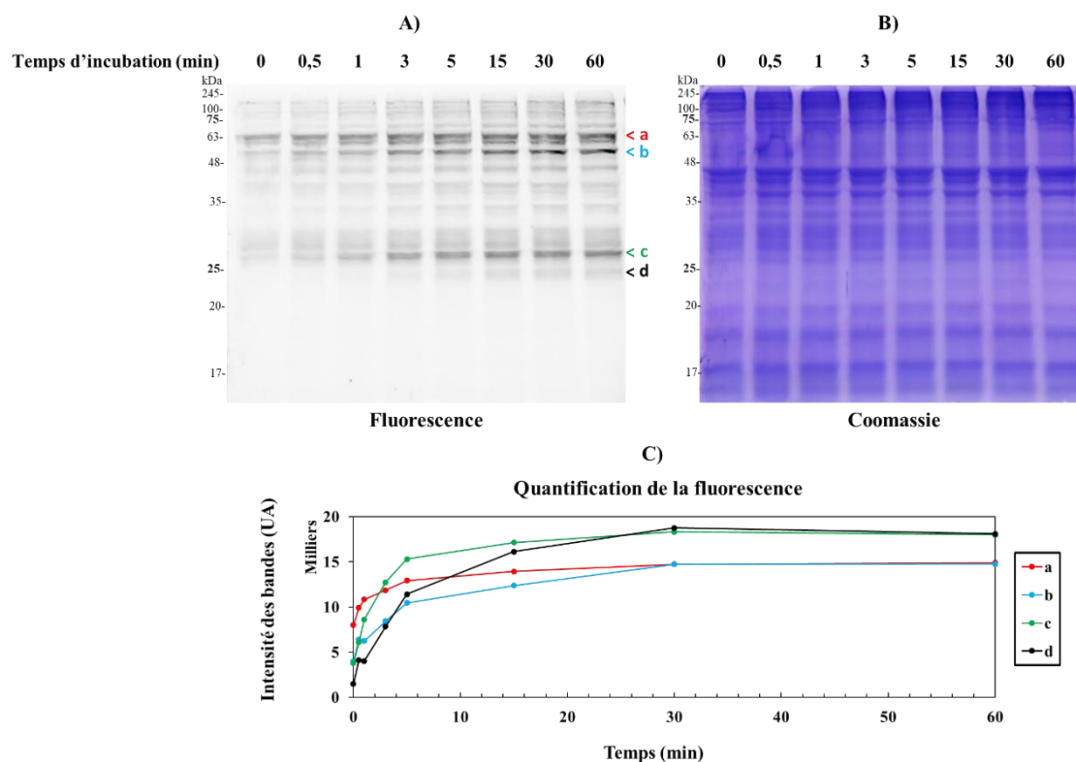


Figure 47 : Cinétique du temps d'incubation de la sonde TAMRA-FP avec l'homogénat protéique de poisson zèbre. Les protéines (100 µg) ont été incubées avec 2 µM de sonde et à 25°C dans un volume total de 50 µL pendant les temps indiqués, puis 50 µL de LB2X ont été ajoutés et les échantillons dénaturés pendant 5 min à 95°C. Les protéines (20 µg) ont ensuite été séparées par SDS-PAGE, suivi de la prise d'image de la fluorescence et de la coloration au bleu de Coomassie. A) image de la fluorescence (SHs marquées avec la sonde) ; B) image des protéines colorées au bleu de Coomassie ; C) quantification de la fluorescence avec ImageJ. Les flèches et les lettres indiquent les protéines dont la fluorescence a été quantifiée.

III.2.1.2. Optimisation de la réactivité spécifique de la sonde TAMRA- FP : influence de la concentration

Quelle que soit la concentration en sonde, les protéines lorsqu'elles sont dénaturées ne sont pas marquées (figure 48). En effet, la réaction de la sonde FP avec les SHs dépend de l'activité catalytique de ces enzymes (les résidus sérine catalytiques présentent une réactivité propre aux enzymes fonctionnelles), laquelle est inactivée par une dénaturation, d'où l'absence de marquage. A l'inverse des enzymes inactivées, les enzymes fonctionnelles sont marquées de manière dépendante de la concentration en sonde. La quasi-totalité des protéines marquées sont sensibles à la dénaturation et peuvent être considérées dans ce cas comme des cibles spécifiques aux sondes FP (Kidd et al., 2001). L'augmentation de l'intensité de la fluorescence des protéines marquées en fonction des concentrations croissantes en sonde indique que leurs réactivités ne sont pas saturées aux concentrations testées. Plusieurs SHs ne sont pas détectables

à faible concentration en sonde ($< 2 \mu\text{M}$). Cependant, l'utilisation d'une concentration en sonde de $5 \mu\text{M}$ donne un profil d'activité SH qualitativement similaire à celui observé avec $2 \mu\text{M}$ en sonde (pas de nouvelles SHs identifiées à $5 \mu\text{M}$), mais génère également un léger bruit de fond lorsque les protéines sont dénaturées. Par conséquent, nous avons retenu une concentration en sonde de $2 \mu\text{M}$, comme concentration optimale pouvant favoriser une réactivité spécifique avec le protéome de poisson zèbre.

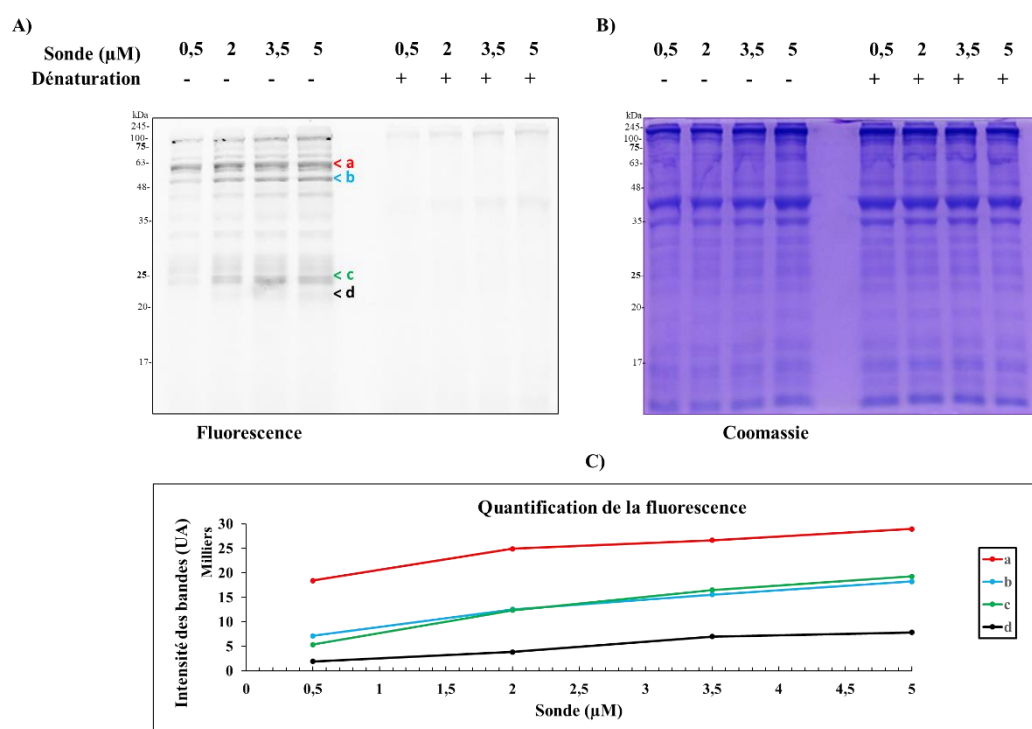


Figure 48 : Marquage des SHs de poisson zèbre avec des concentrations croissantes en sonde. Pour chaque concentration testée, un témoin « dénaturation » a été réalisé. La dénaturation a été réalisée en présence de 0,5 % SDS (v/v) ajouté aux échantillons, suivi d'une incubation à 95°C pendant 5 min. Tous les échantillons ($100 \mu\text{g}$ de protéine par échantillon) ont été incubés avec la sonde (concentration indiquée) dans un volume total de $50 \mu\text{L}$ pendant 30 min (25°C), puis $50 \mu\text{L}$ de LB2X ont été ajoutés et les échantillons dénaturés pendant 5 min à 95°C . Les protéines ($15 \mu\text{g}$) ont ensuite été séparées sur SDS-PAGE, suivi de la prise d'image de la fluorescence et de la coloration au bleu de Coomassie. A) image de la fluorescence (SHs marquées avec la sonde) ; B) image des protéines colorées au bleu de Coomassie ; C) quantification de la fluorescence avec ImageJ. Les flèches et les lettres indiquent les protéines dont la fluorescence a été quantifiée.

III.2.2. Marquage compétitif entre les deux sondes ABPP (TAMRA-FP et dB-FP)

Afin de nous assurer de la pertinence et de l'efficacité du marquage de la sonde dB-FP à utiliser pour la purification des hydrolases à sérine du protéome de poisson zèbre sur billes de streptavidine, nous avons réalisé un marquage compétitif avec la sonde TAMRA-FP. En plus du témoin sans compétiteur (dB-FP), un témoin composé de protéines dénaturées (puits 1 figure 49) a été réalisé. En présence de la sonde dB-FP, aucune hydrolase à sérine n'est marquée par la sonde TAMRA-FP. Les deux sondes portant le même groupe réactif, elles ont donc la même réactivité aux cibles enzymatiques du protéome de poisson zèbre, ce qui permet de valider la complémentarité des deux sondes en fonction de leur exploitation expérimentale (visualisation et purification des SHs).

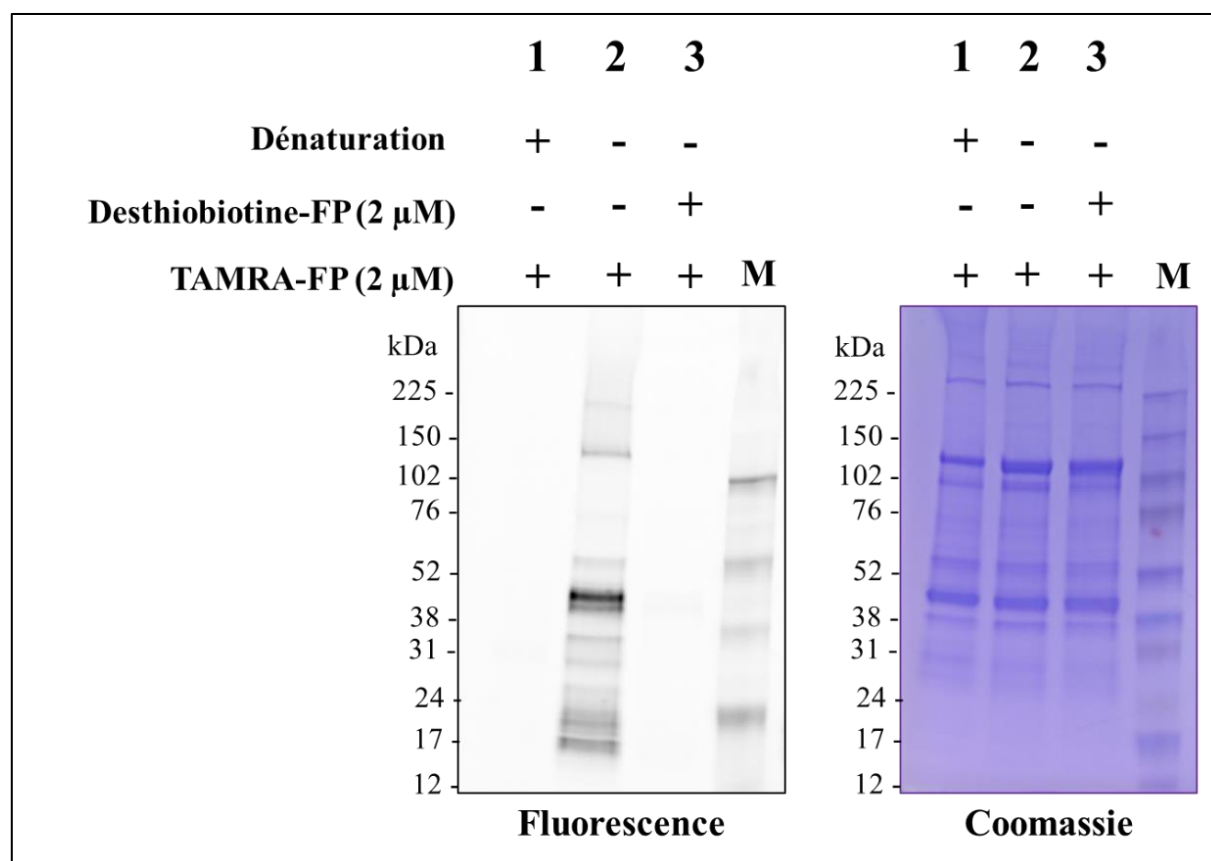


Figure 49 : Marquage compétitif entre la sonde couplée à la desthiobiotine et celle couplée au fluorochrome TAMRA. La dénaturation a été réalisée en ajoutant 0,5 % SDS (v/v) à l'échantillon 1, suivi d'une incubation à 95°C pendant 5 min puis retour à température ambiante. Pour les conditions d'ABPP compétitive, une pré-incubation (15 min, 25°C) des protéines (100 μ g) a été réalisée avec la sonde dB-FP (éch. 3) ou le DMSO (éch. 1 et 2) puis la sonde TAMRA-FP (2 μ M) a été ajoutée et les échantillons incubés à nouveau. Les réactions ont été arrêtées par ajout de 50 μ L de LB2X et les échantillons dénaturés pendant 5 min à 95°C avant d'être séparés sur SDS-PAGE (20 μ g /puits). **M**, marqueur de poids moléculaire.

III.2.3. Profilage des hydrolases à sérine dans les fractions protéiques solubles et membranaires des larves de poisson zèbre

Les conditions optimales de réactivité de la sonde TAMRA-FP (déterminées ci-dessus) ont été utilisées pour le profilage des hydrolases à sérine dans les fractions protéiques solubles et membranaires des larves de poisson zèbre. Pour cela, le protéome de larves de poisson zèbre (5 jpf) a été fractionné par ultracentrifugation (100.000 x g) pour l'obtention des fractions solubles et insolubles. Les fractions ont ensuite été traitées avec 2 μ M de TAMRA-FP puis incubées pendant 30 min à 25°C (conditions optimisées). Les SHs ont ensuite été séparées sur un SDS-PAGE puis visualisées. Les protéines marquées ont été détectées dans les deux fractions avec des signaux plus intenses dans la fraction soluble (figure 50). Les profils des SHs diffèrent d'une fraction à l'autre (figure 50) et confortent notre choix de les analyser séparément dans les analyses protéomiques décrites ci-dessous.

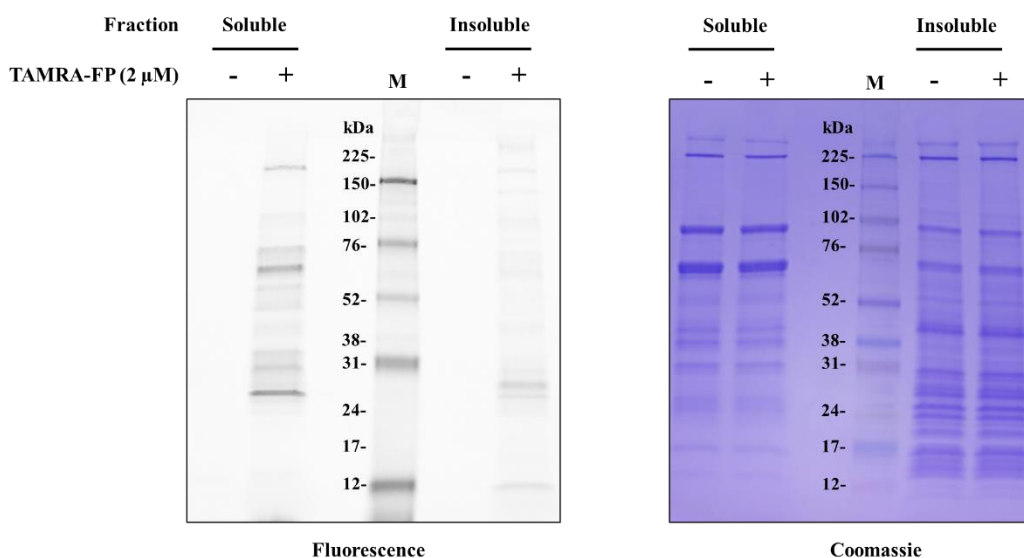


Figure 50 : Marquage des fractions protéiques (soluble et insoluble) de larves de poisson zèbre avec la sonde TAMRA-FP. Les protéines (25 μ g) ont été incubées (30 min, 25°C) avec 2 μ M de sonde puis 6,5 μ L de LB5X ont été ajoutés et les échantillons dénaturés pendant 5 min à 95°C. Les protéines (13 μ g) ont ensuite été séparées sur SDS-PAGE, suivi de la prise d'image de la fluorescence et de la coloration au bleu de Coomassie. **M**, marqueur de poids moléculaire

III.2.4. Détection des protéines réactives à la sonde dB-FP par SDS-PAGE couplée au Western blot

La sonde dB-FP n'étant pas couplée à un fluorochrome mais à la desthiobiotine, la visualisation des protéines marquées peut être alors réalisée par Western blot. Il s'agit d'une visualisation indirecte des protéines marquées avec des complexes d'avidine-peroxydase de raifort (ou streptavidine-HRP) et des substrats de chimiluminescence (ECL). Un protocole de Western blot a donc été optimisé avec l'utilisation de la streptavidine-HRP. Son intérêt principal réside dans sa grande sensibilité et adaptabilité en termes de détection. Malgré la forte présence de marquage aspécifique (ou lié à la biotinylation endogène – que nous regroupons aussi sous le terme de « marquage aspécifique » dans ce manuscrit) comme on peut le voir avec le témoin sans sonde, il est néanmoins possible de distinguer le marquage spécifique dû au couplage de la sonde dB-FP avec les hydrolases à sérine (figure 51).

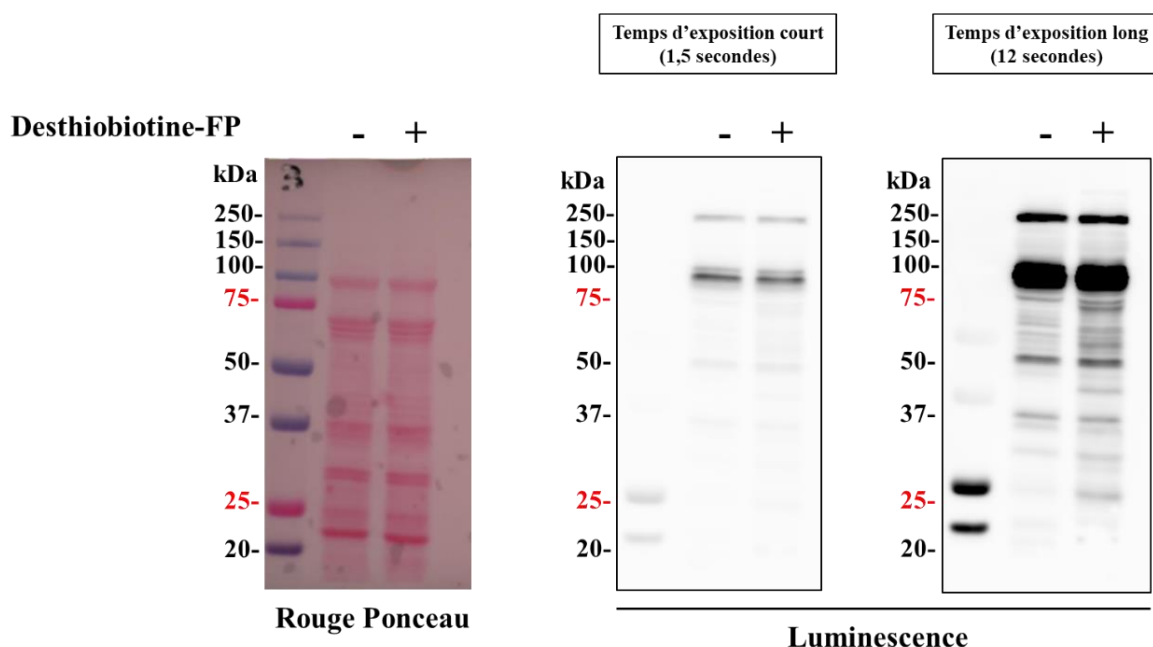


Figure 51 : Marquage de la fraction protéique soluble de larves de poisson zèbre avec la sonde dB-FP détecté par Western blot. Les protéines (100 μ g) ont été incubées (60 min, 25°C) avec 2 μ M de sonde puis 12,5 μ L de LB5X ont été ajoutés et les échantillons dénaturés pendant 5 min à 95°C. Les protéines (16 μ g) ont ensuite été séparées par SDS-PAGE puis révélées par Western blot avec la streptavidine-HRP (dilution 1/3000).

III.2.5. Optimisation d'une méthode de purification des protéines FP-biotinylées avec l'utilisation de billes magnétiques couplées à la streptavidine

Contrairement à l'analyse sur gel avec la sonde TAMRA-FP qui permet de visualiser ~10 à 20 enzymes marquées par gel, l'ABPP associée à la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) permet d'identifier et de quantifier (méthode

semi-quantitative) un nombre plus important d'enzymes actives (plusieurs dizaines à quelques centaines d'enzymes) dans un grand nombre d'échantillons protéomiques. L'analyse par LC-MS/MS demande au préalable une étape de purification des protéines cibles (marquées). Cette purification d'affinité permet de séparer les cibles protéiques desthiobiotinylées du reste du protéome lors de l'analyse par LC-MS/MS. Des billes magnétiques couplées à la streptavidine ont été utilisées pour la purification d'affinité des enzymes desthiobiotinylées par la sonde dB-FP. L'utilisation de ces billes permettant l'isolement directe et rapide des molécules (desthio)biotinylées a fait l'objet d'une optimisation. Ainsi les expériences d'optimisation ont permis de déterminer le type (parmi 4 choix possibles disponibles commercialement) et la quantité optimale de billes à utiliser (résultats non montrés). De plus, plusieurs tampons d'éluion ont été testés afin de choisir le meilleur compromis en termes de quantité et de spécificité de protéines desthiobiotinylées. Le protocole optimisé final est celui décrit dans le chapitre « matériels et méthodes ».

On observe une présence de protéines marquées de manière aspécifique (ou biotinylées, voir ci-dessus) dans l'échantillon témoin sans sonde après purification (figure 52). Ces fixations aspécifiques sont souvent rapportées lorsque des billes couplées à la streptavidine sont utilisées pour la purification (Liu et al., 1999). Malgré la présence de ce bruit de fond, une différence de profil entre échantillons témoins et échantillons traités à la sonde est observée (figure 52). Le profil des protéines purifiées est similaire à celui obtenu avec le marquage couplé au Western blot (figure 51). La qualité des éluats obtenus par ce protocole optimisé semble ainsi satisfaisante. Une analyse par LC-MS/MS pourrait donc permettre d'identifier les hydrolases à sérine présentes dans le protéome de poisson zèbre. Compte-tenu du marquage aspécifique obtenu, la réalisation de contrôles adaptés sera nécessaire pour l'analyse en LC-MS/MS afin de séparer les protéines marquées spécifiquement du marquage aspécifique.

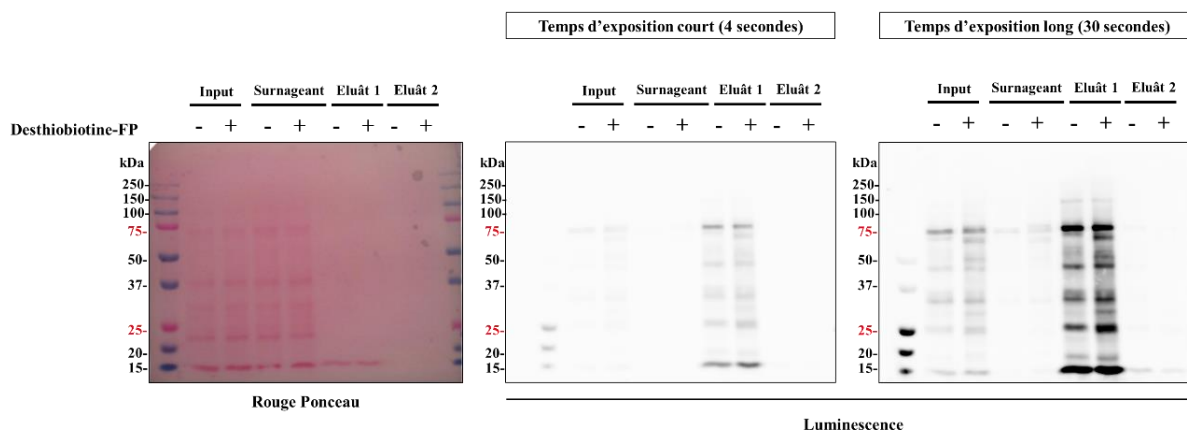


Figure 52 : Purification des protéines (fraction soluble) marquées à la dB-FP avec des billes magnétiques couplées à la streptavidine. Les protéines (1000 μ g) ont été incubées (60 min, 25°C) avec 2 μ M de sonde. Une précipitation à l'acétone froid a ensuite été réalisée pour éliminer l'excès en sonde puis les adduits (Input) ont été incubés avec des billes magnétiques couplées à la streptavidine. Avec un portoir magnétique, les adduits fixés aux billes ont été séparés du surnageant, puis les billes lavées avant l'élution des protéines purifiées (éluât 1). Une deuxième élution (éluât 2) a été réalisée pour s'assurer de l'efficacité de la première élution. Les différents échantillons ont ensuite été séparés sur SDS-PAGE suivi d'un Western blot.

Malgré la faible quantité de protéines obtenue dans la fraction membranaire (150 μ g pour 100 larves âgées de 5 jpf), une purification satisfaisante des protéines marquées par la sonde dB-FP est observée (figure 53). Ces données suggèrent que les cibles enzymatiques des deux fractions peuvent être identifiées en utilisant une combinaison de protocole d'enrichissement (purification par l'utilisation des billes magnétiques de streptavidine) et d'analyse par LC-MS/MS.

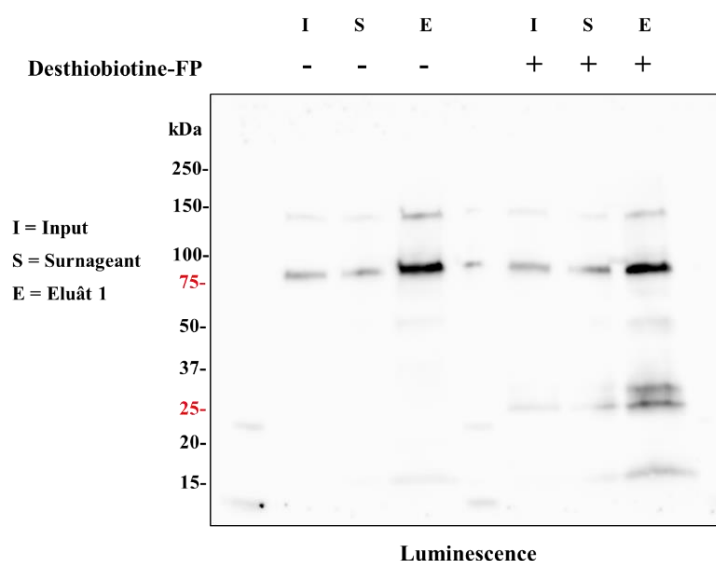


Figure 53 : Purification des protéines (fraction insoluble) marquées avec la dB-FP à l'aide des billes magnétiques couplées à la streptavidine. Les protéines (150 µg) ont été incubées (60 min, 25°C) avec 2 µM de sonde. Une précipitation à l'acétone froid a ensuite été réalisée pour éliminer l'excès en sonde puis les adduits (Input, **noté I**) ont été incubés avec des billes magnétiques couplées à la streptavidine. Avec un portoir magnétique, les adduits fixés aux billes ont été séparés du surnageant (**noté S**), puis les billes lavées avant l'éluion des protéines purifiées (éluât 1, **noté E**). Les différents échantillons ont ensuite été séparés sur SDS-PAGE suivi d'un Western blot.

III.2.6. Identification des SHs du protéome de poisson zèbre inhibées par le DBP *in vitro* par une ABPP compétitive

L'interaction du DBP avec des hydrolases à sérine telles que la trypsine a été rapporté par Chi et al., (2017). Le DBP est en effet l'un des esters de phtalate ligand de cette enzyme dont la fixation à proximité de la triade catalytique entraîne une inhibition compétitive de l'activité de la trypsine (Chi et al., 2017a). Cette interaction a été rapportée par l'utilisation de techniques multi-spectroscopiques et de modélisation moléculaire. Nous postulons que l'utilisation de l'approche ABPP peut permettre d'explorer à l'échelle du protéome d'un organisme les SHs inhibées par le DBP selon le principe décrit ci-dessous (compétition du DBP vis-à-vis du marquage des SHs par la sonde TAMRA-FP). Ce faisant, nous postulons que nous pourrions rapporter de nouvelles identifications de SHs interagissant avec le DBP afin d'éclairer la compréhension de ses modes d'actions.

Dans le but de tester cette hypothèse, une ABPP compétitive a été réalisée entre DBP et TAMRA-FP. Le DBP étant une molécule sans groupe électrophile *a priori* suffisamment réactif

(ester), elle est considérée comme un inhibiteur réversible contrairement au fluorure de phénylméthylsulfonyl (PMSF) utilisé en tant qu'inhibiteur irréversible des protéases à sérine (témoin). L'expérience d'ABPP compétitive avec un inhibiteur réversible nécessite des conditions cinétiquement contrôlées où le marquage par la sonde des cibles enzymatiques n'est pas encore achevé (Cravatt et al., 2008). Conformément aux résultats de la cinétique (figure 47), un temps d'incubation de 5 min a été choisi. Les protéines ont été pré-incubées avec le DBP (2 μ M à 20 mM), le PMSF (2 mM) ou le DMSO (solvant) à 37°C pendant 30 min puis la sonde TAMRA-FP (2 μ M) a été ajoutée aux réactions et les échantillons incubés pendant 5 min. Compte tenu du faible signal obtenu avec la fraction insoluble, la compétition avec le DBP a été testée uniquement avec la fraction soluble.

Aucune des concentrations en DBP testées ne réduit le marquage des cibles protéiques en présence de la sonde, suggérant une absence d'inhibition détectable du marquage par compétition quelle que soit la concentration en DBP utilisée dans ces conditions expérimentales. Par contre, la compétition *in vitro* entre le PMSF (un inhibiteur irréversible de protéases à sérine) et la TAMRA-FP conduit bien à une inhibition de plusieurs SHs putatives (figure 54).

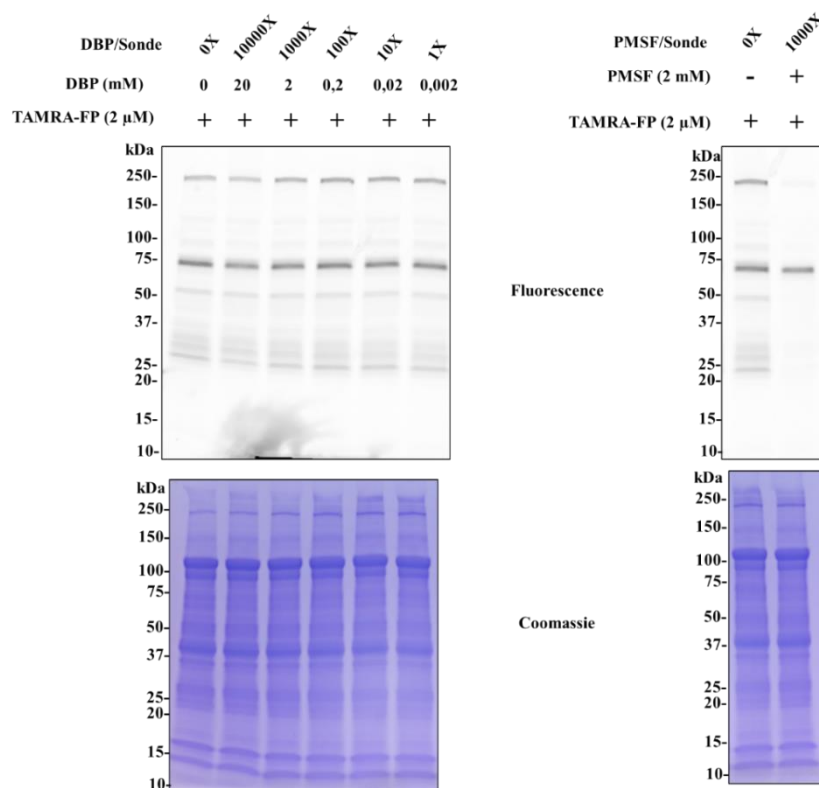


Figure 54 : ABPP compétitive *in vitro* entre la sonde dB-FP et le DBP (gel de gauche), et le PMSF (gel de droite). La fraction protéique soluble de larves de poisson zèbre a été pré-incubée avec le DBP (2 μ M à 20 mM), le PMSF (2 mM) ou le DMSO (solvant) à 37°C pendant 30 min

puis la sonde TAMRA-FP (2 μM) a été ajoutée aux réactions et les échantillons incubés pendant 5 min. Les protéines ($\sim 15 \mu\text{g}$) ont été séparées sur SDS-PAGE puis les images de fluorescence et colorimétrie ont été prises.

Dans une autre expérience, nous avons réduit la concentration en sonde et augmenté celle en DBP faisant passer le ratio DBP/sonde à un maximum de 30000 (figure 55). A 30 mM de DBP (ratio DBP/Sonde de 30000) on observe la diminution du marquage par le TAMRA-FP de $\sim 100\%$ et $\sim 60\%$ respectivement des hydrolases à sérine autour de 55 kDa et 20 kDa (double flèche rouge figure 55). De plus à cette même concentration, on observe le marquage supplémentaire d'une enzyme autour de 125 kDa (flèche simple rouge figure 55). Le prétraitement du protéome de poisson zèbre avec une très forte concentration en DBP conduit donc à une modification de la réactivité de la sonde TAMRA-FP avec les hydrolases à sérine.

Pour résumer, le DBP inhiberait la réactivité de certaines hydrolases à sérine vis-à-vis de la sonde TAMRA-FP mais à de très fortes concentration (30 mM). Cette concentration de 30 mM est largement au-dessus de la limite de solubilité aqueuse du DBP qui est de 11,2 mg/L ($\sim 40 \mu\text{M}$) (Peijnenburg, 2008b). De plus ces concentrations élevées en DBP pourraient induire des modifications dans la structure moléculaire fonctionnelle des protéines (par exemple une dénaturation) qui pourraient affecter la réactivité de la sonde TAMRA-FP. Notons que ces expériences de compétition par ABPP sont limitées par la faible résolution sur SDS-PAGE, notamment concernant la séparation de polypeptides de taille voisine, et par la possibilité de ne visualiser qu'un faible nombre de protéines. L'apparition d'un marquage à $\sim 125 \text{ kDa}$ par la sonde en présence du même excès de DBP (figure 55) devra aussi être confirmée. L'analyse des échantillons par LC-MS/MS pourrait permettre d'approfondir les résultats mais l'usage de concentration élevée en DBP ne semble pas pertinent au regard des arguments évoqués ci-dessus.

Nous avons alors choisi de nous orienter vers une approche alternative par le biais d'expériences *in vivo* pour tenter d'identifier les SHs perturbées par une exposition des larves de poisson zèbre à des concentrations environnementales de DBP.

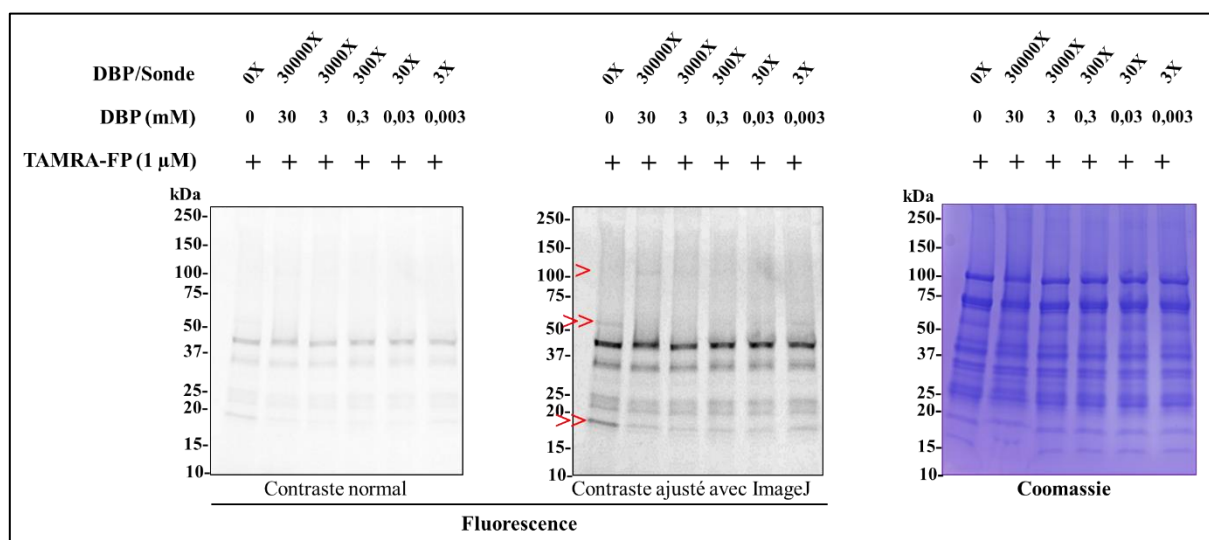


Figure 55 : ABPP compétitif *in vitro* entre la sonde dB-FP et le DBP. La fraction protéique soluble de larves de poisson zèbre a été pré-incubée avec le DBP (3 μ M à 30 mM), ou le DMSO (solvant) à 37°C pendant 30 min puis la sonde TAMRA-FP (1 μ M) a été ajoutée et les échantillons incubés pendant 5 min. Les protéines (~15 μ g) ont été séparées sur SDS-PAGE puis les images de fluorescence et colorimétrie ont été prises. La flèche simple indique la protéine marquée uniquement en présence d'une forte concentration de DBP. Les doubles flèches indiquent les protéines dont le marquage est inhibé par un excès de DBP.

III.2.7. Identification des SHs dans le protéome des larves de poisson zèbre exposées au DBP

L'objectif de cette partie est d'annoter les hydrolases à sérines du protéome de poisson zèbre et identifier/quantifier (méthode semi-quantitative) celles dont l'expression est perturbée suite à une exposition au DBP. Afin de tenir compte de la variabilité des réponses biologiques en fonction de l'approche méthodologique utilisée, nous avons associée à l'ABPP la mesure d'autres biomarqueurs connus par deux autres approches classiques que sont la mesure de l'expression des gènes par RT-qPCR et l'activité enzymatique de l'AChE.

III.2.7.1. Influence du DBP sur la mortalité et anomalies de développement au cours de l'exposition des larves

Des observations journalières ont été réalisées afin d'enregistrer et d'écarter les embryons non viables au cours de l'exposition (tableau VII). Une moyenne de 2% de mortalité des embryons a été enregistrée. Le test de comparaison des moyennes (*t*-test, $p > 0,05$) n'a mis en évidence aucune différence statistiquement significative entre les 3 conditions d'exposition concernant cette mortalité. Les taux d'éclosion des œufs étaient de 1,3% ; 69% et 96% respectivement à 72 hpf, 96 hpf et 120 hpf, aucune différence statistiquement significative n'a été observée entre les

trois conditions (*t*-est, $p > 0,05$). Le DBP ne semble pas avoir influencé la survie des organismes et causé des retards de développement des embryons de poisson zèbre au cours des expositions.

NB : Pour rappel, le dosage des milieux d'exposition des larves n'a pas été réalisé. Les concentrations indiquées dans ce document sont des concentrations nominales. Cependant, les échantillons de milieu ont été prélevés au cours de l'exposition et conservés pour un dosage ultérieur.

Tableau VII : Mortalité et anomalies de développement au cours de l'exposition des larves

		J ₀	J ₀ + 1	J ₀ + 2	J ₀ + 3	J ₀ + 4	J ₀ + 5	Mortalité (total)	% Mortalité	% éclosion			
											72 hpf	96 hpf	120 hpf
Témoin (DMSO)	Réplicat 1	200	5	0	0	0	0	5	3%	0%	41%	90%	
	Réplicat 2	200	3	1	0	0	0	4	2%	5%	75%	98%	
	Réplicat 3	200	4	0	0	0	0	4	2%	1%	76%	96%	
	Réplicat 4	200	1	2	0	0	0	3	2%	0%	70%	98%	
Témoin_Moyenne		200	3.25	0.75	0	0	0	4 (± 0.8)	2% (± 0.4)	1% (± 2)	65% (± 16)	95% (± 4)	
5 µg/L DBP (C5)	Réplicat 1	200	2	1	0	0	0	3	2%	1%	69%	94%	
	Réplicat 2	200	4	0	0	0	0	4	2%	2%	75%	98%	
	Réplicat 3	200	3	1	0	0	0	4	2%	2%	63%	96%	
	Réplicat 4	200	2	2	0	0	0	4	2%	0%	61%	97%	
C5_Moyenne		200	2.75	1	0	0	0	3.75 (± 0.5)	2% (± 0.3)	1% (± 1)	67% (± 6)	96% (± 2)	
100 µg/L DBP (C100)	Réplicat 1	200	1	1	0	0	0	2	1%	0%	88%	97%	
	Réplicat 2	200	8	2	0	0	0	10	5%	2%	71%	95%	
	Réplicat 3	200	3	1	2	0	0	6	3%	5%	77%	97%	
	Réplicat 4	200	1	0	0	0	0	1	1%	0%	69%	98%	
C100_Moyenne		200	3.25	1	0.5	0	0	4.75 (± 4.1)	2% (± 2.1)	2% (± 2)	76% (± 9)	96% (± 1)	

III.2.7.2. Dosage de l'activité AChE

Afin d'évaluer l'effet neurotoxique du DBP dans nos conditions expérimentales, l'activité AChE a été mesurée. En effet, la réduction de l'activité de l'AChE est souvent utilisée comme biomarqueur de neurotoxicité chez plusieurs espèces de poissons dont le poisson zèbre (Xu et al., 2013b). Tenant compte du fait que cette enzyme peut exister sous une forme moléculaire dans les cellules qui est à la fois liée à la membrane et sécrétée (Rotundo and Fambrough, 1980; Szegletes et al., 1995), des mesures ont été effectuées sur des fractions protéiques solubles et insolubles. L'activité de l'AChE est en moyenne 7 fois plus élevée dans les fractions insolubles par rapport aux fractions solubles (figure 56). Aucune réduction statistiquement significative de l'activité de l'AChE n'a été observée dans les fractions soluble et membranaire (insoluble) après l'exposition au DBP (t -test, $p > 0,05$).

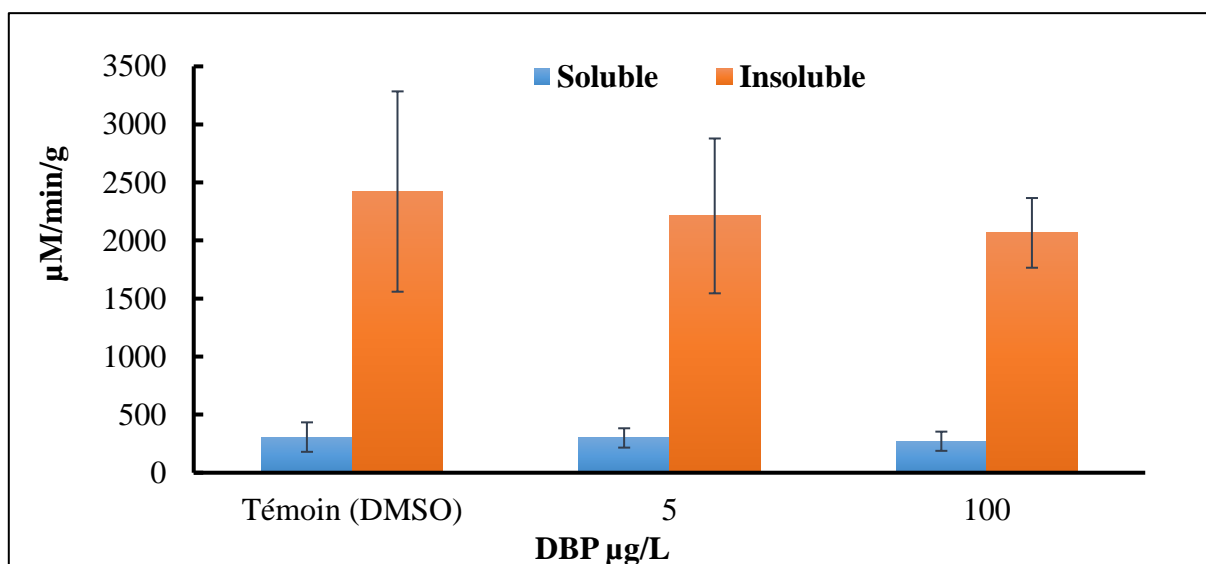


Figure 56. Activité de l'AChE chez des larves de poisson zèbre (*D. rerio*) exposées à différentes concentrations de DBP (0, 5 et 100 µg/L) pendant 5 jours. Les mesures ont été effectuées sur les fractions protéiques solubles et insolubles. Les résultats sont la moyenne \pm écart-type des échantillons de chaque condition. Pour les témoins (DMSO), l'activité AChE était de 307 µM/min/g (\pm 127) et 2422 µM/min/g (\pm 863) respectivement pour les fractions solubles et insolubles. Le t -test de Student a été utilisé pour déterminer les différences statistiques entre les groupes expérimentaux. La signification a été établie à $p < 0,05$ dans tous les cas.

III.2.7.3. Expression des gènes cibles par qRT-PCR après exposition au DBP

La modification de l'expression de 3 gènes en lien avec l'effet de perturbation endocrinienne du DBP a été évaluée par RT-qPCR. Dans cette étude, il n'y a pas de différence significative dans l'expression relative de la *17 β -hsd* et l'*Acox-1* ($p > 0,01$) entre les 3 conditions (0, 5 et 100 µg/L de DBP). Une diminution significative de la *vtg 7* (de 2 fois) est observée pour la

concentration 100 µg/L de DBP comparé au témoin DMSO (Figure 57). Bien que ces différences ne soient pas statistiquement significatives, il y a une tendance à la baisse du niveau relatif d'ARNm de *17β-hsd* et une tendance à la hausse du niveau relatif d'ARNm de l'*Acox-1* chez les larves exposées à 100 µg/L de DBP par rapport au témoin. Aucune variation du niveau d'expression relatif des 3 gènes n'est observée chez les larves exposées à 5 µg/L de DBP par rapport au témoin.

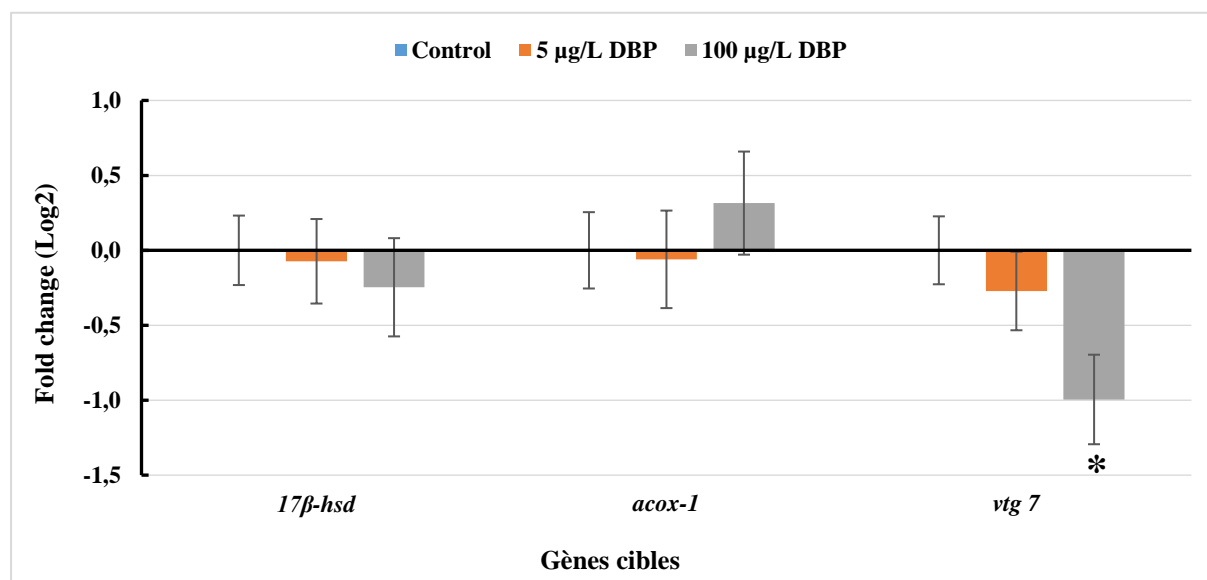


Figure 57. Perturbation de l'expression de trois gènes cibles (ACOX1, 17β-HSD, VTG 7) mise en évidence par RT-qPCR chez des larves de poisson zèbre exposées à différentes concentrations de DBP (0, 5 et 100 µg/L) pendant 5 jours. Les valeurs de CT de chaque gène d'intérêt ont été normalisées par rapport à l'expression des gènes de ménage (rp113a et EF1a) par l'utilisation de la méthode $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak and Schmittgen, 2001). Les résultats sont donnés sous forme de moyenne +/- écart-type (n= 4) pour chaque groupe de traitement. L'astérisque montre une différence statistiquement significative ($p < 0,01$) entre les larves témoins et exposées.

III.2.7.4. Annotation des SHs dans le protéome des larves de poisson zèbre

En raison de sa sensibilité pour l'identification des cibles protéiques, une technique d'analyse « gel-free ABPP » a été utilisée. Les échantillons provenant de chacun des trois traitements (témoin DMSO, 5 et 100 µg/L de DBP, C5 et C100 respectivement) ont été analysés pour identifier et quantifier les SHs. Pour cela, les fractions protéiques (soluble et insoluble) de chaque échantillon ont été marquées par la sonde dB-FP suivi d'une purification sur billes magnétiques couplées à la streptavidine. Les cibles fixées aux billes ont été éluées et digérées à la trypsine avant d'être analysées à la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de

masse en tandem (LC-MS/MS) avec une méthode semi-quantitative dans le cadre d'une collaboration avec la plateforme protéomique 3P5 de l'Université Paris-Descartes.

Des échantillons de chacun des trois traitements (contrôle DMSO, 5 et 100 µg/L DBP) ont été analysés pour identifier et quantifier les SHs par LC-MS/MS. Les protéines d'intérêt ont été identifiées avec une grande confiance sur la base des critères suivants :

- (1) Absent dans les échantillons sans sonde (DMSO) et présent dans les échantillons marqués avec sonde (dB-FP), (2) dans les échantillons marqués avec sonde (dB-FP), présence dans au moins 3 des 4 réplicats, c'est-à-dire présent dans 2 des 4 réplicats avec au moins 2 peptides uniques et au moins 1 peptide unique dans un troisième réplicat.
- Lorsque des protéines sont présentes dans les échantillons sans sonde, (3) une différence significative $p < 0,05$ (*t*-test) entre les échantillons marqués avec sonde (dB-FP) et les échantillons sans sonde (DMSO), (4) une abondance au moins 2 fois plus élevée dans les échantillons marqués avec sonde que dans les échantillons sans sonde (DMSO). Le Log₂ LFQ a été utilisé pour la comparaison avec le test *t*.

En considérant ces critères, 50 hydrolases à sérine ont été identifiées dans les échantillons provenant des conditions « C100 » et « contrôle » et 53 dans la condition « C5 » (tableau VIII et figure 58). Parmi celle-ci, 49 sont communes aux trois conditions soit 92,45% du total des SHs identifiées. Trois autres protéines autres que les hydrolases à sérine ont été également identifiées. Il s'agit de « chloride intracellular channel 3 » (Clic3 : E7F4S2_DANRE) enrichie avec une confiance élevée dans la condition C5, de « alpha-2-macroglobulin-like » (A2ml : A0A0R4IDD1_DANRE), un inhibiteur des protéases à sérine identifiée avec une confiance élevée dans les trois conditions (tableau VIII) et de la sous-unité « Collagen-like tail (single strand of homotrimer) » de l'acétylcholinestérase asymétrique (Colq : F1Q7Y1_DANRE). Cette dernière encore appelée collagène associé à l'acétylcholinestérase (sous-unité AChE Q) a été spécifiquement identifiée dans la fraction protéine membranaire des larves de poisson zèbre. Elle est principalement (sinon exclusivement) responsable de la présence au niveau des jonctions neuromusculaires de l'acétylcholine estérase (AChE) (Bernard et al., 2011). Aucune de ces protéines n'est différentiellement exprimée en fonction des conditions d'exposition.

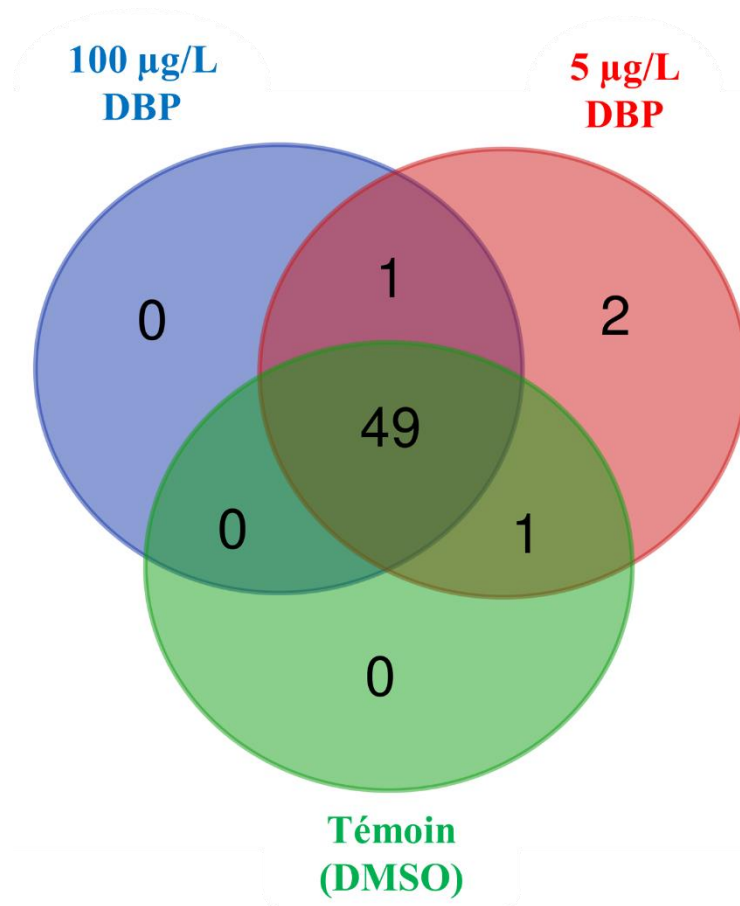


Figure 58 : Diagramme de Venn montrant la répartition des SHs identifiées en fonction des conditions d'études.

Table VIII Protéines de *Danio rerio* enrichies par la sonde dB-FP. Pour chaque protéine identifiée, nous disposons des informations suivantes : nom du gène, nom de la protéine, accession d'Uniprot, masse (kDa), fraction dans laquelle elle a été identifiée (S pour soluble et I pour insoluble), type de SH (SP pour une protéase à sérine et mSH pour une hydrolase à sérine métabolique), des peptides uniques identifiés dans chacun des 4 réplicats biologiques et dans chaque échantillon (100 µg/L DBP, 5 µg/L DBP et contrôle). Pour chaque échantillon, nous avons les peptides uniques identifiés sans sonde et ceux identifiés en présence de sonde (dB-FP). En vert, les SHs bien enrichies dans les trois conditions simultanément, en rouge les SHs enrichies dans une ou deux conditions.

Gène	Nom des protéines	Accession Uniprot	Mass (kDa)	S/I	SP/mSH	100 µg/L DBP		Unique Peptides 5 µg/L DBP		Témoin (DMSO)	
						Sans sonde	dB-FP	Sans sonde	dB-FP	Sans sonde	dB-FP
<i>aadac</i>	Arylacétamide deacetylase	E7F2W1_DANRE	46,923	S	mSH	0,0,0,0	9,6,7,12	0,0,0,0	8,7,8,13	0,0,0,0	9,7,9,13
<i>abhd10a</i>	Abhydrolase domain-containing 10, depalmitoylase a	A0A0R4ILM1_DANRE	31,639	S	mSH	0,0,0,0	8,3,6,9	0,0,0,0	6,8,8,11	0,0,0,0	6,3,6,8
<i>abhd10b</i>	Transgelin 3b	E7F9Y7_DANRE	31,94	S	mSH	0,0,0,0	11,8,9,11	0,0,0,0	12,11,12,12	0,0,0,0	12,8,11,11
<i>abhd17ab</i>	Abhydrolase domain-containing 17A, depalmitoylase b	A0A2R8PY04_DANRE	32,846	S	SP	0,0,0,0	4,1,3,5	0,0,0,0	6,5,4,5	0,0,0,0	6,1,5,5
<i>abhd17b</i>	Abhydrolase domain-containing 17B, depalmitoylase (Fragment)	A3KPQ6_DANRE	32,28	S	SP	0,0,0,0	4,4,5,6	0,0,0,0	5,5,5,8	0,0,0,0	5,4,4,7
<i>abhd6a</i>	Abhydrolase domain-containing 6, acylglycerol lipase a	E7F881_DANRE	38,103	S	mSH	0,0,0,0	5,3,5,9	0,0,0,0	5,9,4,9	0,0,0,0	7,3,4,7
<i>acot14</i>	Acyl-CoA thioesterase 14	Q5RHG4_DANRE	49,161	S	mSH	0,0,0,0	4,1,3,4	0,0,0,0	4,4,4,6	0,0,0,0	3,2,3,5
<i>acot18</i>	Acyl-CoA thioesterase 18 (Fragment)	Q5RH36_DANRE	48,765	S	mSH	0,0,0,0	5,5,5,8	0,0,0,0	4,7,6,11	0,0,0,0	6,6,4,9
<i>acot20</i>	Acyl-CoA thioesterase 20	Q5SPG8_DANRE	48,601	S	mSH	0,0,0,0	10,4,10,15	0,0,0,0	9,9,13,16	0,0,0,0	8,3,8,12
<i>afmid</i>	Kynurenine formamidase (Fragment)	A0A0R4INQ3_DANRE	30,694	S	mSH	0,0,0,0	6,2,7,5	0,0,0,0	4,6,9,6	0,0,0,0	5,5,7,6
<i>apeh</i>	Acyl-peptide hydrolase	F1QTY6_DANRE	83,262	S	SP	0,0,0,0	6,3,3,6	0,0,0,0	5,6,9,9	0,0,0,0	5,3,10,7
<i>ccdc57</i>	3-hydroxyacyl-[acyl-carrier-protein] dehydratase	E7F5V3_DANRE	274,19	S	mSH	0,0,0,0	23,11,21,40	0,0,0,0	21,21,26,26	0,0,0,0	25,9,28,28

Suite 1 tableau VIII

Gène	Nom des protéines	Accession Uniprot	Mass (kDa)	S/I	SP/mSH	100 µg/L DBP		Unique Peptides 5 µg/L DBP		Témoin (DMSO)	
						Sans sonde	dB-FP	Sans sonde	dB-FP	Sans sonde	dB-FP
<i>ccdc57</i>	3-hydroxyacyl-[acyl-carrier-protein] dehydratase	E7F5V3_DANRE	274,19	I	mSH	0,0,0,0	7,7,5,4	0,0,0,0	6,7,10,3	0,0,0,0	7,5,6,3
<i>cel.1</i>	Carboxylic ester hydrolase	F1R1T7_DANRE	60,783	S	mSH	0,0,0,0	7,5,5,6	0,0,0,0	3,5,6,7	0,0,0,0	3,5,4,7
<i>cel.2</i>	Carboxylic ester hydrolase	F6P131_DANRE	60,555	S	mSH	0,0,0,0	5,5,4,8	0,0,0,0	4,5,6,10	0,0,0,0	2,4,6,8
<i>cela1.6</i>	Chymotrypsin-like elastase family member 1, tandem duplicate 6	A0A2R8RMN0_DANRE	29,475	S	SP	0,4,1,3	5,7,3,3	0,1,1,3	2,7,3,5	0,4,1,3	2,7,1,5
<i>ces2a</i>	Carboxylic ester hydrolase	Q1LYL6_DANRE	60,611	S	mSH	0,0,0,0	7,8,8,7	0,0,0,0	8,10,9,7	0,0,0,0	8,7,8,7
<i>ces2a</i>	Carboxylic ester hydrolase (Fragment)	Q6GMJ1_DANRE	60,634	S	mSH	0,0,0,0	4,5,7,5	0,0,0,0	6,5,8,4	0,0,0,0	7,4,5,5
<i>ces2b</i>	Carboxylic ester hydrolase	A0A0R4IMR1_DANRE	29,286	S	mSH	0,0,0,0	4,5,5,3	0,0,0,0	4,4,4,3	0,0,0,0	4,4,4,3
<i>ces2b</i>	Carboxylesterase 2b (Fragment)	A0A0R4IU19_DANRE	104,95	S	mSH	0,0,0,0	21,23,17,16	0,0,0,0	20,25,20,19	0,0,0,0	19,18,20,20
<i>ces2b</i>	Carboxylesterase 2b (Fragment)	A0A0R4IU19_DANRE	104,95	I	mSH	0,0,0,0	4,7,3,4	0,0,0,0	1,3,7,3	0,0,0,0	5,5,3,2
<i>ces3</i>	Carboxylic ester hydrolase	A0A2R8QSI8_DANRE	59,431	S	mSH	0,0,0,0	2,2,2,2	0,0,0,0	2,2,2,2	0,0,0,0	1,2,2,2
<i>ces3</i>	Carboxylic ester hydrolase	Q1LUZ9_DANRE	60,297	S	mSH	0,0,0,0	4,3,4,4	0,0,0,0	4,3,4,4	0,0,0,0	3,2,4,4
<i>cpvl</i>	Carboxypeptidase vitellogenic-like	Q7ZU43_DANRE	54,514	S	SP	0,0,0,0	13,11,12,15	0,0,0,0	15,13,15,13	0,0,0,0	13,10,13,12
<i>ctrb1</i>	Chymotrypsinogen B1	F1QFX9_DANRE	28,245	S	SP	0,0,0,0	1,5,1,1	0,0,0,0	0,4,2,1	0,0,0,0	0,5,0,2
<i>ctsa</i>	Carboxypeptidase	A0A0R4ILY1_DANRE	53,007	S	SP	0,0,1,1	8,5,7,6	0,0,0,1	6,7,8,6	0,0,0,0	8,5,6,5
<i>ctsa</i>	Carboxypeptidase	A0A0R4ILY1_DANRE	53,007	I	SP	0,0,0,0	4,4,3,3	0,0,0,0	3,1,2,3	0,0,0,1	3,1,3,1
<i>dpp4</i>	Dipeptidyl peptidase 4	B5DDZ4_DANRE	84,667	S	mSH	0,0,0,0	14,12,11,6	0,0,0,0	12,13,12,10	0,0,0,0	12,10,12,12
<i>dpp9</i>	Dipeptidyl-peptidase 9	A0A2R8QM73_DANRE	98,325	S	SP	0,0,0,0	18,8,13,7	0,0,0,0	17,13,18,11	0,0,0,1	16,7,17,13
<i>dpp9</i>	Dipeptidyl-peptidase 9	A0A2R8QM73_DANRE	98,325	I	SP	0,0,0,0	5,6,6,4	0,0,0,0	6,4,9,6	0,0,0,0	7,6,4,5
<i>ela2</i>	Elastase 2	A0A0R4IXD6_DANRE	28,887	S	SP	0,2,0,0	3,5,1,2	0,1,0,0	0,5,2,2	0,0,0,1	0,4,1,3
<i>esd</i>	S-formylglutathione hydrolase	Q567K2_DANRE	31,171	S	SP	0,0,0,0	6,4,5,6	0,0,0,0	5,6,8,6	0,0,0,1	3,3,3,7

Suite 2 tableau VIII

Gène	Nom des protéines	Accession Uniprot	Mass (kDa)	S/I	SP/ mSH	100 µg/L DBP		Unique Peptides 5 µg/L DBP		Témoin (DMSO)	
						Sans sonde	dB-FP	Sans sonde	dB-FP	Sans sonde	dB-FP
<i>faah</i>	Fatty acid amide hydrolase	F1RCW3_DANRE	65,153	S	SP	0,0,0,0	1,1,3,11	0,0,0,0	2,6,4,6	0,0,0,0	2,0,6,7
<i>faah2b</i>	Fatty-acid amide hydrolase 2-B	F1QM44_DANRE	57,151	S	SP	0,0,0,0	12,8,8,15	0,0,0,0	12,11,13,13	0,0,0,0	14,7,13,17
<i>fap</i>	Dipeptidyl peptidase 4	B0R1C4_DANRE	85,806	S	SP	0,0,0,0	25,28,27,23	0,0,0,0	28,34,30,28	0,0,0,0	29,25,26,29
<i>fap</i>	Dipeptidyl peptidase 4	B0R1C4_DANRE	85,806	I	SP	0,0,0,0	9,14,15,16	0,0,0,0	12,12,14,16	0,0,0,0	10,16,15,7
<i>Lcat</i>	Lecithin-cholesterol acyltransferase	A0A0R4IDL2_DANRE	49,139	S	mSH	0,0,0,0	8,6,10,10	0,0,0,0	7,10,10,10	0,0,0,0	8,5,9,9
<i>lypla1</i>	Lysophospholipase 1	Q568J5_DANRE	21,218	S	mSH	0,0,0,0	2,1,1,4	0,0,0,0	1,3,1,4	0,0,0,0	1,2,1,4
<i>lypla2</i>	Lysophospholipase 2	Q6PBW8_DANRE	25,067	S	mSH	0,0,0,0	8,8,11,10	0,0,0,0	11,11,10,10	0,0,0,0	10,10,10,10
<i>lypla2</i>	Lysophospholipase 3	Q6PBW8_DANRE	25,067	I	mSH	0,0,0,0	2,2,1,1	0,0,0,0	0,1,1,0	0,0,0,0	2,0,2,2
<i>mgll</i>	Monoglyceride lipase	Q7ZWC2_DANRE	33,66	S	mSH	0,0,0,0	7,4,7,10	0,0,0,0	8,9,9,11	0,0,0,0	6,7,6,10
<i>N/A</i>	2-arachidonoylglycerol hydrolase ABHD12	A0A2R8QQD0_DANRE	40,472	S	SP	0,0,0,0	4,4,4,4	0,0,0,0	4,5,5,4	0,0,0,0	5,4,4,5
<i>nceh1b.1</i>	Neutral cholesterol ester hydrolase 1b, tandem duplicate 1	F1Q8P9_DANRE	45,39	S	mSH	0,0,0,0	7,2,5,7	0,0,0,0	5,7,8,7	0,0,0,0	3,3,4,7
<i>pla2g15</i>	Phospholipase A2, group XV (Fragment)	A0A0R4IE29_DANRE	53,521	S	mSH	0,0,0,0	1,3,5,9	0,0,0,0	2,7,7,9	0,0,0,0	2,5,4,8
<i>pla2g7</i>	Platelet-activating factor acetylhydrolase	Q5RHM0_DANRE	50,429	S	mSH	0,0,0,0	1,2,4,8	0,0,0,0	2,4,4,10	0,0,0,0	2,2,3,7
<i>ppme1</i>	Protein phosphatase methylesterase 1	Q7ZV37_DANRE	41,64	S	mSH	0,0,0,0	4,0,4,6	0,0,0,0	3,3,5,9	0,0,0,0	4,1,5,8
<i>ppt2b</i>	Novel protein similar to vertebrate palmitoyl-protein thioesterase 2 (PPT2)	A3KPZ6_DANRE	32,366	S	mSH	0,0,0,0	1,2,1,2	0,0,0,0	2,2,2,3	0,0,0,0	2,2,1,3
<i>prcp</i>	Prolylcarboxypeptidase (Angiotensinase c)	Q6DG46_DANRE	55,132	S	SP	0,0,0,0	3,0,0,5	0,0,0,0	0,2,3,4	0,0,0,0	0,0,0,5

Suite 3 tableau VIII

Gène	Nom des protéines	Accession Uniprot	Mass (kDa)	S/I	SP/mSH	100 µg/L DBP		Unique Peptides 5 µg/L DBP		Témoin (DMSO)	
						Sans sonde	dB-FP	Sans sonde	dB-FP	Sans sonde	dB-FP
<i>prep</i>	Prolyl endopeptidase	Q503E2_DANRE	80,336	S	SP	0,0,0,1	22,14,20,22	0,0,0,1	20,20,25,22	0,1,0,0	19,11,22,25
<i>rbbp9</i>	Retinoblastoma-binding protein 9	Q1MT41_DANRE	20,887	S	mSH	0,0,0,0	6,3,4,4	0,0,0,0	6,6,6,4	0,0,0,0	4,2,4,5
<i>si:ch211-117n7.6</i>	Si:ch211-117n7.6	A8E7H0_DANRE	38,7	S	mSH	0,0,0,0	5,2,6,8	0,0,0,0	7,9,9,8	0,0,0,0	7,3,5,8
<i>si:ch211-117n7.7</i>	Si:ch211-117n7.7	A8E7G9_DANRE	39,501	S	mSH	0,0,0,0	7,5,3,9	0,0,0,0	7,6,8,9	0,0,0,0	5,5,5,8
<i>si:ch211-122f10.4</i>	Carboxypeptidase	F1QYP6_DANRE	51,525	S	mSH	0,0,0,0	7,7,4,5	0,0,0,0	8,4,5,6	0,0,0,0	6,7,6,5
<i>si:ch211-71n6.4</i>	Carboxylic ester hydrolase	A0A0R4IYT8_DANRE	67,565	S	mSH	0,0,0,0	11,7,6,14	0,0,0,0	9,11,12,15	0,0,0,0	13,3,8,14
<i>si:ch73-89b15.3</i>	Carboxylic ester hydrolase	A0A0R4IPW5_DANRE	63,523	S	mSH	0,0,0,0	3,1,3,10	0,0,0,0	5,6,6,10	0,0,0,0	5,1,4,11
<i>si:dkey-21e2.16</i>	Si:dkey-21e2.16 (Fragment)	Q1LUQ6_DANRE	25,62	S	SP	0,0,0,0	2,2,0,3	0,0,0,0	0,4,2,4	0,0,0,0	0,2,0,3
<i>siae</i>	Sialic acid acetyltransferase	Q1LUX8_DANRE	56,624	S	SP	0,0,0,0	3,2,2,6	0,0,0,0	2,3,3,2	0,0,0,0	0,1,2,4
<i>tpp2</i>	Tripeptidyl-peptidase 2	R4GDQ0_DANRE	139,25	I	SP	0,0,0,0	8,8,7,7	0,0,0,0	11,13,17,10	0,0,0,0	20,6,8,9
<i>zgc:154142</i>	Zgc:154142	A5PKM4_DANRE	118,63	S	SP	0,0,0,0	1,1,1,2	0,0,0,0	0,7,2,4	0,0,0,0	0,3,1,3
Autres protéines											
<i>clic3</i>	Chloride intracellular channel 3	E7F4S2_DANRE	151,36	S	-	0,0,0,0	1,0,0,6	0,0,0,0	1,2,3,6	0,0,0,0	0,0,2,8
<i>a2ml</i>	Alpha-2-macroglobulin-like Collagen-like tail subunit	A0A0R4IDD1_DANRE	159,76	S	-	0,0,0,0	11,12,9,10	0,0,0,0	5,14,11,11	0,0,0,0	5,10,4,12
<i>colq</i>	(single strand of homotrimer) of asymmetric acetylcholinesterase	F1Q7Y1_DANRE	47,825	I	-	0,0,3,0	3, 5, 3, 3	0,0,0,0	3, 4, 4, 3	1,0,1,0	4,3,2,3

III.2.7.5. Variation de l'expression des SHs fonctionnelles en fonction de l'exposition au DBP

Nous avons exploité l'approche *ABPP* couplée à la purification des adduits desthiobiotinylés et à l'analyse semi-quantitative par MS en fonction des conditions d'exposition des larves de poisson zèbre. Cette évaluation s'est focalisée sur la comparaison entre les larves exposées aux DBP et le témoin DMSO d'une part, et entre les conditions C5 (5 µg/L DBP) et C100 (100 µg/L DBP) d'autre part. Les hydrolases à sérine identifiées dans les trois conditions d'études ont été évaluées par un *t*-test de Student avec un seuil de significativité fixé à $p < 0,05$. Une seule hydrolase à sérine métabolique (figure 59) est différentiellement exprimée entre C5 et C100. Il s'agit de la dipeptidyl peptidase 4 (Dpp4) qui est 1,6 fois moins exprimée chez les larves exposées à 100 µg/L DBP que celles exposées à 5 µg/L DBP. Deux protéases à sérine différentiellement exprimées en fonction de l'exposition au DBP ont également été observées (figure 60). La première est la carboxypeptidase encore appelé cathepsine A (Ctsa) qui est deux fois plus exprimée chez les larves exposées à 100 µg/L de DBP que chez les témoins DMSO (figure 60). La deuxième est la protéine d'activation des fibroblastes alpha (Fap), deux fois moins exprimée chez les larves exposées à 100 µg DBP/L que chez celles exposées à 5 µg/L (figure 60). Il est important de souligner que la dipeptidyl peptidase IV (Dpp4) est l'homologue le plus proche de la protéine d'activation des fibroblastes (Fap)(Wei et al., 2020). Dpp4 est identique à 48 % dans la séquence complète et similaire à 70 % dans sa région catalytique avec Fap, ce qui expliquerait les résultats similaires obtenus pour ces deux protéines.

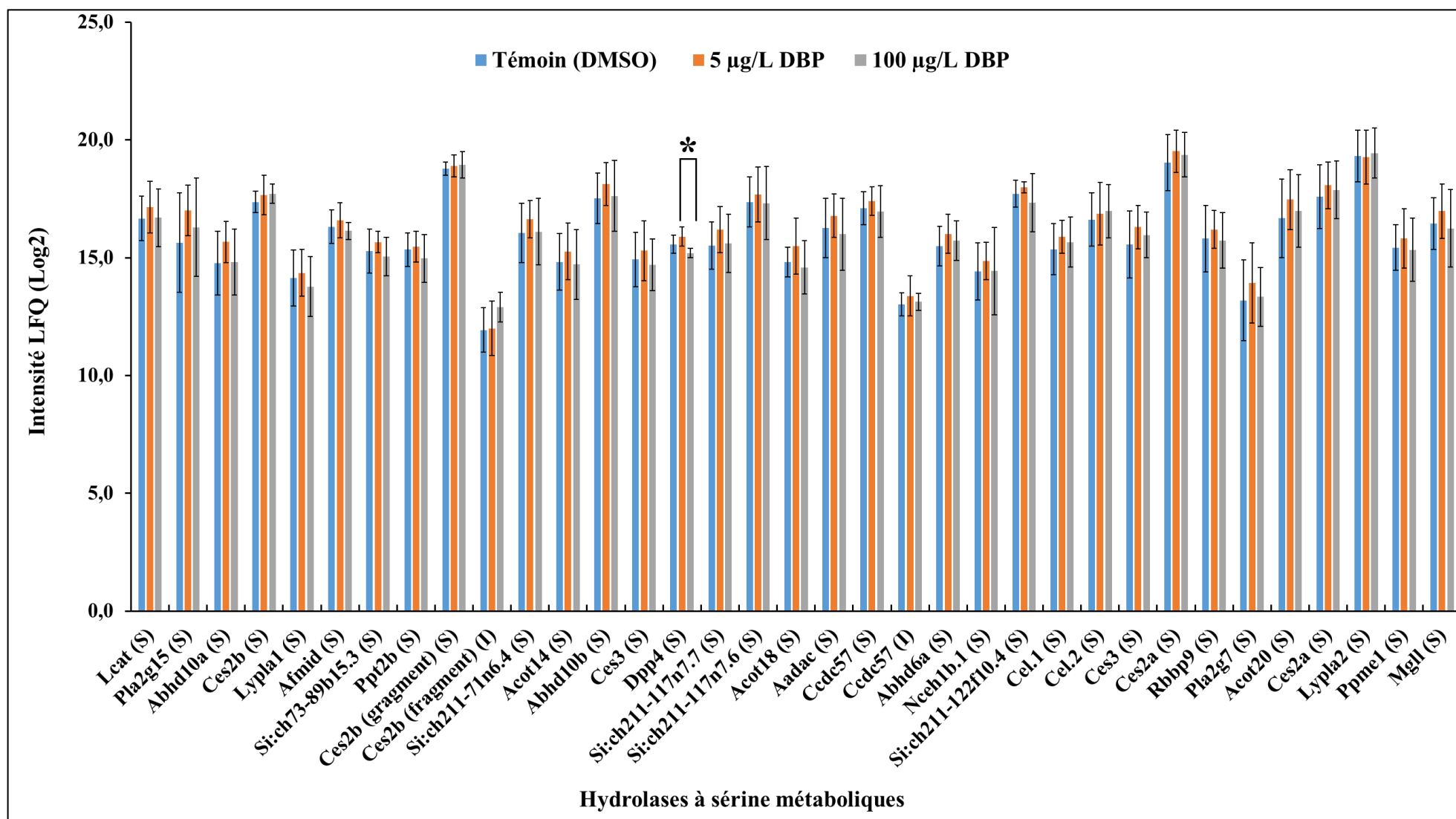


Figure 59 : Expression des hydrolases à sérine métaboliques chez les larves de poisson zèbre exposées au DBP. L'astérisque indique les différences statistiquement significatifs ($p < 0,05$, t -test de Student). (S), fraction soluble ; (I), fraction insoluble.

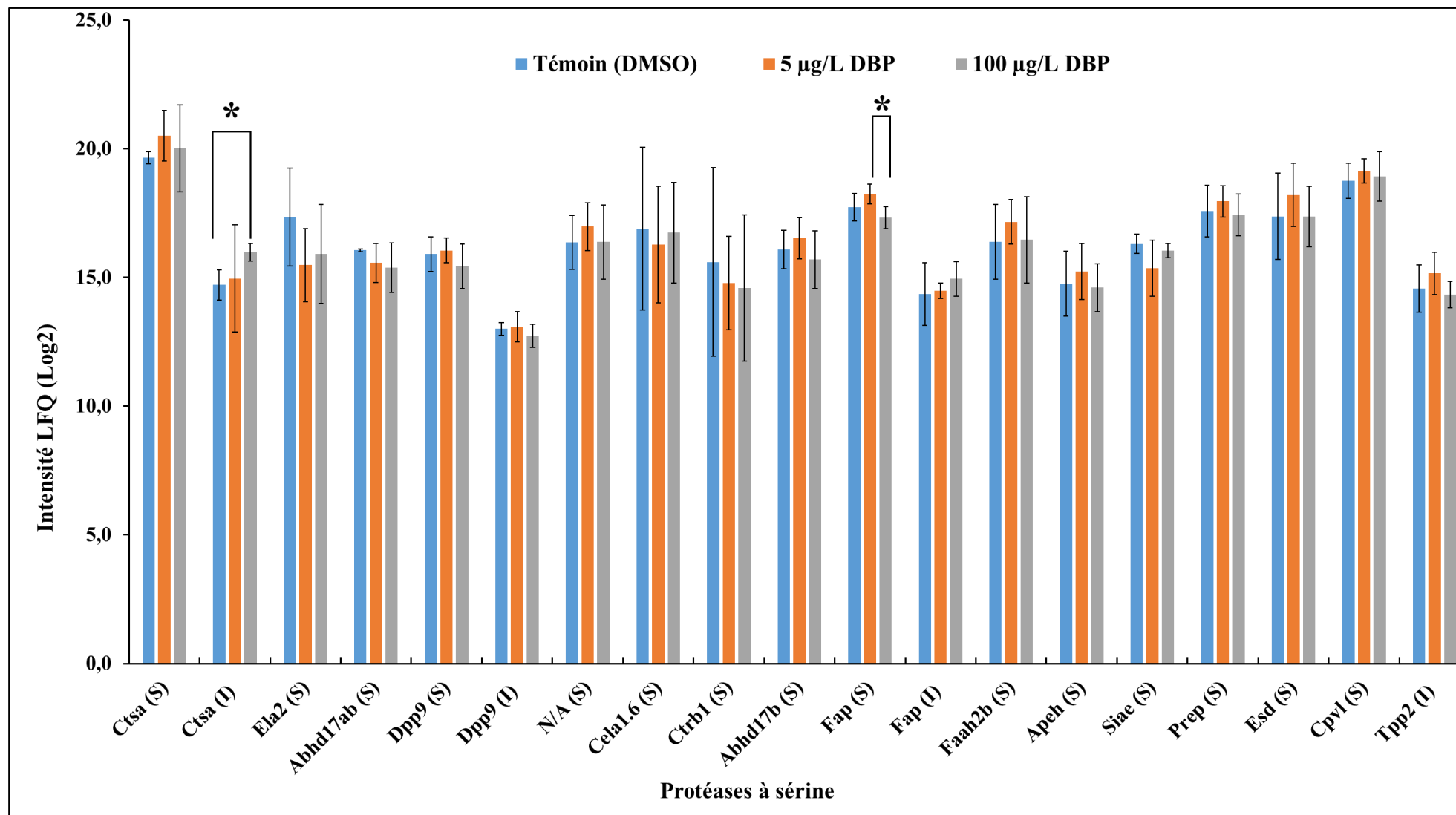


Figure 60 : Expression des protéases à sérine chez les larves de poisson zèbre exposées au DBP. L'astérisque indique les différences statistiquement significatives ($p < 0,05$, t -test de Student). (S), fraction soluble ; (I), fraction insoluble.

III.2.7.6. Analyse des SHs identifiées

Classiquement, les hydrolases à sérine sont divisées en deux sous-groupes composés des protéases à sérine (SP) et des hydrolases à sérine métabolique (mSH) (Bachovchin and Cravatt, 2012). Dans la présente étude nous avons identifié avec une confiance élevée 16 protéases à sérine (33%) et 33 hydrolases à sérine métabolique (67%) dans le protéome des larves de poisson zèbre (tableau VIII). L'analyse de la cooccurrence à l'aide de STRINGdb (Szklarczyk et al., 2015) des SHs identifiées montre leurs distributions dans les génomes des *Eukaryota* (477 taxons), des *Bacteria* (4445 taxons) et des *Archaea* (168 taxons) et confirme leurs présences ubiquitaires dans le génome d'espèces très divergentes (Dolui et al., 2020) (résultats non montrés). L'analyse d'enrichissement « Gene Ontology » (GO) des protéines identifiées par ABPP a également été réalisée à l'aide de la base de données STRINGdb (Szklarczyk et al., 2015) et classées dans les catégories GO (tableau IX). Globalement les SHs identifiées se répartissent dans deux grands groupes de fonctions moléculaires que sont l'activité catalytique agissant sur les protéines (20 SHs) et l'activité hydrolase d'ester carboxylique (23 SHs). Elles sont également impliquées dans une variété de processus biologiques tels que le processus métabolique des lipides, le processus catabolique ou le processus métabolique des composés organoazotés (tableau IX). Enfin, elles sont localisées en grande partie dans la région extracellulaire et dans le lysosome.

Seules 9 protéines sont associées aux voies KEGG (tableau IX), ce qui semble moins informatif que l'analyse GO. Nous avons donc effectué des recherches supplémentaires avec le logiciel Ingenuity Pathway (IPA) de QIAGEN. Nous avons effectué une recherche BLASTP des 49 SH par rapport aux bases de données humaines de référence (RefSeq) afin de les analyser avec le logiciel QIAGEN IPA (car les séquences de *D. rerio* ne sont pas incluses). Elle a permis de cartographier 37 SHs orthologues à l'humain, parmi celles-ci, 20 SHs sont associées aux voies canoniques telles que la voie de dégradation des triacylglycerols, la voie du cancer du pancréas SPINK1 ou la biosynthèse du rétinol (figure 61). De plus, parmi les 37 SHs orthologues humaines identifiées, 4 sont utilisées comme biomarqueurs à savoir Fasn pour le diagnostic du cancer du sein, Pla2g7 pour le diagnostic de l'AVC ischémique et de la coronaropathie, Lcat et Cela1 pour l'efficacité du traitement de la dyslipidémie et du cancer du pancréas respectivement (figure 61).

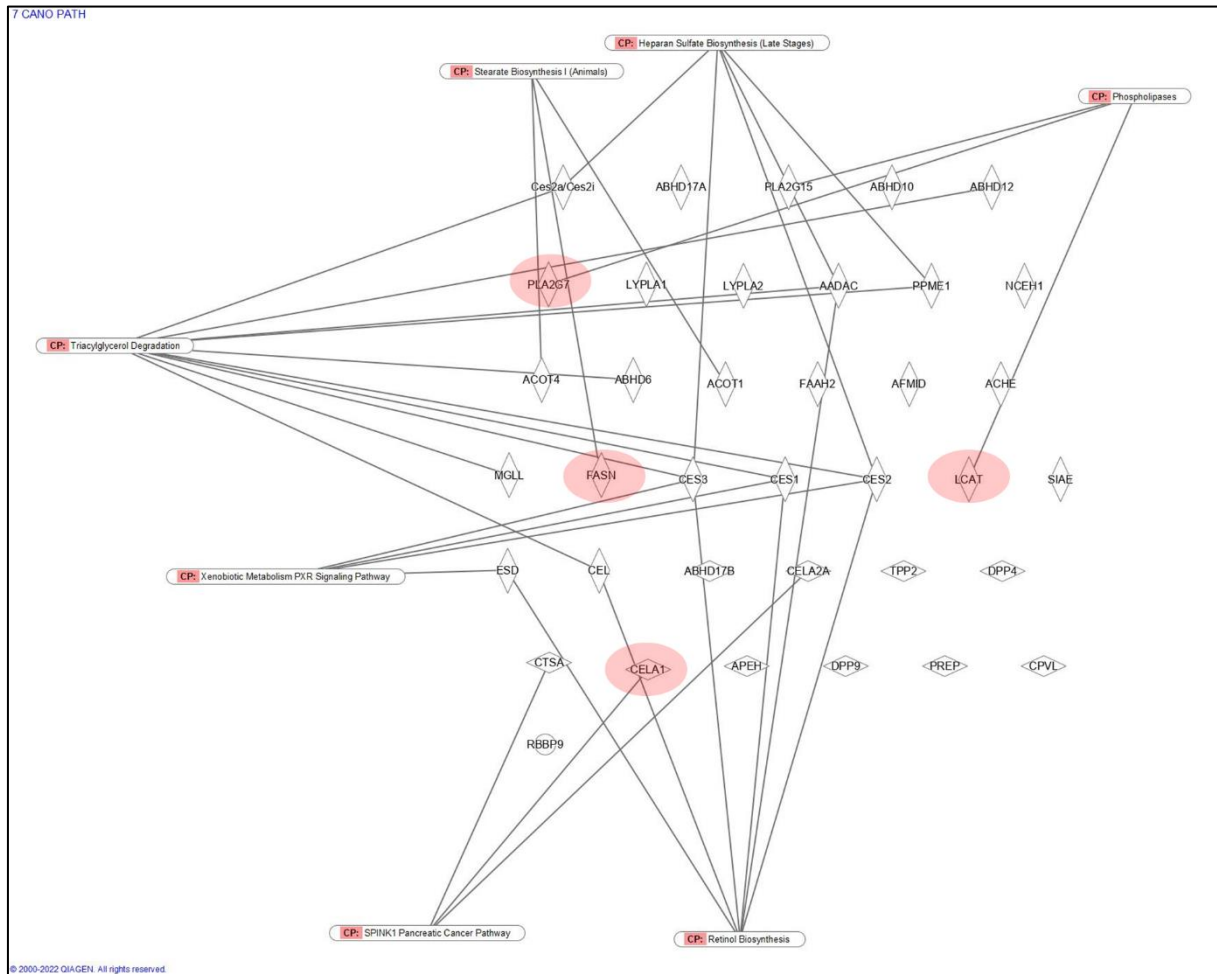


Figure 61 : Réseaux de protéines associées aux voies de signalisation canoniques telles que définies par l'analyse Ingenuity Pathway (IPA). Seules les voies avec au moins 3 associations protéiques ou plus sont présentées. Les ovales rouges indiquent les protéines utilisées comme biomarqueurs de diagnostic ou d'efficacité de traitement.

Tableau IX : Annotation GO des SHs identifiées.

Fonction moléculaire (GO)					
ID	Description du terme	Nombre de gènes observés	Nombre de gènes total (<i>D. rerio</i>)	Taux de fausses découvertes (FDR)	Gènes correspondants
GO:0003824	Activité catalytique	48	7610	5.70e-21	<i>cela1.6, ppme1, pla2g7, esd, acot14, cel.2, ces3, mgll, siae, acot20, abhd17ab, si:ch211-122f10.4, si:ch73-89b15.3, faah2b, cpvl, prcp, abhd6a, nceh1b.1, lcat, aadac, apeh, ces2a, si:ch211-117n7.7, ppt2b, rbbp9, ces2b, abhd12, dpp4, fap, faah, abhd10b, ctrb1, prep, ctsa, afmid, si:ch211-71n6.4, pla2g15, lypla1, dpp9, si:dkey-21e2.16, cel.1, abhd17b, lypla2, ela2, acot18, si:ch211-117n7.6, abhd10a, tpp2</i>
GO:0016787	Activité hydrolase	47	3080	7.25e-37	<i>cela1.6, ppme1, pla2g7, esd, acot14, cel.2, ces3, mgll, siae, acot20, abhd17ab, si:ch211-122f10.4, si:ch73-89b15.3, faah2b, cpvl, prcp, abhd6a, nceh1b.1, aadac, apeh, ces2a, si:ch211-117n7.7, ppt2b, rbbp9, ces2b, abhd12, dpp4, fap, faah, abhd10b, ctrb1, prep, ctsa, afmid, si:ch211-71n6.4, pla2g15, lypla1, dpp9, si:dkey-21e2.16, cel.1, abhd17b, lypla2, ela2, acot18, si:ch211-117n7.6, abhd10a, tpp2</i>
GO:0016788	Activité hydrolase, agissant sur les liaisons ester	28	901	5.08e-25	<i>ppme1, pla2g7, esd, acot14, cel.2, ces3, mgll, siae, acot20, abhd17ab, si:ch73-89b15.3, abhd6a, nceh1b.1, aadac, ces2a, si:ch211-117n7.7, ppt2b, abhd12, faah, abhd10b, pla2g15, lypla1, cel.1, abhd17b, lypla2, acot18, si:ch211-117n7.6, abhd10a</i>
GO:0052689	Activité hydrolase d'ester carboxylique	23	152	2.19e-34	<i>ppme1, pla2g7, esd, cel.2, ces3, mgll, siae, acot20, si:ch73-89b15.3, abhd6a, nceh1b.1, aadac, ces2a, si:ch211-117n7.7, abhd12, faah, abhd10b, pla2g15, lypla1, cel.1, lypla2, si:ch211-117n7.6, abhd10a</i>
GO:0140096	Activité catalytique, agissant sur une protéine	20	3275	0.00011	<i>cela1.6, ppme1, abhd17ab, si:ch211-122f10.4, cpvl, prcp, apeh, ppt2b, dpp4, fap, ctrb1, prep, ctsa, lypla1, dpp9, si:dkey-21e2.16, abhd17b, lypla2, ela2, tpp2</i>
GO:0017171	Activité sérine hydrolase	15	251	6.86e-16	<i>cela1.6, si:ch211-122f10.4, cpvl, prcp, aadac, apeh, dpp4, fap, ctrb1, prep, ctsa, dpp9, si:dkey-21e2.16, ela2, tpp2</i>
GO:0008236	Activité peptidase de type sérine	14	249	2.12e-14	<i>cela1.6, si:ch211-122f10.4, cpvl, prcp, apeh, dpp4, fap, ctrb1, prep, ctsa, dpp9, si:dkey-21e2.16, ela2, tpp2</i>
GO:0016298	Activité lipase	12	142	4.02e-14	<i>cel.2, mgll, abhd6a, aadac, si:ch211-117n7.7, abhd12, faah, pla2g15, lypla1, cel.1, lypla2, si:ch211-117n7.6</i>

Suite 1 tableau IX

Processus biologique (GO)					
ID	Description du terme	Nombre de gènes observés	Nombre de gènes total (<i>D. rerio</i>)	Taux de fausses découvertes (FDR)	Gènes correspondants
GO:0008152	Processus métabolique	45	9636	2.14e-11	<i>cela1.6, ppme1, pla2g7, esd, acot14, cel.2, ces3, mgll, siae, acot20, abhd17ab, si:ch211-122f10.4, si:ch73-89b15.3, faah2b, cpvl, prcp, abhd6a, nceh1b.1, lcat, aadac, apeh, ces2a, si:ch211-117n7.7, ppt2b, abhd12, dpp4, fap, faah, abhd10b, ctrb1, prep, ctsa, afmid, pla2g15, lypla1, dpp9, si:dkey-21e2.16, cel.1, abhd17b, lypla2, ela2, acot18, si:ch211-117n7.6, abhd10a, tpp2</i>
GO:0071704	Processus métabolique des substances organiques	43	8915	6.68e-11	<i>cela1.6, ppme1, pla2g7, esd, acot14, cel.2, ces3, mgll, siae, acot20, abhd17ab, si:ch211-122f10.4, faah2b, cpvl, prcp, abhd6a, nceh1b.1, lcat, apeh, ces2a, si:ch211-117n7.7, ppt2b, abhd12, dpp4, fap, faah, abhd10b, ctrb1, prep, ctsa, afmid, pla2g15, lypla1, dpp9, si:dkey-21e2.16, cel.1, abhd17b, lypla2, ela2, acot18, si:ch211-117n7.6, abhd10a, tpp2</i>
GO:0044238	Processus métabolique primaire	41	8363	3.17e-10	<i>cela1.6, ppme1, pla2g7, acot14, cel.2, ces3, mgll, siae, acot20, abhd17ab, si:ch211-122f10.4, faah2b, cpvl, prcp, abhd6a, nceh1b.1, lcat, apeh, ces2a, si:ch211-117n7.7, abhd12, dpp4, fap, faah, abhd10b, ctrb1, prep, ctsa, afmid, pla2g15, lypla1, dpp9, si:dkey-21e2.16, cel.1, abhd17b, lypla2, ela2, acot18, si:ch211-117n7.6, abhd10a, tpp2</i>
GO:1901564	Processus métabolique des composés organoazotés	29	6120	5.77e-05	<i>cela1.6, ppme1, acot14, cel.2, acot20, abhd17ab, si:ch211-122f10.4, cpvl, prcp, lcat, apeh, si:ch211-117n7.7, abhd12, dpp4, fap, ctrb1, prep, ctsa, afmid, pla2g15, dpp9, si:dkey-21e2.16, cel.1, abhd17b, lypla2, ela2, acot18, si:ch211-117n7.6, tpp2</i>
GO:0009056	Processus catabolique	26	1959	1.00e-12	<i>pla2g7, esd, cel.2, ces3, mgll, abhd17ab, si:ch211-122f10.4, si:ch73-89b15.3, faah2b, cpvl, abhd6a, nceh1b.1, aadac, ces2a, si:ch211-117n7.7, abhd12, faah, abhd10b, ctsa, afmid, pla2g15, cel.1, abhd17b, lypla2, si:ch211-117n7.6, abhd10a</i>
GO:1901575	Processus catabolique des substances organiques	22	1663	1.12e-10	<i>pla2g7, esd, cel.2, mgll, abhd17ab, si:ch211-122f10.4, faah2b, cpvl, abhd6a, nceh1b.1, si:ch211-117n7.7, abhd12, faah, abhd10b, ctsa, afmid, pla2g15, cel.1, abhd17b, lypla2, si:ch211-117n7.6, abhd10a</i>
GO:0006629	Processus métabolique lipidique	20	1103	2.14e-11	<i>pla2g7, acot14, cel.2, ces3, mgll, acot20, faah2b, abhd6a, nceh1b.1, lcat, ces2a, si:ch211-117n7.7, abhd12, faah, pla2g15, lypla1, cel.1, lypla2, acot18, si:ch211-117n7.6</i>

Suite 2 tableau IX

ID	Description du terme	Nombre de gènes observés	Nombre de gènes total (<i>D. rerio</i>)	Taux de fausses découvertes (FDR)	Gènes correspondants
GO:0044248	Processus catabolique cellulaire	18	1702	5.33e-07	<i>esd, cel.2, mgll, si:ch211-122f10.4, si:ch73-89b15.3, cpvl, abhd6a, si:ch211-117n7.7, abhd12, faah, abhd10b, ctsa, afmid, pla2g15, cel.1, lypla2, si:ch211-117n7.6, abhd10a</i>
GO:0044255	Processus métabolique des lipides cellulaires	16	851	1.91e-09	<i>acot14, cel.2, mgll, acot20, abhd6a, nceh1b.1, lcat, si:ch211-117n7.7, abhd12, faah, pla2g15, lypla1, cel.1, lypla2, acot18, si:ch211-117n7.6</i>
GO:0044281	Processus métabolique des petites molécules	16	1733	3.23e-05	<i>esd, acot14, cel.2, mgll, acot20, nceh1b.1, lcat, faah, abhd10b, afmid, pla2g15, lypla1, cel.1, lypla2, acot18, abhd10a</i>
GO:0016042	Processus catabolique des lipides	13	272	2.14e-11	<i>pla2g7, cel.2, mgll, faah2b, abhd6a, nceh1b.1, si:ch211-117n7.7, abhd12, faah, pla2g15, cel.1, lypla2, si:ch211-117n7.6</i>
GO:0019752	Processus métabolique de l'acide carboxylique	11	806	0.00010	<i>acot14, mgll, acot20, faah, abhd10b, afmid, pla2g15, lypla1, lypla2, acot18, abhd10a</i>
GO:1901565	Processus catabolique des composés organoazotés	11	1126	0.0019	<i>abhd17ab, si:ch211-122f10.4, cpvl, si:ch211-117n7.7, abhd12, ctsa, afmid, pla2g15, abhd17b, lypla2, si:ch211-117n7.6</i>
GO:0044242	Processus catabolique des lipides cellulaires	10	179	1.69e-09	<i>cel.2, mgll, abhd6a, si:ch211-117n7.7, abhd12, faah, pla2g15, cel.1, lypla2, si:ch211-117n7.6</i>
GO:0019637	Processus métabolique des organophosphates	10	898	0.0018	<i>acot14, acot20, abhd6a, lcat, si:ch211-117n7.7, abhd12, afmid, pla2g15, acot18, si:ch211-117n7.6</i>
Composante cellulaire (GO)					
ID	Description du terme	Nombre de gènes observé	Nombre de gènes total (<i>D. rerio</i>)	Taux de fausses découvertes (FDR)	Gènes correspondants
GO:0005576	Région extracellulaire	15	2383	0.0082	<i>cela1.6, cel.2, ces3, si:ch73-89b15.3, cpvl, lcat, ces2a, dpp4, fap, ctrb1, si:ch211-71n6.4, pla2g15, si:dkey-21e2.16, cel.1, ela2</i>
GO:0005615	Espace extracellulaire	11	1324	0.0090	<i>cela1.6, cel.2, ces3, cpvl, lcat, ces2a, ctrb1, si:ch211-71n6.4, pla2g15, si:dkey-21e2.16, cel.1</i>
GO:0005764	Lysosome	8	485	0.0053	<i>siae, si:ch211-122f10.4, prcp, abhd6a, ppt2b, ctsa, pla2g15, si:dkey-21e2.16</i>
GO:0071438	Membrane d'invadopode	2	9	0.0458	<i>dpp4, fap</i>

Suite 3 tableau IX

Enrichissement KEGG					
ID	Description du terme	Nombre de gènes observé	Nombre de gènes total (<i>D. rerio</i>)	Taux de fausses découvertes (FDR)	Gènes correspondants
dre00561	Métabolisme des glycérolipides	3	63	0.0445	<i>cel.2, mgl1, cel.1</i>
dre00564	Métabolisme des glycérophospholipides	3	100	0.0428	<i>lcat, pla2g15, lypla2</i>
dre04142	Lysosome	4	165	0.0445	<i>si:ch211-122f10.4, ppt2b, ctsa, pla2g15</i>

Chapitre 4 : Discussion

IV.1. Utilisation des sondes AfBPP pour la cartographie des cibles protéiques du DBP dans le protéome du poisson zèbre

La compréhension des interactions directes xénobiotiques-protéines est essentielle pour améliorer notre connaissance des évènements moléculaires en aval des effets pathologiques liés à la présence des xénobiotiques dans les écosystèmes (Medina-Cleghorn et al., 2015). Ces interactions peuvent être élucidées par des approches ciblées de types AfBPP ou ABPP. En complément des approches classiques de protéomique qui mettent l'accent sur la perturbation de l'expression des protéines de façon globale, l'utilisation des approches dites ciblées pourrait permettre d'élucider plus rapidement les mécanismes d'action des xénobiotiques en écotoxicologie. Cette conception est notamment vraie dans la construction et la mise en œuvre du concept de l'AOP (*adverse outcome pathway*) dont la première étape est définie par un évènement moléculaire initial (MIE, *molecular initiating event*) caractérisé par cette interaction entre le xénobiotique et une macromolécule biologique (Amiard and Amiard-Triquet, 2017, p. 377).

En écotoxicologie, aucun exemple d'utilisation de telles approches ciblées n'a été clairement rapporté et documenté à ce jour (à notre connaissance). Pour tenter de combler ce vide, nous avons proposé de tester une approche ciblée de type AfBPP sur l'organisme modèle *Danio rerio* dans la perspective d'améliorer nos connaissances sur les mécanismes d'action des CPE de type phtalate. Les phtalates sont des polluants établis comme CPE et sont ubiquitaires (air, eau sol) (Liang et al., 2008; Peijnenburg, 2008a; Stanley et al., 2003). Les mécanismes d'actions des esters de phtalate décrits à ce jour sont associés à de nombreux effets sur les organismes vivants, tels que des malformations, des lésions testiculaires, des lésions hépatiques, une activité anti-androgène, une tératogénicité, une prolifération de peroxyosomes et en particulier une toxicité pour la reproduction chez les animaux de laboratoire (Peijnenburg, 2008) et sur l'Homme (Bergman et al., 2013). Si la multiplicité des effets est établie, peu d'informations sont connues quant aux évènements moléculaires conduisant aux différentes perturbations causées par les phtalates. Le DBP et le DEHP représentent les phtalates majoritairement retrouvés dans l'environnement (Net et al., 2015b), mais avec une solubilité dans l'eau de $2,5 \cdot 10^{-3}$ mg/L (Net et al., 2015a) le DEHP présente le désavantage d'être moins soluble que le DBP (10 mg/L) rendant plus complexe son utilisation dans la recherche expérimentale, raison pour laquelle notre choix s'est porté sur le DBP.

IV.1.1. Les sondes azide

L'approche « affinity-based protein profiling » (AfBPP) a été utilisée dans le but de cartographier l'interaction des perturbateurs endocriniens de type phtalate avec les récepteurs protéiques (au sens large) chez le poisson zèbre. La démarche analytique liée à l'AfBPP impose la synthèse chimique et la validation des sondes avant leur utilisation. L'une des exigences de cette approche est la conception de sondes ayant une structure chimique qui ne soit pas significativement différente de celle du ligand d'intérêt. Il s'agit là d'une considération classique de toute stratégie exploitant la reconnaissance moléculaire entre des protéines et leurs ligands notamment en pharmacologie (Veale, 2021).

Dans un premier temps, le DBP a été fonctionnalisé avec l'azide photoactivable pour générer des sondes de type aryl-azide (Chen et al., 1999; Park et al., 2016; Smith and Knowles, 1974). Ce premier choix est motivé par la structure moléculaire relativement simple et minimaliste de l'azide du point de vue de l'encombrement stérique, mais aussi parce que la synthèse de ces sondes est relativement simple et rapide.

D'une manière générale, l'introduction d'un groupe hydrophile sur les molécules d'ester de phtalate (chaines aliphatique ou noyau aromatique) réduit le $\log K_{ow}$ et donc leur toxicité, tandis que l'ajout d'un atome d'halogène augmente leur toxicité (Netzeva and Worth, 2007). On peut donc avoir dans certains cas un lien entre le K_{ow} et la toxicité des molécules chimiques. Une simulation avec le logiciel EPI SuiteTM a permis d'orienter le positionnement de l'azide sur le noyau aromatique sur la base des propriétés physicochimiques et des données retrouvées dans la littérature scientifique. En effet, le $\log K_{ow}$ varie faiblement entre un positionnement de l'azide sur le noyau aromatique (4,00) et son positionnement sur l'une des deux chaines aliphatiques (3,87). Cependant, le positionnement de l'azide sur l'une des chaines aliphatiques accroît de 18% la solubilité de la sonde par rapport à un positionnement sur le noyau aromatique (estimation théorique avec EPI SuiteTM, données non montrées). On retrouve dans la littérature scientifique très peu de cas où les azides d'alkyle sont utilisés car ils sont limités par une instabilité relative et une faible sélectivité (possibilité de fixation sur plusieurs sites de liaison)(Fleming, 1996) mais aussi par une faible capacité de photoactivation. Un positionnement de l'azide sur l'une des chaines aliphatiques serait donc inadapté. Contrairement aux alkyles azide, l'utilisation des aryles azide dans l'approche AfBPP est très souvent rapporté dans la littérature scientifique (Kotzyba-Hibert et al., 1995; Sadakane and Hatanaka, 2006; Smith and Knowles, 1974). Les aryles azide produisent après irradiation (254 nm à 300 nm) un nitrène singulet très réactif qui peut se lier de manière covalente aux molécules

vicinales, mais peut aussi générer des intermédiaires qui conduisent à l'expansion du cycle aromatique en une azépine céténimine (Fleming, 1996). Ces intermédiaires peuvent aussi réagir efficacement avec les nucléophiles disponibles, mais cette réaction est moins rapide que celles des nitrènes singulet. Les aryles azide sont chimiquement stables et possèdent des propriétés photophysiques supérieures à celles des alkyle et acyle correspondants (Murale et al., 2016).

Pour toutes ces raisons, l'azide a été fixé sur le noyau aromatique du DBP afin d'avoir des sondes de types aryles azide. Une fois ce choix opéré, la question du carbone auquel fixer l'azide sur le noyau aromatique s'est posée. Deux options s'offraient à nous, soit fixer l'azide au carbone 3 (pour avoir la sonde 3-N₃-aDBP), soit au carbone 4 (4-N₃-aDBP) du noyau aromatique du DBP du fait des précurseurs de synthèse disponibles. L'analyse (Q)SAR suggère des propriétés physicochimiques identiques pour les deux types de positionnement (tableau 5). Smith et Knowles (1973) ont montré par exemple que la variation de la position de l'azide sur le noyau aromatique avait une influence sur les cibles protéiques marquées par les sondes. Nous avons donc opté pour la synthèse des deux sondes azide (azides 3-N₃-aDBP et 4-N₃-aDBP) avec pour objectif de pouvoir cartographier une grande variété de cibles protéiques.

L'analyse basée sur les modèles (Q)SAR suggère également que les propriétés physicochimiques des sondes azide sont assez proches de celles du DBP. On estime donc que la toxicité de ces sondes soit très proche de celle du DBP (log K_{ow} très proche) même si elles ont une solubilité légèrement plus faible. Mais il ne s'agit là que de considérations théoriques, les sondes doivent être évaluées sur leur capacité à se fixer de manière covalente aux cibles protéiques sous irradiation UV d'une part, et à se fixer sur des sites spécifiques au DBP sur les cibles protéiques d'autre part.

IV.1.1.1. Validation des sondes azide

Les sondes de type aryl-azide issues de synthèse chimique sont photo-réactives et donc capables d'assurer une liaison covalente aux récepteurs protéiques sous irradiation UV. Ces marquages simultanément dépendant de la présence des sondes et d'une irradiation UV sont caractéristiques de l'approche AfBPP que nous utilisons (MacKinnon and Taunton, 2009). L'absence de marquage avec la sonde témoin (sans groupe photoactivable) en présence et en absence d'UV montre que la liaison covalente des deux sondes photoactivables (en présence d'UV) est due à la présence de l'azide.

Dans le but de tester l'affinité des sondes pour leurs cibles, des expériences de saturation du marquage ont été réalisées. L'objectif de ces expériences n'est pas de calculer avec précision la

constante de dissociation (K_d) qui mesure l'affinité des sondes pour ses sites de liaison (Hein et al., 2005), mais d'avoir des indications sur la nature des sites de liaison (sur la BSA par exemple). Ainsi un marquage dépendant de la concentration suggèrerait une liaison des sondes sur des sites saturables. Malgré la faible solubilité des sondes qui limite l'utilisation de concentrations élevées, une tendance vers la saturation a été observée à partir de 50 μM mais avec une différence d'affinité entre les deux sondes. Les données (Q)SAR suggèrent que les deux sondes azide ont les mêmes propriétés physicochimiques. Cette différence d'affinité ne peut donc être liée aux propriétés physicochimiques des sondes. Nous faisons l'hypothèse que cette différence dans l'affinité des sondes soit dû à la différence de positionnement de l'azide sur le noyau aromatique comme suggéré par Smith et Knowles (1973) lorsqu'une telle modification est apportée sur un ligand.

Nous avons montré que les sondes de type aryl-azide ont une capacité à marquer de façon irréversible des cibles protéiques (BSA, GST Pi, homogénat protéique) sous irradiation UV, que ces marquages se font sur des sites saturables, et plus encore l'affinité des sondes pour leurs cibles serait influencée par la position de l'azide sur le noyau aromatique. Qu'en est-il de la spécificité de liaison par rapport au site de fixation du DBP ? L'objectif ultime de cette étude est en effet de pouvoir identifier les cibles protéiques du ligand DBP dans le protéome du poisson zèbre avec l'utilisation de ces sondes et la démonstration qu'elles sont bien des analogues du DBP permettant de marquer de façon covalente les protéines est donc indispensable.

Des expériences de compétition entre le ligand DBP et les sondes forment une approche classique utilisée pour découvrir les inhibiteurs enzymatiques ou des cibles moléculaires de ligand par les approches AfBPP ou ABPP (Baggelaar and Van der Stelt, 2017; Parker et al., 2017).

La spécificité structurelle de marquage des sondes azide en présence du ligand DBP n'a pas été mise en évidence. La diminution du marquage en fonction de la concentration en compétiteur (DBP) n'a pas été observée. Au contraire, c'est une augmentation du marquage de façon dépendante de la concentration du DBP qui a été observée pour les deux sondes azide. Les sondes AfBPP lorsqu'elles sont utilisées en excès, peuvent conduire à de fortes fixations aspécifiques (MacKinnon and Taunton, 2009a), mais dans notre cas c'est l'excès en ligand DBP qui conduit au marquage élevé des sondes aux cibles protéiques (BSA, GST Pi et homogénat protéiques). Le DBP serait donc responsable de cette fixation massive des sondes aux protéines, mais comment l'expliquer ?

IV.1.1.2. Influence du DBP sur le marquage des protéines : Hypothèse

Pour mieux comprendre l'origine de l'augmentation du marquage par les sondes de type aryl azide après un prétraitement avec du DBP, nous nous sommes intéressés aux effets de ce ligand sur les protéines. Certains auteurs ont rapporté la dénaturation des protéines en présence de fortes concentrations de DBP (Wang et al., 2020). C'est notamment le cas de Zhang et Liu., (2012) qui ont pu démontrer grâce à l'utilisation de la spectroscopie de dichroïsme circulaire (CD) qu'une concentration élevée de DEHP ($3 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) modifiait la structure secondaire de la BSA. Ils ont alors suggéré une modification des fonctions physiologiques de la BSA dans ces conditions. De même d'autres auteurs tels que Xie et al., (2011) et Zhou et al., (2011) ont rapporté une dénaturation partielle de la structure de l'albumine sérique humaine (HSA) en présence d'un excès d'esters de phtalate tels que le DEP, le DMP, le BBP, le DBP et le DIBP (ratio HSA:ester de phtalate de 1:4 à 1:30). La modification de la structure secondaire des protéines par les esters de phtalate n'est pas un phénomène général. En effet, d'autres protéines telles que la trypsine forment des complexes avec les phtalates sans que ceux-ci ne causent de changement structurel significatif à la protéine même à de fortes concentrations (ratio trypsine:ester de phtalate de 1:9) (Chi et al., 2017b).

L'hypothèse que la modification de la structure conformationnelle des protéines par le DBP ait dans le cas présent favorisé la fixation des sondes aryl azide sur les protéines nous semble envisageable. Lors de mises au point expérimental, des protéines (BSA et GST Pi) ont été préalablement dénaturées chimiquement (avec du chlorure de guanidinium hydrochloride) avant d'être marquées avec les sondes azide. Les protéines dénaturées étaient marquées voir plus marquées que la protéines natives (résultats non montrés), ce qui suggère une possible fixation dans des séquences protéiques hydrophobes rendues accessibles par la dénaturation. Il est important de souligner le caractère hydrophobe des sondes que nous avons précédemment indiqué. Ces premiers résultats observés semblent aller dans le sens de l'hypothèse d'une dénaturation protéique partielle par le DBP qui faciliterait la fixation des sondes azide. De plus, des études publiées argumentent aussi notre hypothèse.

L'exemple de la BSA (ou l'HSA) pour laquelle les données existent dans la littérature scientifique est très illustratif. En effet, il existe deux sites de liaison à haute affinité sur la BSA (et l'HSA), le site I localisé dans le sous-domaine IIA et le site II localisé dans le sous-domaine IIIA (He and Carter, 1992; Roy et al., 2010). Les ligands aromatiques et hétérocycliques se lient dans les deux poches hydrophobes dans les sous-domaines IIA et IIIA de l'HSA (Froehlich et al., 2009) mais aussi de la BSA. En effet, une compétition pour la liaison spécifique au site I du

sous domaine IIA est observable entre les phtalates (ex. DBP ou DEHP) et des ligands tels que le warfarin (un anticoagulant)(Zhang and Liu, 2012) ou la naringine (antioxydant)(Roy et al., 2010). Ces deux ligands sont caractérisés par une spécificité de liaison au site I du sous domaine IIA de la BSA, mais aussi par une structure chimique très différente de celle des phtalates.

Plusieurs auteurs ont identifié le site I dans le sous-domaine IIA de la BSA et de l'HSA comme site de fixation des esters de phtalate (Wang et al., 2020; Xie et al., 2011; Zhang and Liu, 2012; Zhou et al., 2012). Ce site est caractérisé par sa localisation dans une cavité hydrophobe et la présence d'un résidu de tryptophane (Trp-212 pour la BSA et Trp-214 pour l'HSA) qui est fortement impliqué dans le processus de liaison aux ligands (Wang et al., 2020; Xie et al., 2011). Sur les deux résidus Trp que contient la BSA, le Trp-135 est plus exposé à l'environnement hydrophile, tandis que le Trp-212 est enfoui dans une cavité hydrophobe (Patel et al., 1999; Wu et al., 2007). Lorsque les concentrations en DBP augmentent, la BSA se dénaturerait en raison de l'hydrophobie du DBP. Zhang et Liu (2012) suggèrent que les forces hydrophobes impliquées dans la fixation du DBP conduisent au relâchement et au dépliement du squelette de la BSA, processus dans lequel le microenvironnement du tryptophane (Trp-212) devient plus hydrophobe (Wang et al., 2020; Zhang and Liu, 2012). En conséquence, les résidus non polaires enfouis à l'état natif sont exposés et de nouveaux sites hydrophobes sont formés (Wang et al., 2020).

Nous postulons que les sondes azide se fixent à ces nouveaux sites hydrophobes et/ou dans la deuxième cavité hydrophobe localisé dans le sous domaine IIIA, d'où l'abondance de marquage après un prétraitement des protéines au DBP. Une démonstration similaire avait été rapporté par Wu et al (2007) entre le naphthol et la BSA. Ces auteurs ont démontré que le naphthol qui se fixe préférentiellement près du Trp-134 dans le sous domaine IA de la BSA native, se fixerait également au Trp-212 lorsque la BSA est dénaturée par le naphthol. Ce mécanisme s'apparente au mécanisme de liaison coopérative (allostérie), où la liaison du ligand DBP influencerait la fixation des sondes sur un site alternatif des protéines via un réseau intramoléculaire d'interaction (de Vries et al., 2021; Grams and Hsu, 2022; Gumy et al., 2008; Merdanovic et al., 2020).

De plus les nitrènes générées par la photoactivation des sondes aryl azide sont très lipophiles (Goldman et al., 1979) et donc plus susceptibles de s'agréger autour des nouveaux sites hydrophobes formés après dénaturation des protéines. Ce scénario de mécanisme de liaison des sondes en présence du DBP que nous avons décrit suggère que les sondes ne se fixent pas sur des sites spécifiques au DBP. Cette absence de spécificité serait due à l'association de deux

facteurs à savoir, le positionnement de l'azide sur le noyau aromatique et l'utilisation de l'azide photoactivable qui génère un nitrène très lipophile. Ces résultats mettent cependant en avant deux éléments novateurs obtenus par l'approche AfBPP proposé : d'une part, la possibilité que le DBP puisse perturber la structure fonctionnelle des protéines d'une manière assez large. D'autre part, le fait que nous puissions disposer avec les sondes N_3 -aDBP d'un outil chimoprotéomique pour mettre en évidence la possibilité de tels changements conformationnelles initié par les phtalates sur un protéome tel que celui du poisson zèbre.

En absence d'une spécificité de liaison aux sites de fixation du DBP des protéines, les sondes azide n'ont pas pu être utilisées pour cartographier les cibles protéiques du ligand DBP dans le protéome de poisson zèbre. Pour solutionner ce problème, nous avons conçus de nouvelles sondes en prenant en considération les résultats des sondes azide, notamment en ce qui concerne le type de groupe photoactivable utilisé et leurs positions sur la structure du DBP.

IV.1.2. Les sondes diazirine

Suite aux résultats obtenus avec les sondes azide nous avons fait l'hypothèse que l'absence de spécificité de ces sondes serait due à la modification apportée sur le noyau aromatique. Le positionnement de la diazirine sur le noyau aromatique qui nous permettrait de générer les sondes de type phenyldiazirine (Sadakane and Hatanaka, 2006) a donc été écarté à la faveur d'un positionnement sur la chaîne aliphatique. De plus, dans le but de stabiliser les électrons de carbènes générés après photoactivation, nous avons fait le choix de fixer des atomes de fluor (2F) adjacents à la diazirine comme c'est parfois le cas quand on utilise ce groupe photoactivable (Brunner et al., 1980; Chang et al., 2018). Pour éviter un encombrement stérique dû à ces modifications, la chaîne aliphatique du DBP portant la diazirine a été rallongée passant de 4 atomes de carbone à 5 atomes de carbone. Les deux chaînes aliphatiques de la diazirine 3 sont identiques et composées de 5 atomes de carbone, tandis que celles de la diazirine 2 se composent de 4 et 5 atomes de carbone. La structure de ces deux sondes diazirine est donc légèrement différente de celle du DBP, hormis l'ajout du groupe photoactivable et de l'alcyne. Compte-tenu de la variété des phtalates présentant des propriétés de PE, nous avons postulé que des modifications des chaînes aliphatiques seraient plus facilement tolérées que celles situées sur le noyau aromatique. Le principal inconvénient de ce choix réside alors dans la synthèse des sondes qui est plus difficile que dans le cas des sondes N_3 -aDBP.

Les propriétés physicochimiques des sondes diazirine (2 et 3) ont également été analysées comme dans le cas des sondes azide. En se basant sur le seuil théorique défini par Parkerton

and Konkel (2000) la sonde diazirine 2 avec un $\log K_{ow}$ de 4,87 aurait une toxicité modérée semblable à celle du DBP ($\log K_{ow} = 4,61$), et la diazirine 3 ($\log K_{ow} = 6,67$), une toxicité plus élevée pour les organismes d'eau douce ou marins en raison d'une faible solubilité dans l'eau et d'un potentiel de bioaccumulation limité. La faible solubilité aqueuse de la diazirine 3 estimée à 0,001657 mg/L concorde avec la théorie de Parkerton and Konkel (2000) et suggèrent donc que la diazirine 3 est différente du DBP non seulement par sa structure, mais aussi par ses propriétés physicochimiques.

L'absence de marquage observée pour la sonde diazirine 3 pourrait suggérer une absence d'affinité pour les cibles du protéome du poisson zèbre (homogénat protéique). Le positionnement d'un groupe photoactivable sur chacune des chaînes aliphatiques, entraînant une forte insolubilité, pourrait donc être la cause de cette absence de marquage. Les modifications apportées sur les deux chaînes aliphatiques seraient inadaptées dans ce cas. Ces observations sont en accord avec les données rapportées par Lepage et al. (2019). La fonctionnalisation des molécules avec deux groupes diazirine fluorés encore appelés bis-diazirine fluorés peut générer des composés caractérisés par une forte volatilité (Lepage et al., 2019). C'est notamment le cas du 1,3-bis(3-(trifluorométhyl)-3H-diazirine-3-yl)benzène ou son analogue pyridyl (Lepage et al., 2019; Tachrim et al., 2021). De plus, les bis-diazirine ont une forte capacité de liaison sur les surfaces polymères (polypropylène, polyéthylène) par des liaisons C-C covalentes lorsqu'ils sont photoactivés par la lumière UV ou une forte température (100-140°C) (Lepage et al., 2019). Il est donc possible que la sonde précipite puis s'adsorbe sur les parois du tube et n'entre pas en contact avec les protéines. Aucune utilisation de sonde fonctionnalisée avec deux groupes photoactivables de type diazirine n'a été rapportée dans la littérature scientifique à ce jour. La diazirine 3 n'est donc pas compatible pour une utilisation avec l'approche AfBPP.

La sonde diazirine 2 marque des cibles protéiques indépendamment d'une photoactivation et dans une moindre mesure de manière dépendante d'une irradiation à l'UV. Contrairement à ce qui a été observé avec les sondes de type aryl azide, il y aurait une possible compétition pour le site de fixation entre la diazirine 2 et le DBP. Pour rappel les sondes azide diffèrent de la sonde diazirine 2 par la nature du groupe photoactivable mais surtout par leurs positionnements sur le noyau aromatique. L'absence de modification sur le noyau aromatique pourrait faire de la sonde diazirine 2 un meilleur analogue du DBP que les sondes azide, d'où la compétition pour le site de fixation sur la BSA mais aussi sur les cibles protéiques du poisson zèbre.

La sonde diazirine 2 a été testée dans les mêmes conditions expérimentales que les sondes azide en ce qui concerne la compétition avec le DBP. Dans le cas des sondes azide, nous avons fait l'hypothèse que la dénaturation de la BSA (ou des protéines en général) a pu entraîner une forte fixation aspécifique des sondes aux protéines. On aurait pu s'attendre à faire des observations similaires avec la sonde diazirine 2, mais aucune fixation aspécifique des sondes aux protéines suite à un prétraitement avec le DBP n'a été observée puisque le marquage diminue fortement en présence de DBP, qu'il s'agisse de la protéine modèle BSA ou de l'homogénat protéique de poisson zèbre. Les fixations covalentes indépendamment d'une irradiation à l'UV ont été levées en présence de DBP. Ces observations confortent notre hypothèse sur le rôle des nitrènes (généré par la photoactivation des sondes azide) dans la forte fixation aspécifique des sondes azide aux protéines dénaturées, car les diazirine ne génèrent pas de nitrène. Xia et Peng (2013) suggèrent que les propriétés des espèces réactives (nitrènes, carbènes ou radicaux) générées par les groupes photoactifs peuvent influencer la tendance de marquage des sondes à leurs cibles cellulaires (ex. lipides ou protéines membranaires). Le caractère lipophile du nitrène généré par les sondes azide (Goldman et al., 1979) associé à la dénaturation des protéines par les fortes concentrations en DBP pourraient donc expliquer les fortes fixations des sondes azide aux protéines dans les conditions expérimentales de compétition avec le DBP.

Le principal problème rencontré avec la sonde diazirine 2 est lié au marquage des cibles protéiques en absence d'une irradiation à l'UV. Plusieurs raisons pourraient expliquer ce marquage indépendant des UV. Tout d'abord, des marquages aspécifiques dus à la réaction de CuAAC (chimie click) sont souvent rapportés dans la littérature scientifique (MacKinnon and Taunton, 2009a; Speers et al., 2003b) mais des expériences de marquage réalisées en absence de sonde montre dans notre cas que la réaction de CuAAC induit un très faible marquage aspécifique. Les marquages de protéines obtenus avec la sonde diazirine 2 en absence d'UV ne peuvent donc pas être liés à la réaction de CuAAC. Nous avons observé un léger marquage en absence de photoactivation dans le cas des sondes azide après CuAAC (bruit de fond), mais une irradiation pendant 15 min à 365 nm conduit à un marquage beaucoup plus significatif de la BSA, de la GST Pi et des cibles du protéome de poisson zèbre par rapport aux contrôles sans irradiation.

On retrouve dans la littérature scientifique des exemples de marquage aspécifique de photoaffinité en absence d'UV. Par exemple Ahad et al., (2013) et O'Brien et al., (2020) ont montré une faible fixation des sondes non photoactivées à la BSA en raison de la capacité intrinsèque de cette protéine à se lier à une variété de ligands. Toutefois, le marquage obtenu

sous irradiation UV était plus important que celui obtenu en absence d'UV. Dans notre cas, le marquage obtenu avec la sonde diazirine en absence d'UV est très proche de celui obtenu en présence d'UV.

Nous faisons l'hypothèse que la réactivité de la diazirine 2 en absence d'UV est liée à une réaction d'acylation des protéines avec la sonde qui conduirait à la majorité du marquage observé. Plus précisément, l'ajout d'une diazirine bi-fluoré proche de la fonction ester de la sonde pourrait avoir augmenté le caractère électrophile de cette fonction, ce qui aurait favorisé une réactivité protéique indépendante de la lumière, notamment vis-à-vis des thiols de Cys. Les résidus Cys des protéines possèdent en effet des propriétés nucléophiles qui leur autorisent de multiples réactions vis-à-vis de structures électrophiles (Jacob et al., 2012). Burton et al. ont rapporté des réactions similaires avec les composés diazoïques (Burton et al., 2021). De plus, la réactivité des thiols de la BSA avec des sondes photoactivables ((2-(6-(Diméthylamino)-3-(diméthyliminio)-3H-xanthen-9-yl)-5-((6-(3-(3-méthyl-3H-diazirin-3-yl)propanamido)hexyl)carbamoyl)benzoate, TAMRA-DAz)) indépendante de la lumière a été levée par un prétraitement des protéines avec du DTT suivi d'une alkylation avec de l'iodoacétamide (O'Brien et al., 2020).

L'alkylation de thiols de peptidylcystéine avec de l'iodoacétamide est aussi utilisé pour éviter des liaisons aspécifiques (de type thiol-alcyne) lors des réactions de couplage par cycloaddition (cycloaddition d'azide-alcyne favorisée par la contrainte) (van Geel et al., 2012). Les réactions impliquant les thiols de Cys sont nombreuses. Une liaison du seul résidu Cys exposé en surface de la BSA à un alcyne a été rapportée par plusieurs auteurs dont Shiu et al., (2009). Cette réaction est cependant très lente, et nécessite une incubation du mélange BSA-alcyne pendant 16 heures (à 25°C). Le temps court d'incubation de la BSA (ou des protéines) avec la diazirine qui est de 30 min n'aurait pas pu permettre aux alcynes de réagir avec les résidus de Cys dans notre cas.

Nous n'avons pas pu tester l'hypothèse de l'acylation des protéines par manque de temps. Nous aurions pu faire dans une première expérience, un prétraitement des protéines avec de l'iodoacétamide ou N-éthylmaléimide pour piéger les thiols des Cys avant l'introduction des sondes pour vérifier si les marquages aspécifiques sont levés en absence d'une irradiation à l'UV.

Le marquage observé pourrait donc être lié principalement à l'acylation des protéines, le photomarquage attendu dans le cas de sondes photoactivables constituant alors une part plus

faible du couplage observé dans nos conditions expérimentales. La proportion de photoincorporation est logiquement plus importante pour des temps courts de préincubation de la sonde Diazirine 2 (figure 45), tandis que le marquage indépendant des UV est prédominant lorsque la sonde est préincubée plus longuement avec les protéines puisque ce dernier dépendrait de la cinétique de couplage sonde-protéines.

La sonde diazirine 2 semble ainsi prometteuse, mais plusieurs vérifications devront être effectuées en complément des résultats déjà obtenus, notamment concernant ses conditions de fixation, afin de s'assurer qu'elle pourrait être utilisée pour cartographier les cibles protéiques du DBP dans le protéome du poisson zèbre. Une attention particulière devra être portée sur la possibilité de dénaturation protéique notamment en présence de DBP.

IV.2. Utilisation des sondes ABPP pour la cartographie des SHs et identification de marqueurs d'exposition au DBP chez poisson zèbre

Bien qu'il existe des preuves de l'implication de certaines hydrolases à sérine dans le métabolisme, la biodégradation des phtalates dont le DBP chez divers organismes et la capacité du DBP à inhiber l'activité de certaines SHs telles que la trypsine (Acey et al., 2002; Chi et al., 2017c; Mahajan et al., 2019; Xu et al., 2013b), très peu d'étude se sont intéressées à ce jour à l'expression des SHs chez le poisson zèbre, un modèle animal largement utilisé en sciences biomédicales et en écotoxicologie. Considérant l'utilisation fréquente des enzymes du métabolisme des xénobiotiques comme biomarqueurs (Cravedi and Perdu-durand, 2002; Otte et al., 2017; Tierbach et al., 2018), il nous est apparu pertinent d'évaluer l'expression des SHs en lien avec une exposition au DBP chez le poisson zèbre par l'utilisation de l'approche ABPP. Afin de tenir compte de la variabilité des réponses biologiques en fonction de l'approche méthodologique utilisée, nous avons associée à l'ABPP la mesure d'autres biomarqueurs sensibles au DBP par deux autres approches plus classiques à savoir la mesure de l'expression de gènes par RT-qPCR (*acox1*, *17β-hsd*, *vgt* 7) et l'activité enzymatique de l'AChE.

Les concentrations en DBP ont été choisies pour mimer une faible (5 µg/L) et une forte (100 µg/L) contamination environnementale. Des essais chez des larves de poisson zèbre ont montré que ces concentrations n'induisent pas de différences significatives en comparaison des larves non exposées en ce qui concerne la mortalité (Ortiz-Zarragoitia et al., 2006) et les anomalies de développement telles que la résorption du sac vitellin et le gonflement de la vessie natatoire (Hai Xu et al., 2015). Aucune anomalie significative de développement ou de mortalité n'ont

été observées durant les 5 jours d'expositions des embryons de poisson zèbre au DBP dans la présente étude.

IV.2.1. Validation de l'utilisation des sondes fluorophosphonate (TAMRA-FP et dB-FP) pour le profilage des hydrolases à sérine dans le protéome du poisson zèbre.

Développées par Cravatt et ses collaborateurs (Jessani et al., 2002; Liu et al., 1999; Niphakis and Cravatt, 2014), les sondes ABPP fluorophosphonate couplées à la biotine (Kumar et al., 2021; Liu et al., 1999), la desthiobiotine ou un fluorochrome (Dolui et al., 2020; Elahi et al., 2019), ont largement été utilisées pour cartographier les hydrolases à sérine à l'échelle du protéome de divers organismes (Elahi et al., 2019; Kumar et al., 2021) ou identifier leurs inhibiteurs (Baggelaar and Van der Stelt, 2017; Chen et al., 2016; Hao Xu et al., 2015).

Deux sondes ABPP ont été utilisées pour la cartographie des SHs du protéome du poisson zèbre. Une sonde fluorophosphonate (FP) couplée à un fluorochrome (TAMRA) qui permet la visualisation des protéines marquées après SDS-PAGE et une autre couplée à la desthiobiotine qui permet de purifier les protéines marquées pour une analyse en aval par LC-MS/MS mais aussi une visualisation des protéines par Western blot. Avec l'utilisation de ces deux sondes, nous avons adopté une stratégie à deux niveaux dans laquelle, premièrement, les sondes fluorescentes ont été utilisées pour une analyse comparative rapide et semi-quantitative du protéome, et deuxièmement, l'utilisation des sondes desthiobiotine a permis l'enrichissement par affinité (billes magnétiques de streptavidine) et la cartographie des hydrolases à sérine du protéome du poisson zèbre.

IV.2.2. ABPP compétitive *in vitro* avec le DBP

La compréhension des interactions directes xénobiotiques-protéines est essentielle pour améliorer notre connaissance des événements moléculaires à l'origine des effets pathologiques (Medina-Cleghorn et al., 2015). Ces interactions peuvent être élucidées par des approches de types ABPP. Les résultats de validation obtenus avec les sondes à sérine ont montré qu'elles peuvent être utilisées pour profiler les SHs actives dans le protéome de larve de poisson zèbre. Pour tenter de déterminer les SHs actives interagissant directement avec le DBP, une ABPP compétitive a été réalisée. Il a été déjà montré que le DBP pouvait inhiber l'activité de la trypsine (une hydrolase à sérine) par la formation d'un complexe DBP-trypsine dans des conditions physiologiques simulées (Chi et al., 2017c). Cette démonstration avait été faite par l'utilisation de techniques multi-spectroscopiques et de modélisation moléculaire. Notre étude représente la première tentative d'une évaluation de l'inhibition des SHs par le DBP avec

l'utilisation de l'ABPP. La réussite de l'approche *in vitro* d'ABPP compétitive exige de travailler à une concentration en sonde basse mais permettant d'observer des protéines marquées, mais aussi à une concentration en DBP suffisamment élevée pour observer une inhibition du marquage des SHs tout en restant en dessous de la limite de solubilité aqueuse (40 μM). Cette stratégie est effective dans le cas où le DBP se fixe au site actif des SHs et restreint la fixation de la sonde TAMRA-FP par compétition, ce qui peut être attendu dans le cas d'enzymes impliquées dans le métabolisme de ce phtalate. Malgré la diversité des enzymes de la famille des hydrolases à sérine (Ortega et al., 2016) aucune inhibition *in vitro* de celles-ci n'a été observée en utilisant des concentrations en dessous de la limite de solubilité du DBP. Seules des concentrations très élevées permettent de mettre en évidence l'inhibition des SHs. L'utilisation de concentrations élevées (jusqu'à 30 mM) pour les expériences de compétition *in vitro* (parfois au-delà de sa limite de solubilité) n'a pas permis de conclure avec certitude quant à l'identification de SHs interagissant avec le DBP. La méthodologie d'ABPP s'est révélée être effective dans le cas d'inhibiteurs irréversibles (Li et al., 2007), comme nous avons pu l'observer avec le PMSF. Une application récente d'ABPP compétitive en présence d'un substrat a pu être exploitée mais sur une cible préalablement établie (Wang et al., 2018; Hao Xu et al., 2015). Compte-tenu des difficultés et incertitudes rencontrées avec cette stratégie, nous nous sommes orientés vers des essais *in vivo* pour tenter de comprendre la perturbation des SHs associées à une exposition au DBP chez le poisson zèbre.

IV.2.3. Mesure de l'activité AChE

La réduction de l'activité de l'AChE est généralement évaluée dans différents organismes aquatiques pour mesurer leur exposition aux xénobiotiques (de Lima et al., 2013; Jee et al., 2009; Xu et al., 2013b). Nous avons exploité cette activité enzymatique dans l'objectif de vérifier que les conditions d'exposition en présence de DBP sont associées à une telle perturbation avant de procéder à l'identification des SHs dont l'expression serait perturbée dans ces mêmes conditions. Tenant compte du fait que cette enzyme peut exister sous une forme moléculaire à la fois liée à la membrane et sécrétée dans les cellules (Rotundo and Fambrough, 1980; Szegletes et al., 1995), les mesures ont été réalisées sur les fractions protéiques solubles et insolubles. Nous avons observé que l'activité de l'AChE était sept fois plus élevée dans la fraction membranaire (insoluble) que dans la fraction cytoplasmique (soluble). Aucune modification statistiquement significative de l'activité AChE n'a été observée entre les trois traitements. Cependant une forte tendance vers une réduction de l'activité AChE est observée en fonction de l'exposition des larves au DBP, surtout à 100 $\mu\text{g/L}$.

Au regard des résultats obtenus, nous ne pouvons pas conclure à une perturbation du développement neuronal chez les larves de poisson zèbre exposées au DBP (5 et 100 µg/L) sur la base de l'activité de l'AChE. Dans une certaine mesure, ces observations sont conformes à celles rapportées par Xu et al., (2013), où aucune inhibition significative de cette enzyme n'a été mise en évidence après exposition des larves de poissons zèbre à 5 et 50 µg/L de DBP. Par contre, l'exposition des larves de poisson zèbre à de fortes doses de DBP (500 µg/L) conduit à une réduction significative de l'activité de cette enzyme (Xu et al., 2013). Sur cette base, nous pouvons émettre l'hypothèse que les concentrations de DBP testées ne sont pas suffisamment élevées pour activer les voies métaboliques liées à la régulation de l'activité de l'AChE, en particulier celles impliquant les récepteurs des aryl-hydrocarbures (AhR) (Wójtowicz et al., 2017; Xie et al., 2021).

IV.2.4. Mesure de l'expression des gènes (*acox-1*, *17β-hsd*, *vtg*) cibles par RT-qPCR

La fonction transcriptionnelle des récepteurs activés par les proliférateurs de peroxysomes (PPARs) est considérée comme le principal mécanisme d'action derrière les changements transcriptionnels induits par les plastifiants dont les phtalates (Gazouli et al., 2002; Mathieu-Denoncourt et al., 2015). L'enzyme peroxysomale acyl-coenzyme A oxydase 1 (*Acox-1*) est d'ailleurs très utilisée comme indicateur de l'activation des PPARs chez les poisson (Ortiz-Zarragoitia and Cajaraville, 2005). Elle catalyse la première étape limitante de l'oxydation peroxysomale des acides gras à chaîne droite moyenne et très longue (Morais et al., 2007), et est induite par les proliférateurs de peroxysomes (PP) via un mécanisme dépendant de PPARα (Lee et al., 1995). Aucune variation statistiquement significative dans les niveaux relatifs d'ARNm d'*acox-1* n'a été observée entre les traitements dans cette étude. Contrairement à nos observations, Uren-Webster et al., (2010) ont démontré que l'exposition des poissons zèbre mâles adultes à 5000 mg/kg de DEHP augmente les niveaux d'expression de deux gènes sensibles aux récepteurs PPARs à savoir l'acyl-coenzyme A oxydase 1 (*acox1*) et l'enoyle-coenzyme A, hydratase/ 3-hydroxyacyl coenzyme A déshydrogénase (*ehhadh*)(Uren-Webster et al., 2010). Cependant, de faibles concentrations en DEHP conduisent à des résultats différents sur d'autres modèles. En effet une exposition des Tête-de-boule mâles (*Pimephales promelas*) à 12 µg/L de DEHP n'entraîne aucune modification du niveau d'expression relatif de l'*acox-1*(Crago and Klaper, 2012). L'utilisation de fortes concentrations de DEHP serait nécessaire à l'induction de l'expression de l'*acox-1 in vivo* (Onorato et al., 2008; Uren-Webster et al., 2010b). L'absence de variation dans l'expression de l'*acox-1* serait donc liée à nos conditions expérimentales (âge des organismes, concentration en DBP et durée d'exposition), mais aussi

au fait que le DBP est un PP plus faible que le DEHP comme le suggère Lapinskas et *al.*, (2004). Les niveaux d'exposition 8 à 10 fois plus élevés du DBP par rapport à celui du DEHP seraient nécessaires pour induire des effets équivalents de type PP *in vivo* (Barber et al., 1987).

La 17 β -hydroxystéroïde déshydrogénase (17 β -HSD) est une enzyme caractérisée par une multifonctionnalité remarquable. Elle a la capacité de moduler les concentrations non seulement de stéroïdes mais aussi d'acides gras et biliaires (Mindnich et al., 2004) et est considérée comme un régulateur clé dans le développement précoce de l'embryon en permettant un maintien de l'homéostasie des stéroïdes, une régulation de la différenciation cellulaire et de l'organogenèse (Khan et al., 1997). Aucun changement dans l'expression relative de la *17 β -hsd* n'a été observé dans la présente étude, même si une tendance vers une réduction semble se dégager à 100 μ g/L de DBP. Les concentrations en DBP testées seraient trop faibles pour induire des variations significatives au niveau de l'expression de ces gènes chez des embryons de poisson zèbre. Dans un autre modèle d'étude, l'exposition des embryons d'ormeau *Haliotis diversicolor supertexta* à des concentrations de DBP de l'ordre de 2 mg/L diminue significativement le niveau d'expression de la 17 β -HSD 12 (Zhou et al., 2011). Comme indiqué précédemment, notre choix de concentrations en DBP lors de l'exposition s'est volontairement porté sur des valeurs susceptibles de refléter une exposition environnementale qui n'est donc pas compatible avec les concentrations décrites ci-dessus dans la littérature.

Tout comme l'*acox-1*, la *17 β -hsd* serait également régulée par les récepteurs PPAR α . Fan et al., (1998) ont démontré chez la souris que l'induction de la 17 β -HSD IV par le DEHP et le DBP était fortement dépendante de l'expression des PPAR α dans le foie et le rein (Fan et al., 1998). Pris ensemble, nos résultats concernant l'expression de l'*acox-1* et la *17 β -hsd* suggèrent que les récepteurs PPAR α n'ont pas été activés par le DBP aux concentrations testées alors que PPAR α est nécessaire à la modification de l'expression des enzymes peroxysomales par les phtalates (Lapinskas et al., 2005).

Concernant la *vtg*, son niveau d'expression chez les larves exposées à 100 μ g/L de DBP est de deux fois inférieur à celui observé chez les larves non-exposées (témoin, DMSO). Selon Ortiz-Zarragoitia et al., (2006) le DBP n'a pas d'effet œstrogénique chez les poissons *in vivo*, et ne peut être considéré comme un xénoestrogène typique comme la 17 α -éthynylestradiol (EE2) (Ortiz-Zarragoitia et al., 2006; Ortiz-Zarragoitia and Cajaraville, 2005). De nombreuses études suggèrent l'induction de la vitellogénine (*vtg*) comme marqueur de toxicité dû aux CPE, mais certains produits chimiques semblent influencer l'expression de la vitellogénine de poisson d'une manière qui diffère du modèle connu (Dang, 2014). Cette différence de réponse

concernant l'expression de la *vtg* témoigne de la complexité des changements induits par les CPE concernant l'expression de biomarqueurs chez les poissons notamment le poisson zèbre.

IV.2.5. Cartographie des hydrolases à sérine du protéome de poisson zèbre

En se référant à l'activité de l'AChE et au niveau d'expression des gènes *acox-1* et *17β-hsd* en présence de DBP, nous pouvons supposer que les voies moléculaires correspondantes sensibles au DBP ne sont pas significativement activées dans nos conditions expérimentales (ou faiblement activées si l'on considère les tendances observées). Cependant, la perturbation de l'ARNm de la vitellogénine (*vtg*) suggère le contraire. Le DBP active donc de manière différentielle les voies moléculaires impliquées dans la perturbation de ces biomarqueurs dans nos conditions expérimentales. Cette variabilité dans les réponses biologiques souligne la pertinence de notre démarche d'associer à l'ABPP la mesure d'autres biomarqueurs sensibles au DBP par des approches différentes.

Conformément à nos objectifs initiaux, nous avons cartographié les SHs dans le protéome des larves de poisson zèbre puis évalué leurs profils en fonction de l'exposition au DBP. En se référant aux données retrouvées dans la littérature scientifique, un seul travail de recherche - réalisé dans le cadre d'une thèse (Esbroeck, 2019) - s'est intéressé avant nous à la cartographie des SHs dans le protéome du poisson zèbre. Cependant les données n'ont pas été publiées sous forme d'article à ce jour et l'exploitation de la perturbation de l'expression de ces enzymes actives en présence de CPE n'a de plus jamais été exploitée à ce jour.

Dans la présente étude, nous avons cartographié au total 53 hydrolases à sérine dans le protéome des larves de poisson zèbre. Parmi celles-ci, 49 SHs sont identifiées avec une confiance élevée dans les trois conditions testées (figure 58). Cette cartographie a été réalisée exclusivement avec l'utilisation de la sonde dB-FP (2 μM) une sonde fluorophosphonate couplée à la desthiobiotine. Contrairement à notre travail, Esbroeck (2019) a utilisé un mélange de sonde FP-biotine (sonde fluorophosphonate couplée à la biotine, 10 μM) et MB108 (une sonde ABPP couplée à la biotine et basée sur l'activité de la diacylglycérol lipase-α, 10 μM) (Baggelaar et al., 2015, 2013). Le choix de mixer les deux sondes a été fait par cet auteur pour pallier le manque de spécificité des sondes fluorophosphonate (FP) vis-à-vis de certaines enzymes de la famille des hydrolases à sérine, notamment la diacylglycérol lipase-α (Baggelaar et al., 2013). L'utilisation d'un mélange de sondes réactives vis-à-vis des hydrolases à sérine à des concentrations élevées (10 μM de chaque sonde) a permis à ces auteurs de cartographier 45 SHs dans le protéome des larves de poisson zèbre âgées de 5 jpf (Esbroeck, 2019). En comparant notre liste de SHs à celle

rapportée par Esbroeck, nous avons identifié 28 SHs communes aux deux études, 17 SHs spécifiques à l'étude d'Esbroeck et 25 spécifiques à notre étude. Le nombre élevé d'enzymes réactives aux sondes FP identifiées dans notre cas malgré l'utilisation d'une faible concentration en sonde pourrait être liée au fractionnement protéique réalisée, mais surtout à l'utilisation d'un nombre élevé de larves (~ 150 larves âgées de 5 jpf). En effet, Esbroeck (2019) et ses collaborateurs ont utilisé 5 larves par échantillon à partir desquels une extraction de lysat brut a été réalisée avant le marquage ABPP. La sensibilité des méthodes analytiques employées en MS pourrait aussi être l'un des facteurs justifiant des différences dans le nombre de cibles protéiques identifiées.

Les résultats obtenus montrent que la stratégie développée conduit à l'identification d'un nombre important de SHs ce qui indique une spécificité élevée de la sonde fluorophosphate dB-FP utilisée lors de l'ABPP. En plus des SHs identifiées à l'aide de dB-FP, 3 protéines autres que les SHs ont été également identifiées. Cette capacité des sondes à réagir dans une moindre mesure avec des protéines autres que les SHs a déjà été rapportée par plusieurs auteurs (Dolui et al., 2020; Elahi et al., 2019). Dans notre cas, l'identification exclusive de la protéine Colq dans la fraction insoluble est très intéressante car elle permet de comprendre la forte activité spécifique d'AChE observée dans cette fraction. Pour rappel l'activité spécifique AChE était 7 fois plus élevée dans la fraction insoluble par rapport à la fraction soluble. Bernard et al. (2011) ont rapporté que la présence d'AChE au niveau des jonctions neuromusculaires dépend principalement, sinon exclusivement, de son association avec Colq. Cependant, en plus du complexe AChE-Colq, les extraits musculaires totaux contiennent également des tétramères d'AChE non associés au Colq. Nous faisons l'hypothèse que la forte présence de la protéine Colq à laquelle seraient associées les sous-unités de l'AChE soit responsable de la forte activité d'AChE observée dans la fraction insoluble.

Mais comment expliquer l'absence de l'AChE dans la liste des SHs identifiées alors qu'une forte activité de cette enzyme a été observée ? Une des hypothèses est que l'absence de l'AChE dans la liste des SHs identifiées serait peut-être liée au fait qu'elle soit complexée avec d'autres protéines telles que Colq. Aucune différence statistiquement significative de l'expression de cette protéine n'a été observée entre les trois conditions d'études comme c'est déjà le cas avec la mesure de l'activité AChE. Toutefois, il est important de souligner que la réaction d'Ellman (Ellman et al., 1961) utilisée pour la mesure de l'activité AChE peut aussi être catalysée par d'autres cholinestérases présentes dans le protéome de poisson zèbre. En effet, plusieurs cholinestérases ont été identifiées parmi les SHs, il s'agit notamment de *cel.1*, *cel.2*, *ces2b* et

si:ch73-89b15.3 (tableau VIII). Tan *et al.*, (2021) ont démontré que la Ces2b, une enzyme de type butyrylcholinestérase (BChE) de poisson zèbre avait une plus grande efficacité catalytique dans l'hydrolyse de l'acétylcholine que la butyrylcholine. La Ces2b serait peut-être impliquée dans notre cas dans l'hydrolyse de l'acétylcholine au cours de la réaction d'Ellman utilisée pour la mesure de l'activité AChE. Bien qu'étant de type BChE, la Ces2b aurait une origine commune avec l'estérase carboxylique plutôt qu'avec la BChE (Tan *et al.*, 2021). Etant donné que le génome du poisson zèbre ne contient pas de gène codant pour la BChE (Bertrand *et al.*, 2001) cette hypothèse de Tan *et al.*, (2012) sur l'origine du Ces2b semble crédible.

Outre la protéine Colq, nous avons également identifié parmi les protéines autres que les SHs avec un niveau de confiance élevé dans les trois conditions d'étude la protéine alpha-2-macroglobulin-like (A2ml), un inhibiteur de protéase à sérine (Harwood *et al.*, 2020). Il s'agit d'une protéine spécifiquement exprimée dans le foie au cours de la différenciation et dont la répression de l'expression inhibe la croissance et la différenciation du foie chez le poisson zèbre (Hong and Dawid, 2008). De nombreuses protéases à sérine existent *in vivo* sous forme de complexes inactifs avec des protéines inhibitrices endogènes (Monsees *et al.*, 1997). La sonde dB-FP aurait donc réagi avec non pas l'A2ml mais un complexe formé de l'A2ml et d'une autre protéase à sérine. L'A2ml aurait alors été copurifiée avec une SH tout comme a pu l'être Colq. Ce cas de figure avait déjà été envisagé par les pionniers qui ont développés les sonde réactives à base de fluorophosphonate, notamment l'équipe de Cravatt (Liu *et al.*, 1999). Cependant, cette capacité des sondes FP à se lier à des complexes protéiques composés d'inhibiteurs de protéases à sérine reste très faible (Liu *et al.*, 1999). Nous n'avons pu à ce jour expliquer l'origine de la présence de la protéine « chloride intracellular channel 3 » (Clic3). Une publication ancienne (Durieux *et al.* 1994) souligne qu'un courant transmembranaire associé aux ions chlorure peut être activé par la trypsine, une SH, ce qui pourrait suggérer une interaction entre Clic3 et cette SH. Ainsi une co-précipitation avec une SH pourrait en être la cause comme pour Colq et A2ml mais cette hypothèse devra faire l'objet d'études pour en vérifier sa validité.

IV.2.6. Changements fonctionnels des SHs en fonction de l'exposition au DBP

Deux protéases à sérine (Ctsa et Fap) et une hydrolase à sérine métabolique (Dpp4) différemment exprimées en fonction d'une exposition au DBP ont été identifiées. Elles sont toutes caractérisées par une activité exopeptidase. Ces protéines ont été identifiées pour la première fois comme dérégulées par le DBP aussi bien chez le poisson zèbre que chez d'autres organismes modèles de l'exposition au CPE (tels que la souris ou le rat). Le DBP a pour effet

l'induction de l'expression de la Ctsa et l'inhibition de l'expression de la Fap et de la Dpp4 sous forme active chez les larves de poisson zèbre. La protéine Dpp4 étant un homologue de la Fap, l'activité de ces deux protéines semble être corrélée comme l'indique l'inhibition observée à 100 µg/L de DBP.

La protéine Fap existe sous forme liée à la membrane et secrétée, et participe principalement à la dégradation des protéines de la matrice extracellulaire (MEC) telles que les collagènes (Piñeiro-Sánchez et al., 1997). Elle a été identifiée dans les fractions solubles et insolubles mais aucune différence statistiquement significative n'a été observée suivant les traitements pour la fraction insoluble. Wei et al. (2020) ont rapporté qu'une inhibition pharmacologique de Fap favorise l'ostéogenèse chez les jeunes souris et la minéralisation chez le poisson zèbre. La répression de l'expression de Fap active par le DBP pourrait donc avoir comme effet une accélération de la minéralisation des vertèbres chez les larves de poisson zèbre.

Dpp4 est une enzyme multifonctionnelle qui sert de partenaire de liaison pour de nombreuses protéines, parmi lesquelles l'adénosine désaminase (ADA) et les protéines de la MEC. De plus, elle clive de nombreux substrats, ce qui amplifie encore sa complexité d'action (Röhrborn et al., 2015). L'expression de Dpp4 est sensiblement dérégulée dans une variété d'états pathologiques, notamment l'inflammation, le cancer, l'obésité et le diabète (Röhrborn et al., 2015). Une inhibition de Dpp4 est associée à une réduction de l'acide urique, des niveaux de 3-nitrotyrosine (marqueur du stress oxydant) et de l'inflammation du rein de souris obèses (Nistala et al., 2014). Les CPE de type phtalate sont suspectés pour leur implication dans l'obésité sans que des preuves substantielles ne soient apportées (Cooke et al., 2013) pour expliquer le mécanisme d'action à la base de cette perturbation. L'identification des SHs dérégulées telles que la Dpp4 sous l'action du DBP apporte ainsi de nouvelles informations qui méritent une investigation plus approfondie.

De même que pour l'enzyme Dpp4, très peu de données existent sur l'expression de Ctsa chez le poisson zèbre. Cette protéase à sérine est membre de la famille des protéases à sérine S10 et est identifiée comme la principale protéase lysosomale dans le rein du rat (Shibko et al., 1965). La carboxypeptidase/cathepsine A (Ctsa) est distribuée entre les lysosomes et la MEC dans le cœur (Hohl et al., 2020). En plus de son activité carboxypeptidase, la Ctsa agit également comme une désaminase et estérase, et est capable de réguler la pression artérielle chez les rats et les souris grâce à la dégradation de l'angiotensine ou de l'endothéline-1 (Reich et al., 2010). La dégradation médiée par Ctsa des peptides extracellulaires peut contribuer au remodelage de la MEC et au dysfonctionnement du ventricule gauche (VG). Par exemple, Holl et al., (2020)

ont démontré qu'une surexpression de Ctsa dans le cœur et l'augmentation de son activité dans le VG réduit de 43% l'expression de l'enzyme antioxydante extracellulaire superoxyde dismutase (EC-SOD). Cette réduction de l'EC-SOD médiée par Ctsa dans le cœur contribue à l'augmentation du stress oxydant ainsi qu'au remodelage de la MEC et à une augmentation de l'inflammation. La Ctsa pourrait donc être une cible thérapeutique potentielle pour prévenir le remodelage ventriculaire (Hohl et al., 2020). L'augmentation de l'expression de la Ctsa chez les larves de poisson zèbre en présence de DBP pourrait donc avoir des conséquences sur plusieurs voies métaboliques comme celles identifiées chez la souris par l'intermédiaire d'une cascade de réaction moléculaire.

Il se peut que ces trois protéines dérégulées par le DBP soient liées par des mécanismes moléculaires liées aux voies métaboliques impliquées. Par exemple l'augmentation de Ctsa a pour effet une augmentation de l'inflammation (Hohl et al., 2020) alors que Dpp4 est quand elle sensiblement dérégulée par l'inflammation (Nistala et al., 2014) et l'activité de Dpp4 est corrélée à celle de Fap (Wei et al., 2020). De plus, ces SHs ont toutes un rôle en lien avec la matrice extracellulaire, soit en participant à la dégradation des protéines de la MEC (Fap), soit en contribuant à son remodelage (Ctsa) ou en servant de partenaire de liaison pour les protéines de la MEC (Dpp4). Ces remarques ne visent pas à conclure quant à une relation de cause à effet directe ou indirecte, mais de souligner la possibilité d'un potentiel lien entre les SHs dérégulées par le DBP chez les larves de poisson zèbre. L'utilisation d'une approche de protéomique ciblée de type ABPP en écotoxicologie peut donc contribuer à élucider les mécanismes d'actions derrière les effets induits par les xénobiotiques chez les organismes aquatiques en complément des approches de protéomique comparative globale, des approches omiques en général et de l'utilisation de biomarqueurs d'exposition.

D'autres SHs connues pour leurs rôles dans le métabolisme des phtalates ont également été identifiées dans cette étude. Il s'agit notamment de la carboxylesterase (autres que les cholinestérases) impliquée dans le métabolisme du DBP (Lin et al., 2017) et de la trypsine dont l'activité est inhibée par les phtalates tels que le DBP (Chi et al., 2017a).

Aucune des SHs identifiées dans cette étude n'a été rapportée jusqu'à présent en lien avec une perturbation de leur expression lors d'une exposition au DBP. On retrouve très peu d'exemples d'utilisation d'approches de protéomique ciblée telles que l'ABPP pour l'identification des protéines dérégulées en fonction d'une exposition aux xénobiotiques en générale et au DBP en particulier. L'utilisation d'une approche de protéomique globale est plus souvent rapportée. Elle permet de cartographier plus globalement le protéome des organismes afin d'identifier les

protéines dérégulées. Par exemple avec l'utilisation de la méthode iTRAQ de protéomique différentielle non ciblée, Dong et *al.*, (2018) ont identifié 41 protéines dérégulées en présence de DBP (50 µg/L) chez le poisson zèbre. De même, Mu et *al.* (2018) ont identifié 257 protéines dérégulées chez des larves de poisson zèbre exposées au DBP (50 µg/L) dont 217 surexprimées et 40 sous-exprimées. Aucune des SHs identifiées dans notre étude ne figure dans les travaux rapportés dans les deux publications. Bien que n'ayant pas obtenu un nombre élevé de protéines dérégulées en comparaison des travaux rapportés par ces auteurs, nous avons identifié des protéines orthologues utilisées comme cibles thérapeutiques ou biomarqueurs de diagnostic de maladies chez l'Homme. Environ 70% des gènes humains ont au moins un orthologue évident chez le poisson zèbre (Howe et al., 2013). Dans cette étude nous avons identifié 4 SHs orthologues chez l'Homme utilisées comme biomarqueurs dans le diagnostic et l'efficacité du traitement de plusieurs formes de cancer (PLA2G7, CELA1 et FASN) (Falchhook et al., 2021; Weiss et al., 2016; Zhang et al., 2012; Zheng et al., 2021), de dyslipidémie (LCAT) (GlaxoSmithKline, 2019) et l'AVC ischémique (PLA2G7) (Albers, 2019). A ces 4 SHs on peut ajouter Fap et Ctsa qui sont aussi de potentiels cibles thérapeutiques (Hohl et al., 2020; Wei et al., 2020). Ces informations suggèrent dans leur ensemble que le poisson zèbre (larves) pourrait être un modèle pertinent dans le processus de découverte d'inhibiteurs de SHs notamment pour la découverte de médicaments (Patton et al., 2021). Plus encore, nos résultats ont montré que les approches de protéomique ciblée telles que l'ABPP peuvent être d'un intérêt considérable pour comprendre les MOA liés aux xénobiotiques en écotoxicologie.

En se référant aux travaux de Dong et *al.*, (2018) et Mu et *al.* (2018) cités plus haut, on remarque que des dizaines de protéines dérégulées sont rapportées avec l'utilisation d'une concentration en DBP de 50 µg/L pour une exposition des larves pendant 96 hpf. Le scénario de forte contamination environnementale mimée par l'utilisation d'une concentration en DBP de 100 µg/L aurait pu permettre d'identifier clairement des différences significatives entre larves exposées et non-exposées dans notre cas. Cependant, les fortes variabilités entre les réplicats biologiques n'ont pas permis de mettre en évidence avec une bonne certitude plus de SHs impactées par la présence de DBP dans le milieu d'exposition des larves de poisson zèbre. Il est bien établi que la membrane embryonnaire et le chorion forment une barrière protectrice et réduisent ainsi la sensibilité des embryons de poisson zèbre aux produits chimiques (Embry et al., 2010; Velki et al., 2017; C. Xu et al., 2008). À 96 hpf, 31 % des embryons étaient encore protégés par le chorion, tandis que l'absence de chorion chez 69 % des larves les rendait plus susceptibles d'être exposées au DBP. Cette variation biologique entre individus d'un même

groupe peut avoir empêché l'observation de différences dans l'expression des SHs, d'autant plus que les écarts-types mesurés entre répliquats d'un même groupe sont élevés, comme le montre l'activité AChE. Cette limitation à l'utilisation du poisson zèbre durant le stade embryon-larvaire a déjà été rapportée (Simmons et al., 2015).

In fine, nous avons démontré l'utilité de l'approche ABPP dans la recherche en écotoxicologie par la cartographie des SHs actives dans le protéome de larves de poisson zèbre. L'annotation fonctionnelle de 49 SHs communes aux 3 conditions d'exposition en présence de DBP (témoin DMSO, C5, C100) apporte de nouvelles informations sur l'implication de ces enzymes dans différentes voies métaboliques chez le poisson zèbre. Nous avons identifié 3 SHs dérégulées par le DBP (Ctsa, Fap et Dpp4). La forte variabilité dans les répliquats biologiques limite l'identification d'autres SHs dérégulées. L'utilisation d'un nombre plus élevé de répliquats biologique (5 à 6) aurait amélioré l'interprétation des résultats. Compte-tenu de l'exploitation d'enzymes métabolisant les xénobiotiques comme biomarqueurs d'exposition, il serait approprié de continuer à évaluer l'expression des SHs en relation avec le DBP ou d'autres xénobiotiques afin de découvrir des biomarqueurs plus sensibles en utilisant l'approche ABPP. La perturbation de l'expression de Ctsa, Fap et Dpp4 en particulier devra être vérifiée par des techniques complémentaires telles que Western blot et mesures d'activité enzymatique. La comparaison de la sensibilité de leur expression vis-à-vis d'une variété de xénobiotiques (EDC et autres) devra ensuite être évaluée avant d'envisager leur utilisation en tant que biomarqueurs d'exposition aux CPE et au DBP en particulier.

NB : Un article en lien avec ces résultats a été rédigé et soumis dans le journal Zebrafish. La version soumise est en annexe 1.

Conclusions & Perspectives

Sur la base des connaissances actuelles, les effets des CPE sont mieux documentés que les mécanismes qui les induisent (Cooke et al., 2013; La Merrill et al., 2020). Les mécanismes d'action des CPE décrits à ce jour mettent en jeu différents récepteurs tels que les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes (PPARs) (Bility, 2004; Lapinskas et al., 2005), les récepteurs d'androgènes (AR), les récepteurs d'œstrogènes (ERs) et les récepteurs thyroïdiens (Cooke et al., 2013). Cependant, tous les effets ne sont pas médiés par ces récepteurs (Amiard and Amiard-Triquet, 2017; Brander, 2013). Les mécanismes d'action des CPE ne peuvent donc pas être systématiquement restreints aux seules interactions avec des récepteurs hormonaux.

Classiquement, les approches de protéomique globale permettent d'identifier les protéines dérégulées d'un point de vue de leur expression sous l'action des polluants. De telles informations sont précieuses, mais il n'est pas rare que des variations de l'expression des mêmes protéines (telles que les protéines de défense contre le choc thermique et le stress oxydant, les enzymes du métabolisme énergétique et les protéines du cytosquelette etc.) soient rapportées pour des polluants non apparentés sans pour autant que les effets induits par ces différents polluants ne soient identiques (Dong et al., 2018; Groh and Suter, 2015; Mu et al., 2018). En revanche, les protéines répondant plus spécifiquement aux polluants sont beaucoup moins fréquemment détectées. Ainsi, les réponses du protéome des organismes modèles tels que le poisson zèbre au stress environnemental mises en évidence par différentes études semblent dépendre davantage de son intensité que de sa nature (Groh and Suter, 2015).

En considérant la multiplicité des fonctions cellulaires et physiologiques des récepteurs et protéines ciblées par les CPE, il peut être utile pour un PE d'intérêt de cartographier ses cibles protéiques à l'échelle du protéome d'un organisme modèle. Les protéines nouvellement identifiées pourront apporter des informations susceptibles de nous éclairer davantage sur les effets néfastes de ce PE d'intérêt chez l'organisme étudié.

C'est donc sur la base de ce constat de la nécessité d'apporter des réponses claires quant aux interactions spécifiques polluants-protéines que notre travail de recherche a été initié et que ces diverses expériences ont été réalisées. Notre premier objectif a été d'exploiter une approche de profilage protéique basé sur l'affinité pour identifier les cibles protéiques du polluant modèle DBP chez le poisson zèbre. Cet objectif a été décliné en trois objectifs spécifiques : (i) concevoir et synthétiser des sondes de photoaffinité à utiliser dans l'approche *AfBPP*, (ii) tester et valider l'utilisation de ces sondes dans des expériences *in vitro* et (iii) utiliser les sondes validées pour l'identification des cibles protéiques du DBP dans le protéome du poisson zèbre.

Deux sondes analogues au DBP portant un azide photoactivable ont été synthétisées dans un premier temps et ont fait l'objet d'une série de test de validation. Les propriétés physicochimiques modélisées de ces sondes sont assez proches de celles du DBP. Bien qu'elles soient en mesure de se fixer à des cibles protéiques de façon dépendante d'une irradiation UV, les sondes azide n'ont pas présenté de spécificité de marquage des sites de fixation du DBP sur les protéines dans les conditions expérimentales utilisées. La spécificité de fixation des sondes aux sites du DBP est un critère capital pour leurs utilisations dans l'approche *AfBPP* que nous exploitons. En absence d'une telle spécificité de marquage, il ne semblait pas pertinent de les utiliser pour cartographier les cibles protéiques du DBP chez le poisson zèbre (dans ces conditions expérimentales). De nouvelles molécules photoactivables d'une conception différente de celle des sondes azide ont alors été synthétisées et testées afin de tenter de pallier les limites de ces sondes. Ces nouvelles sondes diffèrent des sondes azide non seulement par le type de groupe photoactivable, mais aussi par leur position sur la structure moléculaire du DBP. L'une, portant le groupe photoactivable sur les deux chaînes aliphatiques (diazirine-3), a des propriétés physicochimiques différentes de celle du DBP, et serait potentiellement plus toxique que le DBP pour les organismes aquatiques. Cette sonde a de plus une très faible affinité de fixation aux protéines. Compte-tenu de ces limites, nous avons conclu que la diazirine-3 n'était pas adaptée à l'approche *AfBPP*. La deuxième sonde (diazirine-2) porte le groupe photoactivable sur une seule chaîne aliphatique. Elle a des propriétés physicochimiques modélisées plus proche de celles du DBP que la diazirine-3 et surtout une bonne spécificité de liaison aux sites de fixation du DBP. Cependant, elle présente une cinétique de fixation covalente aux cibles protéiques indépendamment d'une irradiation à l'UV, qui prédomine sur la fixation dépendant des UV. L'avantage du marquage de photoaffinité est de disposer d'un moyen de contrôler facilement les conditions de fixation covalente et cet avantage est en partie perdue dans les conditions expérimentales utilisées avec la sonde diazirine-2.

In fine nous n'avons pas pu aller au bout des objectifs que nous nous sommes fixés: identifier les cibles protéiques du polluant modèle DBP chez le poisson zèbre. L'étape de la validation qui devrait nous permettre de retenir une sonde candidate à exploiter n'a pas été fructueuse à ce jour. Cependant, l'une des sondes synthétisées semble prometteuse. Il s'agit de la diazirine-2, mais son utilisation nécessiterait des expériences supplémentaires pour lever le marquage en absence de photoactivation. Pour empêcher cette forte réactivité de la diazirine-2 en absence d'UV qui pourrait être liée à la présence de nucléophiles tels que les résidus Cys des protéines,

nous proposons un prétraitement des protéines avec un agent alkylant des Cys tel que l'iodoacétamide ou le N-éthylmaléimide, comme indiqué dans les perspectives.

L'autre approche chémoprotéomique exploitée a fait appel cette fois à l'utilisation de sondes ABPP ciblant les hydrolases à sérine. Dans la littérature scientifique, de nombreuses études portent sur l'implication de certaines hydrolases à sérines dans les mécanismes liés à la toxicité des phtalates chez diverses espèces. L'AChE et la carboxylestérase sont ainsi souvent utilisées comme biomarqueurs d'exposition aux polluants dont les esters de phtalate. Compte tenu des rôles clés que jouent les SHs dans de nombreux processus physiopathologiques (Bachovchin and Cravatt, 2012; Liu et al., 1999) on pourrait s'attendre à ce qu'il y ait d'autres enzymes de cette famille impliquées dans la toxicité des xénobiotiques. On dénombre chez l'Homme plus de 200 enzymes appartenant à la superfamille des hydrolases à sérine (Bachovchin and Cravatt, 2012). Sachant qu'environ 70% des gènes humains ont au moins un orthologue évident du poisson zèbre (Howe et al., 2013), nous avons émis l'hypothèse d'une part que des SHs autres que celles déjà connues chez le poisson zèbre seraient impliquées dans les métabolismes des xénobiotiques, en lien avec les phtalates. D'autre part, nous avons postulé que l'étude de l'expression des SHs pourrait être une piste pertinente pour la recherche de marqueurs d'exposition aux phtalates, d'où le second objectif de la thèse.

A ce jour, aucune étude ne s'est intéressée à la cartographie globale de cette classe d'enzymes chez *D. rerio*. L'étude de cette classe d'enzymes a été facilitée par l'utilisation d'une approche de protéomique ciblée appelée profilage protéique basé sur l'activité (*activity-based protein profiling*, ABPP) qui utilise une sonde réactive des hydrolases à sérine. Cette sonde permet le marquage et l'identification ultérieure des enzymes grâce à la reconnaissance chimique d'un mécanisme catalytique spécifique (Cravatt et al., 2008).

En complément de l'approche AfBPP que nous avons exploité pour la cartographie des cibles protéiques du DBP chez le poisson zèbre, nous nous sommes alors proposés d'utiliser l'ABPP pour cartographier les SHs actives dans le protéome des larves de poisson zèbre et de tester l'hypothèse selon laquelle la perturbation du profil d'activité de certains SHs pourrait être associée à l'exposition au DBP. Afin de nous assurer que les différentes voies métaboliques liées à la présence du DBP ont été activées chez les larves de poisson zèbre dans nos conditions expérimentales, d'autres biomarqueurs sensibles au DBP ont également été testés. Il s'agit de l'inhibition de l'activité de l'AChE, biomarqueur sensible aux neurotoxiques dont le DBP, et de

la mesure du niveau de transcription de trois gènes cibles souvent dérégulés en présence de DBP (*vtg*, *17β-hsd*, *acox-1*).

Les poissons zèbres ont été exposés à 0, 5 et 100 µg/L de DBP de 4 à 120 h après la fécondation. Une diminution significative du niveau d'expression de la vitellogénine d'environ 2 fois par rapport au témoin a été observée chez les larves exposées à 100 µg/L de DBP. Le premier profilage complet des SHs actives dans le protéome du poisson zèbre a été mis en évidence avec une approche ABPP. Parmi les 49 SH identifiés avec un niveau de confiance élevé, l'activité de trois enzymes, Ctsa, Fap et Dpp4, étaient perturbées chez les larves exposées à 100 µg/L de DBP. A notre connaissance, c'est la première fois que de telles enzymes sont identifiées comme étant dérégulées suite à une exposition au DBP. Ces trois enzymes devront faire l'objet d'une validation (voir perspectives) avant d'être utilisées comme de potentiels marqueurs d'expositions aux phtalates (DBP).

Pris ensemble, nos résultats globaux indiquent que les approches de protéomiques ciblées telles que l'ABPP peuvent être un atout pour comprendre les mécanismes d'actions liés aux xénobiotiques en écotoxicologie.

Perspectives

- Utilisation de l'approche AfBPP

Les expérimentations avec les sondes azide ont suggéré que ces sondes ne semblaient pas adaptées pour identifier les partenaires protéiques du DBP. Leur utilisation dans cet objectif ne peut cependant être totalement exclue. En effet, nous avons souligné une possible fixation de ces sondes dans des domaines non spécifiques hydrophobes des protéines qui pourraient être rendus accessibles par un effet de changement conformationnel/dénaturation des protéines en présence du DBP. Il est probable que cet effet dépende de la concentration en sonde azide et en DBP comme les résultats obtenus le suggèrent. Une piste de recherche pourrait alors consister à utiliser des concentrations très faibles en sonde et en compétiteur DBP afin d'éviter ce possible effet de dénaturation protéique. L'utilisation d'une méthode de détection des adduits très sensible après photoactivation serait alors indispensable. Il serait alors possible d'employer une détection par chimiluminescence (streptavidine-HRP) après couplage à la biotine par CuAAC plutôt qu'au fluorochrome TAMRA.

L'exploitation des sondes azide suggère de plus une utilisation possible pour montrer aussi bien sur des protéines modèles purifiées que sur un protéome globale une activité de dénaturation

protéique du DBP conduisant à une augmentation du marquage de photoaffinité. Nous devons d'abord vérifier à court terme cette hypothèse. Si elle se confirme, elle permettra d'une part de mettre en évidence l'activité dénaturante du DBP ainsi que potentiellement d'autres phtalates. Ceci permettrait ainsi de démontrer une activité méconnue des phtalates sur le vivant (protéines, membranes lipidiques). De plus, ces sondes azido pourraient être utilisées d'une manière plus globale pour mettre en évidence des perturbations conformationnelles des protéines, par exemple en présence de xénobiotiques, sans nécessité de disposer de protéines purifiées ce qui constituerait une avancée méthodologique.

Pour ce qui concerne les sondes diazirine, il serait intéressant de tester dans un premier temps l'hypothèse formulée sur l'acylation des protéines par la sonde diazirine-2 en absence d'UV. Si la réactivité de la sonde diazirine-2 sans irradiation est due à l'acylation des protéines, un prétraitement des protéines avec de l'iodoacétamide ou le N-éthylmaléimide avant l'introduction de la sonde pourrait permettre de neutraliser cette réaction avec les thiols des protéines. L'acylation des protéines *in vivo* est une réaction bien décrite dans la littérature scientifique, elle consiste en la formation co- ou post-traductionnelle d'une liaison covalente entre par exemple des acides gras activés en acyl-CoA et un résidu d'acide aminé (prioritairement cystéine, mais aussi sérine ou amine) de la chaîne polypeptidique des protéines substrats (Ezanno et al., 2013).

Le schéma 16 illustre cette hypothèse appliquée à la sonde diazirine-2, et présente les deux réactions possibles. L'acylation des protéines se produirait soit uniquement sur une seule des deux chaînes aliphatiques de la sonde diazirine, ce qui rendrait possible la ligation bioorthogonale par CuAAC du tag et permettrait la visualisation des protéines marquées, comme nous avons pu l'observer. La deuxième réaction possible est une acylation sur les deux chaînes aliphatiques, il n'y aurait plus d'alcyne sur la sonde pour un couplage du tag par CuAAC. Etant donné que nous arrivons à fixer des tags aux adduits et à visualiser les protéines marquées, nous privilégions la piste d'une acylation sur une seule chaîne aliphatique de la sonde, celle contenant le groupe photoactivable. Le mécanisme proposé serait aussi compatible avec le très faible marquage observé expérimentalement avec la sonde diazirine-3.

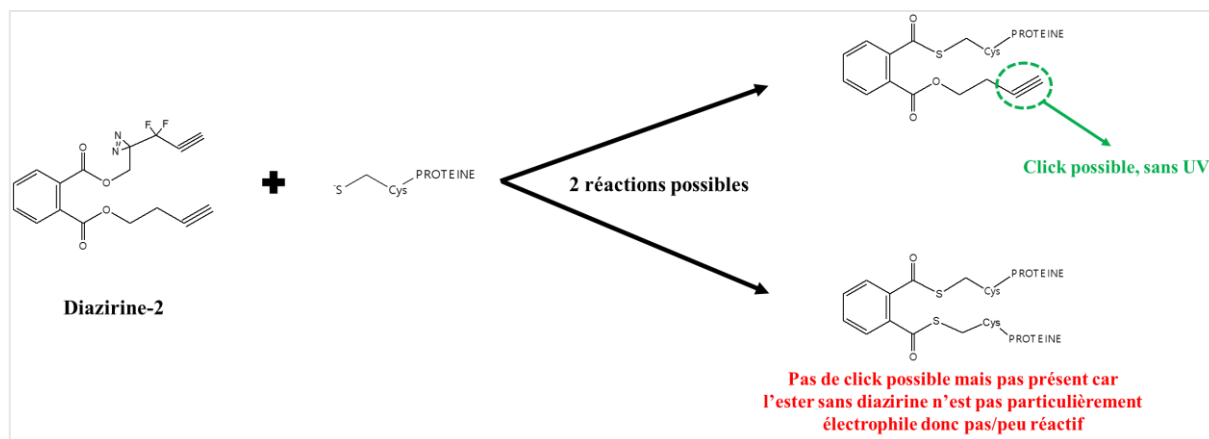


Schéma 16 : Illustration de l'hypothèse d'acylation des protéines par la diazirine-2.

En absence d'une diminution du marquage aspécifique après un prétraitement à l'iodoacétamide ou le N-éthylmaléimide (agents de modifications chimiques spécifiques des Cys), on pourrait envisager la synthèse de nouvelles sondes photoactivables. Nous proposons la synthèse de la sonde illustrée sur la figure 62. Le principe de fonctionnalisation de cette sonde est le suivant :

- Utilisation de la diazirine photoactivable sans fluor adjacent ;
- Fixation de la diazirine sur une seule chaîne aliphatique ;
- L'alcyne destinée à la réaction de ligation bioorthogonale par CuAAC sera fixée également sur une seule chaîne aliphatique ;

L'absence de fluor adjacent à la fonction diazirine pourrait diminuer le caractère électrophile de la fonction ester et donc sa réactivité vis-à-vis de nucléophiles protéiques tels que les résidus Cys. Une seule fonction alcyne devrait être suffisante pour permettre le couplage du tag par CuAAC. Un deuxième alcyne pourrait cependant être placé sur la deuxième chaîne aliphatique. Il pourrait permettre d'augmenter la sensibilité de détection. L'estimation des paramètres physicochimiques montre que cette sonde a pratiquement le même log Kow que le DBP (4,6). De plus, elle aurait une meilleure solubilité que la sonde diazirine-2 (0,1679).

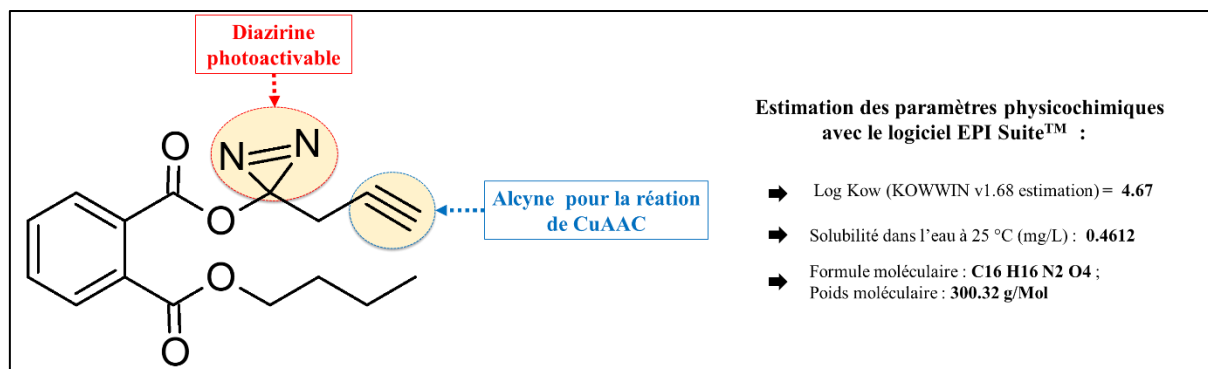


Figure 62 : Illustration de la nouvelle sonde photoactivable

Il serait également pertinent de procéder à la validation *in vivo* de la sonde candidate à l'issue de la validation *in vitro* afin de s'assurer qu'elle a une toxicité comparable à celle du DBP chez les larves de poisson zèbre (Veale, 2021). Cette validation pourrait se faire par la mesure de l'expression de la vitellogénine par RT-qPCR après exposition des larves aux divers contaminants : DMSO (solvant), DBP (contrôle positif) et sonde (molécule à tester). Des réponses proches dans l'expression de la vitellogénine entre le DBP et la sonde photoactivable candidate tendrait à montrer que les deux molécules exercent les mêmes effets toxicologiques *in vivo* chez *D. rerio*. La sonde pourrait alors être validée pour une utilisation comme un analogue du DBP, pour des recherches des partenaires protéiques du DBP. Son équivalent analogue du MBP pourrait permettre de cartographier selon le même principe les protéines fixant le MBP. Une comparaison des profils obtenus avec la sonde analogue du DBP et celle analogue du MBP fournirait des informations pertinentes pour la compréhension des mécanismes de toxicité du DBP et de son principal métabolite. L'imagerie des adduits formés sur les larves de poisson zèbre pourrait aussi apporter de manière complémentaire des informations sur la localisation de ces protéines.

Enfin, le marquage covalent des protéines par la sonde diazirine-2 en absence d'irradiation conduisant à un marquage des protéines, il n'est pas exclu que cette sonde soit utilisable par le biais d'une approche AfBPP. Dans ce cas, la réactivité de la sonde ne serait pas liée à l'irradiation mais à une fixation dépendant de la présence de résidus nucléophiles dans les sites de fixation des protéines cibles. Si la fixation est dépendante de la reconnaissance moléculaire, on parle alors de marquage d'affinité. Les résultats obtenus avec la sonde diazirine-2 lors des expériences de compétition en présence du DBP pourraient suggérer que c'est le cas mais doivent être approfondis. En effet, comme nous l'avons indiqué précédemment, le DBP à forte concentration pourrait perturber la conformation native des protéines ce qui conduirait à une diminution du marquage sans lien avec une véritable compétition. Là aussi, il conviendra

d'utiliser des méthodes de détection des adduits sensibles (chimiluminescence) pour exploiter des concentrations faibles en diazirine-2 et DBP.

- **Utilisation de l'approche ABPP**

Bien que les écarts-types larges entre les trois conditions d'expositions n'aient pas permis d'identifier beaucoup de SHs dérégulées en présence du DBP, les trois enzymes Fap, Ctsa et Dpp4 sont des pistes sérieuses de biomarqueurs à investiguer. Une première étape peut consister à confirmer par Western blot le différentiel d'expression et par RT-qPCR le niveau de l'ARNm. Il pourrait également être pertinent de développer des tests biochimiques pour comparer les activités de ces enzymes dans différentes conditions d'exposition. Il serait aussi intéressant de tester d'autres esters de phtalate (autre que le DBP) ainsi que d'autres perturbateurs endocriniens dans le cadre d'expositions contrôlées en laboratoire afin d'aborder la spécificité de ces variations d'expression pour la recherche de biomarqueurs. Ceci consituerait une étape expérimentale préalable à toute application potentielle de ces biomarqueurs enzymatiques approchant les conditions d'exposition *in situ*.

Références bibliographiques

- A. Fleming, S., 1995. Chemical reagents in photoaffinity labeling. *Tetrahedron* 51, 12479–12520. [https://doi.org/10.1016/0040-4020\(95\)00598-3](https://doi.org/10.1016/0040-4020(95)00598-3)
- Abbott, B.D., Wolf, C.J., Schmid, J.E., Das, K.P., Zehr, R.D., Helfant, L., Nakayama, S., Lindstrom, A.B., Strynar, M.J., Lau, C., 2007. Perfluorooctanoic Acid Induced Developmental Toxicity in the Mouse is Dependent on Expression of Peroxisome Proliferator Activated Receptor- α . *Toxicol. Sci.* 98, 571–581. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfm110>
- Acey, R.A., Bailey, S., Healy, P., Jo, C., Unger, T.F., Hudson, R.A., 2002. A butyrylcholinesterase in the early development of the brine shrimp (*Artemia salina*) larvae: a target for phthalate ester embryotoxicity? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 299, 659–662. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)02716-X](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)02716-X)
- Adam, G.C., Burbaum, J., Kozarich, J.W., Patricelli, M.P., Cravatt, B.F., 2004. Mapping Enzyme Active Sites in Complex Proteomes. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 1363–1368. <https://doi.org/10.1021/ja038441g>
- Adam, G.C., Cravatt, B.F., Sorensen, E.J., 2001. Probing the specific reactivity of the proteome with non-directed activity-based probes 15.
- Ahad, A.M., Jensen, S.M., Jewett, J.C., 2013. A Traceless Staudinger Reagent To Deliver Diazirines. *Org. Lett.* 15, 5060–5063. <https://doi.org/10.1021/ol402404n>
- Albers, G.W., 2019. TIA Triage Trial and Evaluation of Vascular-Specific Inflammatory Biomarker Lp-PLA2 as a Stratification Tool for TIA Triage and Stroke Risk (Clinical trial registration No. NCT01423201). clinicaltrials.gov.
- Amiard, J., Amiard-Triquet, C., 2017. *Biomarqueur en écotoxicologie aquatique*, 2nd ed. Lavoisier, Paris.
- Andersen, L., Goto-Kazeto, R., Trant, J.M., Nash, J.P., Korsgaard, B., Bjerregaard, P., 2006. Short-term exposure to low concentrations of the synthetic androgen methyltestosterone affects vitellogenin and steroid levels in adult male zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat. Toxicol.* 76, 343–352. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.10.008>
- Andersson, S., Moghrabi, N., 1997. Physiology and molecular genetics of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases 5.
- Arastu-Kapur, S., Ponder, E.L., Fonović, U.P., Yeoh, S., Yuan, F., Fonović, M., Grainger, M., Phillips, C.I., Powers, J.C., Bogoy, M., 2008. Identification of proteases that regulate erythrocyte rupture by the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nat. Chem. Biol.* 4, 203–213. <https://doi.org/10.1038/nchembio.70>
- Armengaud, J., Trapp, J., Pible, O., Geffard, O., Chaumot, A., Hartmann, E.M., 2014. Non-model organisms, a species endangered by proteogenomics. *J. Proteomics* 105, 5–18. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.01.007>
- Bachovchin, D.A., Cravatt, B.F., 2012. The pharmacological landscape and therapeutic potential of serine hydrolases. *Nat. Rev. Drug Discov.* 11, 52–68. <https://doi.org/10.1038/nrd3620>
- Baggelaar, M.P., Chameau, P.J.P., Kantae, V., Hummel, J., Hsu, K.-L., Janssen, F., van der Wel, T., Soethoudt, M., Deng, H., den Dulk, H., Allarà, M., Florea, B.I., Di Marzo, V., Wadman, W.J., Kruse, C.G., Overkleeft, H.S., Hankemeier, T., Werkman, T.R., Cravatt, B.F., van der Stelt, M., 2015. Highly Selective, Reversible Inhibitor Identified by Comparative Chemoproteomics Modulates Diacylglycerol Lipase Activity in Neurons. *J. Am. Chem. Soc.* 137, 8851–8857. <https://doi.org/10.1021/jacs.5b04883>
- Baggelaar, M.P., Janssen, F.J., van Esbroeck, A.C.M., den Dulk, H., Allarà, M., Hoogendoorn, S., McGuire, R., Florea, B.I., Meeuwenoord, N., van den Elst, H., van der Marel, G.A., Brouwer, J., Di Marzo, V., Overkleeft, H.S., van der Stelt, M., 2013. Development of an Activity-Based Probe and In Silico Design Reveal Highly Selective Inhibitors for Diacylglycerol Lipase- α in Brain. *Angew. Chem. Int. Ed.* 52, 12081–12085. <https://doi.org/10.1002/anie.201306295>
- Baggelaar, M.P., Van der Stelt, M., 2017. Competitive ABPP of Serine Hydrolases: A Case Study on DAGL- α , in: Overkleeft, H.S., Florea, B.I. (Eds.), *Activity-Based Proteomics, Methods in Molecular Biology*. Springer New York, New York, NY, pp. 161–169. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6439-0_12

- Bantscheff, M., Drewes, G., 2011. Chemoproteomic approaches to drug target identification and drug profiling. *Bioorganic Med. Chem.* 20 2012 1973–1978 1973–1978.
- Barber, E.D., Astill, B.D., Moran, E.J., Schneider, B.F., Gray, T.J., Lake, B.G., Evans, J.G., 1987. Peroxisome induction studies on seven phthalate esters. *Toxicol. Ind. Health* 3, 7–24. <https://doi.org/10.1177/074823378700300203>
- Bardet, P.L., Horard, B., Robinson-Rechavi, M., Laudet, V., Vanacker, J.M., 2002. Characterization of oestrogen receptors in zebrafish (*Danio rerio*). *J. Mol. Endocrinol.* 28, 153–163. <https://doi.org/10.1677/jme.0.0280153>
- Baskin, J.M., Prescher, J.A., Laughlin, S.T., Agard, N.J., Chang, P.V., Miller, I.A., Lo, A., Codelli, J.A., Bertozzi, C.R., 2007. Copper-free click chemistry for dynamic in vivo imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 16793–16797. <https://doi.org/10.1073/pnas.0707090104>
- Bayley, H., Knowles, J.R., 1977. [8] Photoaffinity labeling, in: *Methods in Enzymology*. Elsevier, pp. 69–114. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(77\)46012-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(77)46012-9)
- Berger, J.P., Akiyama, T.E., Meinke, P.T., 2005. PPARs: therapeutic targets for metabolic disease. *Trends Pharmacol. Sci.* 26, 244–251. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2005.03.003>
- Bergman, M., United Nations Environment Programme, World Health Organization, 2013. State of the science of endocrine disrupting chemicals - 2012 an assessment of the state of the science of endocrine disruptors. WHO : UNEP, Geneva.
- Bernard, V., Girard, E., Hrabovska, A., Camp, S., Taylor, P., Plaud, B., Krejci, E., 2011. Distinct localization of Collagen Q and PRiMA forms of Acetylcholinesterase at the neuromuscular junction. *Mol. Cell. Neurosci.* 46, 272–281. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2010.09.010>
- Bertrand, C., Chatonnet, A., Takke, C., Yan, Y., Postlethwait, J., Toutant, J.-P., Cousin, X., 2001. Zebrafish Acetylcholinesterase Is Encoded by a Single Gene Localized on Linkage Group 7. *J. Biol. Chem.* 276, 464–474. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006308200>
- Bility, M.T., 2004. Activation of Mouse and Human Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs) by Phthalate Monoesters. *Toxicol. Sci.* 82, 170–182. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfh253>
- Blair, J.A., Rauh, D., Kung, C., Yun, C.-H., Fan, Q.-W., Rode, H., Zhang, C., Eck, M.J., Weiss, W.A., Shokat, K.M., 2007. Structure-guided development of affinity probes for tyrosine kinases using chemical genetics. *Nat. Chem. Biol.* 3, 229–238. <https://doi.org/10.1038/nchembio866>
- Böttcher, T., Pitscheider, M., Sieber, S.A., 2010. Natural Products and Their Biological Targets: Proteomic and Metabolomic Labeling Strategies. *Angew. Chem. Int. Ed.* 49, 2680–2698. <https://doi.org/10.1002/anie.200905352>
- Brander, S.M., 2013. Thinking Outside the Box, in: *Monitoring Water Quality*. Elsevier, pp. 103–147. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59395-5.00005-4>
- Brunner, J., Senn, H., Richards, F.M., 1980. 3-Trifluoromethyl-3-phenyldiazirine. A new carbene generating group for photolabeling reagents. *J. Biol. Chem.* 255, 3313–3318. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)85701-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)85701-0)
- Buchmueller, K.L., Hill, B.T., Platz, M.S., Weeks, K.M., 2003. RNA-tethered phenyl azide photocrosslinking via a short-lived indiscriminant electrophile. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 10850–10861. <https://doi.org/10.1021/ja035743+>
- Burton, N.R., Kim, P., Backus, K.M., 2021. Photoaffinity labelling strategies for mapping the small molecule–protein interactome. *Org. Biomol. Chem.* 19, 7792–7809. <https://doi.org/10.1039/D1OB01353J>
- Caliman, F.A., Gavrilescu, M., 2009. Pharmaceuticals, Personal Care Products and Endocrine Disrupting Agents in the Environment – A Review. *CLEAN – Soil Air Water* 37, 277–303. <https://doi.org/10.1002/clen.200900038>
- Ccancapa, A., Masiá, A., Navarro-Ortega, A., Picó, Y., Barceló, D., 2016. Pesticides in the Ebro River basin: Occurrence and risk assessment. *Environ. Pollut.* 211, 414–424. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.12.059>
- Chan, T.R., Hilgraf, R., Sharpless, K.B., Fokin, V.V., 2004. Polytriazoles as Copper(I)-Stabilizing Ligands in Catalysis. *Org. Lett.* 6, 2853–2855. <https://doi.org/10.1021/ol0493094>

- Chang, B.V., Wang, T.H., Yuan, S.Y., 2007. Biodegradation of four phthalate esters in sludge. *Chemosphere* 69, 1116–1123. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.04.011>
- Chang, C.-F., Mfuh, A., Gao, J., Wu, H.-Y., Woo, C.M., 2018. Synthesis of an electronically-tuned minimally interfering alkynyl photo-affinity label to measure small molecule–protein interactions. *Tetrahedron* 74, 3273–3277. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2018.03.024>
- Chang, J.W., Moellering, R.E., Cravatt, B.F., 2012. An Activity-Based Imaging Probe for the Integral Membrane Hydrolase KIAA1363. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 51, 966–970. <https://doi.org/10.1002/anie.201107236>
- Chen, B., Ge, S.-S., Zhao, Y.-C., Chen, C., Yang, S., 2016. Activity-based protein profiling: an efficient approach to study serine hydrolases and their inhibitors in mammals and microbes. *RSC Adv.* 6, 113327–113343. <https://doi.org/10.1039/C6RA20006K>
- Chen, G., Battaglia, E., Senay, C., Falany, C.N., Radominska-Pandya, A., 1999. Photoaffinity labeling probe for the substrate binding site of human phenol sulfotransferase (SULT1A1): 7-azido-4-methylcoumarin. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 8, 2151–2157.
- Chi, Z., Zhao, J., Li, W., Araghi, A., Tan, S., 2017a. In vitro assessment of phthalate acid esters-trypsin complex formation. *Chemosphere* 185, 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.003>
- Chi, Z., Zhao, J., Li, W., Araghi, A., Tan, S., 2017b. In vitro assessment of phthalate acid esters-trypsin complex formation. *Chemosphere* 185, 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.003>
- Chi, Z., Zhao, J., Li, W., Araghi, A., Tan, S., 2017c. In vitro assessment of phthalate acid esters-trypsin complex formation. *Chemosphere* 185, 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.003>
- Conway, L.P., Jadhav, A.M., Homan, R.A., Li, W., Rubiano, J.S., Hawkins, R., Lawrence, R.M., Parker, C.G., 2021. Evaluation of fully-functionalized diazirine tags for chemical proteomic applications. *Chem. Sci.* 12, 7839–7847. <https://doi.org/10.1039/D1SC01360B>
- Cooke, P.S., Simon, L., Denslow, N.D., 2013. Endocrine Disruptors, in: Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology. Elsevier, pp. 1123–1154. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415759-0.00037-6>
- Crago, J., Klaper, R., 2012. A mixture of an environmentally realistic concentration of a phthalate and herbicide reduces testosterone in male fathead minnow (*Pimephales promelas*) through a novel mechanism of action. *Aquat. Toxicol. Amst. Neth.* 0, 74–83. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.12.021>
- Cravatt, B.F., Wright, A.T., Kozarich, J.W., 2008. Activity-Based Protein Profiling: From Enzyme Chemistry to Proteomic Chemistry. *Annu. Rev. Biochem.* 77, 383–414. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.101304.124125>
- Cravedi, J.-P., Perdu-durand, E., 2002. The phthalate diesters DEHP and DBP do not induce lauric acid hydroxylase activity in rainbow trout. *Mar. Environ. Res.* 54, 787–791. [https://doi.org/10.1016/S0141-1136\(02\)00196-4](https://doi.org/10.1016/S0141-1136(02)00196-4)
- Cruzeiro, C., Rocha, E., Pardal, M.Â., Rocha, M.J., 2016. Environmental assessment of pesticides in the Mondego River Estuary (Portugal). *Mar. Pollut. Bull.* 103, 240–246. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.12.013>
- Dang, Z., 2016. Interpretation of fish biomarker data for identification, classification, risk assessment and testing of endocrine disrupting chemicals. *Environ. Int.* 92–93, 422–441. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.04.003>
- Dang, Z., 2014. Fish biomarkers for regulatory identification of endocrine disrupting chemicals. *Environ. Pollut.* 185, 266–270. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.11.006>
- Dang, Z., Li, K., Yin, H., Hakkert, B., Vermeire, T., 2011. Endpoint sensitivity in fish endocrine disruption assays: Regulatory implications. *Toxicol. Lett.* 202, 36–46. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.01.016>
- Danopoulos, E., Twiddy, M., Rotchell, J.M., 2020. Microplastic contamination of drinking water: A systematic review. *PLOS ONE* 15, e0236838. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236838>

- de Lima, D., Roque, G.M., de Almeida, E.A., 2013. In vitro and in vivo inhibition of acetylcholinesterase and carboxylesterase by metals in zebrafish (*Danio rerio*). *Mar. Environ. Res.*, Next Generation of Ecotoxicologists 91, 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2012.11.005>
- de Vries, R.M.J.M., Meijer, F.A., Doveston, R.G., Leijten-van de Gevel, I.A., Brunsveld, L., 2021. Cooperativity between the orthosteric and allosteric ligand binding sites of ROR γ t. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 118, e2021287118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2021287118>
- De-la-Torre, G.E., 2020. Microplastics: an emerging threat to food security and human health. *J. Food Sci. Technol.* 57, 1601–1608. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-04138-1>
- Diz, A.P., Martínez-Fernández, M., Rolán-Alvarez, E., 2012. Proteomics in evolutionary ecology: linking the genotype with the phenotype. *Mol. Ecol.* 21, 1060–1080. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05426.x>
- Dolui, A.K., Vijayakumar, A.K., Rajasekharan, R., Vijayaraj, P., 2020. Activity-based protein profiling of rice (*Oryza sativa* L.) bran serine hydrolases. *Sci. Rep.* 10, 15191. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72002-w>
- Dong, M., Zhu, L., Shao, B., Zhu, S., Wang, Jun, Xie, H., Wang, Jinhua, Wang, F., 2013. The effects of endosulfan on cytochrome P450 enzymes and glutathione S-transferases in zebrafish (*Danio rerio*) livers. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 92, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.10.019>
- Dong, X., Qiu, X., Meng, S., Xu, H., Wu, X., Yang, M., 2018. Proteomic profile and toxicity pathway analysis in zebrafish embryos exposed to bisphenol A and di-n-butyl phthalate at environmentally relevant levels. *Chemosphere* 193, 313–320. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.11.042>
- Dormán, G., Prestwich, G.D., 2000. Using photolabile ligands in drug discovery and development. *Trends Biotechnol.* 18, 64–77. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(99\)01402-X](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(99)01402-X)
- Dorman, G., Prestwich, G.D., 1994. Benzophenone Photophores in Biochemistry. *Biochemistry* 33, 5661–5673. <https://doi.org/10.1021/bi00185a001>
- Dufour, J.M., Vo, M.-N., Bhattacharya, N., Okita, J., Okita, R., Kim, K.H., 2003. Peroxisome Proliferators Disrupt Retinoic Acid Receptor Alpha Signaling in the Testis1. *Biol. Reprod.* 68, 1215–1224. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.010488>
- Edgington, L.E., Berger, A.B., Blum, G., Albrow, V.E., Paulick, M.G., Lineberry, N., Bogyo, M., 2009. Noninvasive optical imaging of apoptosis by caspase-targeted activity-based probes. *Nat. Med.* 15, 967–973. <https://doi.org/10.1038/nm.1938>
- Ekker, M., Akimenko, M.A., 1991. Embryology and genetics of the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Int J Bio Med* 7 553-560 J.
- Elahi, R., Ray, W.K., Dapper, C., Dalal, S., Helm, R.F., Klemba, M., 2019. Functional annotation of serine hydrolases in the asexual erythrocytic stage of *Plasmodium falciparum*. *Sci. Rep.* 9, 17532. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54009-0>
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
- Ema, M., Kurosaka, R., Harazono, A., Amano, H., Ogawa, Y., 1996. Phase specificity of developmental toxicity after oral administration of mono-n-butyl phthalate in rats. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 31, 170–176. <https://doi.org/10.1007/BF00212362>
- Ema, M., Miyawaki, E., Kawashima, K., 2000. Critical period for adverse effects on development of reproductive system in male offspring of rats given di-n-butyl phthalate during late pregnancy. *Toxicol. Lett.* 111, 271–278. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(99\)00192-7](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(99)00192-7)
- Embry, M.R., Belanger, S.E., Braunbeck, T.A., Galay-Burgos, M., Halder, M., Hinton, D.E., Léonard, M.A., Lillicrap, A., Norberg-King, T., Whale, G., 2010. The fish embryo toxicity test as an animal alternative method in hazard and risk assessment and scientific research. *Aquat. Toxicol.* 97, 79–87. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.12.008>
- Engelhardt, G., Wallnöfer, P.R., 1978. Metabolism of Di- and Mono-n-Butyl Phthalate by Soil Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 35, 243–246.

- Esbroeck, A.C.M. van, 2019. Activity-based protein profiling in drug-discovery. Leiden University.
- Ezanno, H., Beauchamp, E., Lemarié, F., Legrand, P., Rioux, V., 2013. L'acylation des protéines : une fonction cellulaire importante des acides gras saturés. *Nutr. Clin. Métabolisme* 27, 10–19. <https://doi.org/10.1016/j.nupar.2012.11.001>
- Falchook, G., Infante, J., Arkenau, H.-T., Patel, M.R., Dean, E., Borazanci, E., Brenner, A., Cook, N., Lopez, J., Pant, S., Frankel, A., Schmid, P., Moore, K., McCulloch, W., Grimmer, K., O'Farrell, M., Kemble, G., Burris, H., 2021. First-in-human study of the safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of first-in-class fatty acid synthase inhibitor TVB-2640 alone and with a taxane in advanced tumors. *EClinicalMedicine* 34, 100797. <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2021.100797>
- Fan, L.Q., Cattley, R.C., Corton, J.C., 1998. Tissue-specific induction of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type IV by peroxisome proliferator chemicals is dependent on the peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *J. Endocrinol.* 158, 237–246. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1580237>
- Fic, E., Kedracka-Krok, S., Jankowska, U., Pirog, A., Dziedzicka-Wasylewska, M., 2010. Comparison of protein precipitation methods for various rat brain structures prior to proteomic analysis. *ELECTROPHORESIS* 31, 3573–3579. <https://doi.org/10.1002/elps.201000197>
- Fleming, S.A., 1996. Chemical Reagents in Photoaffinity Labeling. *ChemInform* 27. <https://doi.org/10.1002/chin.199611328>
- Flood, D.E.K., Fernandino, J.I., Langlois, V.S., 2013. Thyroid hormones in male reproductive development: Evidence for direct crosstalk between the androgen and thyroid hormone axes. *Gen. Comp. Endocrinol.* 192, 2–14. <https://doi.org/10.1016/j.yggen.2013.02.038>
- Fonović, M., Bogyo, M., 2008. Activity Based Probes as a tool for Functional Proteomic Analysis of Proteases. *Expert Rev. Proteomics* 5, 721–730. <https://doi.org/10.1586/14789450.5.5.721>
- Froehlich, E., Mandeville, J.S., Jennings, C.J., Sedaghat-Herati, R., Tajmir-Riahi, H.A., 2009. Dendrimers Bind Human Serum Albumin. *J. Phys. Chem. B* 113, 6986–6993. <https://doi.org/10.1021/jp9011119>
- Fuhr, L., Franklin, M., 2020. Atlas du plastique : Faits et chiffres sur le monde des polymères synthétiques.
- Gao, D., Li, Z., Wen, Z., Ren, N., 2014. Occurrence and fate of phthalate esters in full-scale domestic wastewater treatment plants and their impact on receiving waters along the Songhua River in China. *Chemosphere* 95, 24–32. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.08.009>
- Gao, D.-W., Wen, Z.-D., 2016a. Phthalate esters in the environment: A critical review of their occurrence, biodegradation, and removal during wastewater treatment processes. *Sci. Total Environ.* 541, 986–1001. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.09.148>
- Gao, D.-W., Wen, Z.-D., 2016b. Phthalate esters in the environment: A critical review of their occurrence, biodegradation, and removal during wastewater treatment processes. *Sci. Total Environ.* 541, 986–1001. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.09.148>
- Garcia-Reyero, N., Ekman, D.R., Habib, T., Villeneuve, D.L., Collette, T.W., Bencic, D.C., Ankley, G.T., Perkins, E.J., 2014. Integrated approach to explore the mechanisms of aromatase inhibition and recovery in fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 203, 193–202. <https://doi.org/10.1016/j.yggen.2014.03.022>
- Gasperi, J., Wright, S.L., Dris, R., Collard, F., Mandin, C., Guerrouache, M., Langlois, V., Kelly, F.J., Tassin, B., 2018. Microplastics in air: Are we breathing it in? *Curr. Opin. Environ. Sci. Health* 1, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2017.10.002>
- Gayathri, N.S., Dhanya, C.R., Indu, A.R., Kurup, P.A., 2004. Changes in some hormones by low doses of di (2-ethyl hexyl) phthalate (DEHP), a commonly used plasticizer in PVC blood storage bags & medical tubing. *Indian J. Med. Res.* 119, 139–144.
- Gazouli, M., Yao, Z.-X., Boujrad, N., Corton, J.C., Culty, M., Papadopoulos, V., 2002. Effect of peroxisome proliferators on Leydig cell peripheral-type benzodiazepine receptor gene expression, hormone-stimulated cholesterol transport, and steroidogenesis: Role of the

- peroxisome proliferator-activator receptor α . *Endocrinology* 143, 2571–2583.
<https://doi.org/10.1210/endo.143.7.8895>
- Ge, Y., Wang, D.-Z., Chiu, J.-F., Cristobal, S., Sheehan, D., Silvestre, F., Peng, X., Li, H., Gong, Z., Lam, S.H., Wentao, H., Iwahashi, H., Liu, J., Mei, N., Shi, L., Bruno, M., Foth, H., Teichman, K., 2013. Environmental OMICS: Current Status and Future Directions. *J. Integr. Omics* 3, 13.
- Gersch, M., Kreuzer, J., Sieber, S.A., 2012. Electrophilic natural products and their biological targets. *Nat. Prod. Rep.* 29, 659. <https://doi.org/10.1039/c2np20012k>
- Geurink, P.P., Prely, L.M., van der Marel, G.A., Bischoff, R., Overkleeft, H.S., 2011. Photoaffinity Labeling in Activity-Based Protein Profiling, in: Sieber, S.A. (Ed.), *Activity-Based Protein Profiling, Topics in Current Chemistry*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 85–113. https://doi.org/10.1007/128_2011_286
- Ghorpade, N., Mehta, V., Khare, M., Sinkar, P., Krishnan, S., Rao, C.V., 2002. Toxicity study of diethyl phthalate on freshwater fish *Cirrhina mrigala*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 53, 255–258.
<https://doi.org/10.1006/eesa.2002.2212>
- GlaxoSmithKline, 2019. A Two Part, Multicenter Phase IIa, Placebo Controlled Study, to Examine the Safety, Tolerability, and Effects of GSK256073 on Lipids in Subjects With Dyslipidemia (Clinical trial registration No. NCT00903617). clinicaltrials.gov.
- Goldman, D.W., Pober, J.S., White, J., Bayley, H., 1979. Selective labelling of the hydrophobic segments of intrinsic membrane proteins with a lipophilic photogenerated carbene. *Nature* 280, 841–843. <https://doi.org/10.1038/280841a0>
- Gomes, A.F., Gozzo, F.C., 2010. Chemical cross-linking with a diazirine photoactivatable cross-linker investigated by MALDI- and ESI-MS/MS. *J. Mass Spectrom.* 45, 892–899.
<https://doi.org/10.1002/jms.1776>
- Grams, R.J., Hsu, K.-L., 2022. Reactive chemistry for covalent probe and therapeutic development. *Trends Pharmacol. Sci.* 43, 249–262. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2021.12.002>
- Greenbaum, D., Baruch, A., Hayrapetian, L., Darula, Z., Burlingame, A., Medzihradsky, K.F., Bogoy, M., 2002. Chemical Approaches for Functionally Probing the Proteome. *Mol. Cell. Proteomics* 1, 60–68. <https://doi.org/10.1074/mcp.T100003-MCP200>
- Groh, K.J., Suter, M.J.-F., 2015. Stressor-induced proteome alterations in zebrafish: A meta-analysis of response patterns. *Aquat. Toxicol.* 159, 1–12.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.11.013>
- Gumy, C., Chandsawangbhuwana, C., Dzykanchuk, A.A., Kratschmar, D.V., Baker, M.E., Odermatt, A., 2008. Dibutyltin Disrupts Glucocorticoid Receptor Function and Impairs Glucocorticoid-Induced Suppression of Cytokine Production. *PLoS ONE* 3, e3545.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003545>
- Hall, C.I., Reese, M.L., Weerapana, E., Child, M.A., Bowyer, P.W., Albrow, V.E., Haraldsen, J.D., Phillips, M.R., Sandoval, E.D., Ward, G.E., Cravatt, B.F., Boothroyd, J.C., Bogoy, M., 2011. Chemical genetic screen identifies *Toxoplasma* DJ-1 as a regulator of parasite secretion, attachment, and invasion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 10568–10573.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1105622108>
- Harwood, S.L., Nielsen, N.S., Jensen, K.T., Nielsen, P.K., Thøgersen, I.B., Enghild, J.J., 2020. α 2-Macroglobulin-like protein 1 can conjugate and inhibit proteases through their hydroxyl groups, because of an enhanced reactivity of its thiol ester. *J. Biol. Chem.* 295, 16732–16742.
<https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.015694>
- He, X.M., Carter, D.C., 1992. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature* 358, 209–215. <https://doi.org/10.1038/358209a0>
- Heal, W.P., Dang, T.H.T., Tate, E.W., 2011. Activity-based probes: discovering new biology and new drug targets. *Chem Soc Rev* 40, 246–257. <https://doi.org/10.1039/C0CS00004C>
- Heal, W.P., Tate, E.W., 2012. Application of Activity-Based Protein Profiling to the Study of Microbial Pathogenesis, in: Sieber, S.A. (Ed.), *Activity-Based Protein Profiling, Topics in Current Chemistry*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 115–135. https://doi.org/10.1007/128_2011_299

- Hein, J.E., Krasnova, L.B., Iwasaki, M., Fokin, V.V., 2011. Cu-catalyzed azide-alkyne cycloaddition: Preparation of tris((1-benzyl-1h-1,2,3-triazolyl)methyl)amine. *Org. Synth.* 88, 238–246. <https://doi.org/10.15227/orgsyn.088.0238>
- Hein, P., Michel, M.C., Leineweber, K., Wieland, T., Wettschureck, N., Offermanns, S., 2005. Receptor and Binding Studies, in: Dhein, S., Mohr, F.W., Delmar, M. (Eds.), *Practical Methods in Cardiovascular Research*. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, pp. 723–783. https://doi.org/10.1007/3-540-26574-0_37
- Hekmat, O., Kim, Y.-W., Williams, S.J., He, S., Withers, S.G., 2005. Active-site Peptide “Fingerprinting” of Glycosidases in Complex Mixtures by Mass Spectrometry. *J. Biol. Chem.* 280, 35126–35135. <https://doi.org/10.1074/jbc.M508434200>
- Hofmann, P.J., Schomburg, L., Köhrle, J., 2009. Interference of Endocrine Disrupters with Thyroid Hormone Receptor–Dependent Transactivation. *Toxicol. Sci.* 110, 125–137. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfp086>
- Hohl, M., Mayr, M., Lang, L., Nickel, A.G., Barallobre-Barreiro, J., Yin, X., Speer, T., Selejan, S.-R., Goettsch, C., Erb, K., Fecher-Trost, C., Reil, J.-C., Linz, B., Ruf, S., Hübschle, T., Maack, C., Böhm, M., Sadowski, T., Linz, D., 2020. Cathepsin A contributes to left ventricular remodeling by degrading extracellular superoxide dismutase in mice. *J. Biol. Chem.* 295, 12605–12617. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.013488>
- Hong, S.-K., Dawid, I.B., 2008. Alpha2 Macroglobulin-Like Is Essential for Liver Development in Zebrafish. *PLoS ONE* 3, e3736. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003736>
- Hong, V., Presolski, S.I., Ma, C., Finn, M.G., 2009. Analysis and Optimization of Copper-Catalyzed Azide–Alkyne Cycloaddition for Bioconjugation. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 48, 9879–9883. <https://doi.org/10.1002/anie.200905087>
- Howe, K., Clark, M.D., Torroja, C.F., Tarrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J.E., Humphray, S., McLaren, K., Matthews, L., McLaren, S., Sealy, I., Caccamo, M., Churcher, C., Scott, C., Barrett, J.C., Koch, R., Rauch, G.-J., White, S., Chow, W., Kilian, B., Quintais, L.T., Guerra-Assunção, J.A., Zhou, Y., Gu, Y., Yen, J., Vogel, J.-H., Eyre, T., Redmond, S., Banerjee, R., Chi, J., Fu, B., Langley, E., Maguire, S.F., Laird, G.K., Lloyd, D., Kenyon, E., Donaldson, S., Sehra, H., Almeida-King, J., Loveland, J., Trevanion, S., Jones, M., Quail, M., Willey, D., Hunt, A., Burton, J., Sims, S., McLay, K., Plumb, B., Davis, J., Clee, C., Oliver, K., Clark, R., Riddle, C., Elliott, D., Threadgold, G., Harden, G., Ware, D., Begum, S., Mortimore, B., Kerry, G., Heath, P., Phillimore, B., Tracey, A., Corby, N., Dunn, M., Johnson, C., Wood, J., Clark, S., Pelan, S., Griffiths, G., Smith, M., Glithero, R., Howden, P., Barker, N., Lloyd, C., Stevens, C., Harley, J., Holt, K., Panagiotidis, G., Lovell, J., Beasley, H., Henderson, C., Gordon, D., Auger, K., Wright, D., Collins, J., Raisen, C., Dyer, L., Leung, K., Robertson, L., Ambridge, K., Leongamornlert, D., McGuire, S., Gilderthorp, R., Griffiths, C., Manthavadi, D., Nichol, S., Barker, G., Whitehead, S., Kay, M., Brown, J., Murnane, C., Gray, E., Humphries, M., Sycamore, N., Barker, D., Saunders, D., Wallis, J., Babbage, A., Hammond, S., Mashreghi-Mohammadi, M., Barr, L., Martin, S., Wray, P., Ellington, A., Matthews, N., Ellwood, M., Woodmansey, R., Clark, G., Cooper, J.D., Tromans, A., Grafham, D., Skuce, C., Pandian, R., Andrews, R., Harrison, E., Kimberley, A., Garnett, J., Fosker, N., Hall, R., Garner, P., Kelly, D., Bird, C., Palmer, S., Gehring, I., Berger, A., Dooley, C.M., Ersan-Ürün, Z., Eser, C., Geiger, H., Geisler, M., Karotki, L., Kirn, A., Konantz, J., Konantz, M., Oberländer, M., Rudolph-Geiger, S., Teucke, M., Lanz, C., Raddatz, G., Osoegawa, K., Zhu, B., Rapp, A., Widaa, S., Langford, C., Yang, F., Schuster, S.C., Carter, N.P., Harrow, J., Ning, Z., Herrero, J., Searle, S.M.J., Enright, A., Geisler, R., Plasterk, R.H.A., Lee, C., Westerfield, M., de Jong, P.J., Zon, L.I., Postlethwait, J.H., Nüsslein-Volhard, C., Hubbard, T.J.P., Crolius, H.R., Rogers, J., Stemple, D.L., 2013. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 496, 498–503. <https://doi.org/10.1038/nature12111>
- Hung, V., Udeshi, N.D., Lam, S.S., Loh, K.H., Cox, K.J., Pedram, K., Carr, S.A., Ting, A.Y., 2016. Spatially resolved proteomic mapping in living cells with the engineered peroxidase APEX2. *Nat. Protoc.* 11, 456–475. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.018>

- Hung, V., Zou, P., Rhee, H.-W., Udeshi, N.D., Cracan, V., Svinkina, T., Carr, S.A., Mootha, V.K., Ting, A.Y., 2014. Proteomic mapping of the human mitochondrial intermembrane space in live cells via ratiometric APEX tagging. *Mol. Cell* 55, 332–341. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.06.003>
- Hurst, C.H., Waxman, D.J., 2003. Activation of PPAR and PPAR by Environmental Phthalate Monoesters. *Toxicol. Sci.* 74, 297–308. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfg145>
- Ishihara, A., Sawatsubashi, S., Yamauchi, K., 2003. Endocrine disrupting chemicals: interference of thyroid hormone binding to transthyretins and to thyroid hormone receptors. *Mol. Cell. Endocrinol.* 199, 105–117. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(02\)00302-7](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(02)00302-7)
- Iwahashi, Y., Hosoda, H., Park, J.-H., Lee, J.-H., Suzuki, Y., Kitagawa, E., Murata, S.M., Jwa, N.-S., Gu, M.-B., Iwahashi, H., 2006. Mechanisms of Patulin Toxicity under Conditions That Inhibit Yeast Growth. *J. Agric. Food Chem.* 54, 1936–1942. <https://doi.org/10.1021/jf052264g>
- Jacob, C., Battaglia, E., Burkholz, T., Peng, D., Bagrel, D., Montenarh, M., 2012. Control of Oxidative Posttranslational Cysteine Modifications: From Intricate Chemistry to Widespread Biological and Medical Applications. *Chem. Res. Toxicol.* 25, 588–604. <https://doi.org/10.1021/tx200342b>
- Jee, J.H., Koo, J.G., Keum, Y.H., Park, K.H., Choi, S.H., Kang, J.C., 2009. Effects of dibutyl phthalate and di-ethylhexyl phthalate on acetylcholinesterase activity in bagrid catfish, *Pseudobagrus fulvidraco* (Richardson). *J. Appl. Ichthyol.* 25, 771–775. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2009.01331.x>
- Jessani, N., Humphrey, M., McDonald, W.H., Niessen, S., Masuda, K., Gangadharan, B., Yates, J.R., Mueller, B.M., Cravatt, B.F., 2004. Carcinoma and stromal enzyme activity profiles associated with breast tumor growth in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 13756–13761. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404727101>
- Jessani, N., Liu, Y., Humphrey, M., Cravatt, B.F., 2002. Enzyme activity profiles of the secreted and membrane proteome that depict cancer cell invasiveness. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 10335–10340. <https://doi.org/10.1073/pnas.162187599>
- Kaneco, S., Katsumata, H., Suzuki, T., Ohta, K., 2006. Titanium dioxide mediated photocatalytic degradation of dibutyl phthalate in aqueous solution—kinetics, mineralization and reaction mechanism. *Chem. Eng. J.* 125, 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2006.08.004>
- Kasahara, E., Sato, E.F., Miyoshi, M., Konaka, R., Hiramoto, K., Sasaki, J., Tokuda, M., Nakano, Y., Inoue, M., 2002. Role of oxidative stress in germ cell apoptosis induced by di(2-ethylhexyl)phthalate. *Biochem. J.* 365, 849–856. <https://doi.org/10.1042/BJ20020254>
- Kato, D., Boatright, K.M., Berger, A.B., Nazif, T., Blum, G., Ryan, C., Chehade, K.A.H., Salvesen, G.S., Bogoy, M., 2005. Activity-based probes that target diverse cysteine protease families. *Nat. Chem. Biol.* 1, 33–38. <https://doi.org/10.1038/nchembio707>
- Khan, M.N., Renaud, R.L., Leatherland, J.F., 1997. Steroid Metabolism by Embryonic Tissues of Arctic Charr, *Salvelinus alpinus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 105, 344–357. <https://doi.org/10.1006/gcen.1996.6835>
- Kidd, D., Liu, Y., Cravatt, B.F., 2001. Profiling Serine Hydrolase Activities in Complex Proteomes. *Biochemistry* 40, 4005–4015. <https://doi.org/10.1021/bi002579j>
- Korneev, S.M., 2011. Valence Isomerization between Diazo Compounds and Diazirines. *Eur. J. Org. Chem.* 2011, 6153–6175. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201100224>
- Kotzyba-Hibert, F., Kapfer, I., Goeldner, M., 1995. Recent Trends in Photoaffinity Labeling. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 34, 1296–1312. <https://doi.org/10.1002/anie.199512961>
- Kremer, J.J., Williams, C.C., Parkinson, H.D., Borghoff, S.J., 2005. Pharmacokinetics of monobutylphthalate, the active metabolite of di-n-butylphthalate, in pregnant rats. *Toxicol. Lett.* 159, 144–153. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2005.05.006>
- Kumar, K., Mhetre, A., Ratnaparkhi, G.S., Kamat, S.S., 2021. A Superfamily-wide Activity Atlas of Serine Hydrolases in *Drosophila melanogaster*. *Biochemistry* 60, 1312–1324. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.1c00171>

- Kumar, S., Zhou, B., Liang, F., Wang, W.-Q., Huang, Z., Zhang, Z.-Y., 2004. Activity-based probes for protein tyrosine phosphatases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 7943–7948. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402323101>
- La Merrill, M.A., Vandenberg, L.N., Smith, M.T., Goodson, W., Browne, P., Patisaul, H.B., Guyton, K.Z., Kortenkamp, A., Cogliano, V.J., Woodruff, T.J., Rieswijk, L., Sone, H., Korach, K.S., Gore, A.C., Zeise, L., Zoeller, R.T., 2020. Consensus on the key characteristics of endocrine-disrupting chemicals as a basis for hazard identification. *Nat. Rev. Endocrinol.* 16, 45–57. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0273-8>
- Lampen, A., Zimnik, S., Nau, H., 2003. Teratogenic phthalate esters and metabolites activate the nuclear receptors PPARs and induce differentiation of F9 cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 188, 14–23. [https://doi.org/10.1016/S0041-008X\(03\)00014-0](https://doi.org/10.1016/S0041-008X(03)00014-0)
- Lang, X., Wang, L., Zhang, Z., 2016. Stability evaluation of reference genes for real-time PCR in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to cadmium chloride and subsequently infected by bacteria *Aeromonas hydrophila*. *Aquat. Toxicol.* 170, 240–250. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.11.029>
- Lapinskas, P.J., Brown, S., Leesnitzer, L.M., Blanchard, S., Swanson, C., Cattley, R.C., Corton, J.C., 2005. Role of PPAR α in mediating the effects of phthalates and metabolites in the liver. *Toxicology* 207, 149–163. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2004.09.008>
- Lau, T.K., Chu, W., Graham, N., 2005. The degradation of endocrine disruptor di-n-butyl phthalate by UV irradiation: a photolysis and product study. *Chemosphere* 60, 1045–1053. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.01.022>
- Law, M.Y.L., Moody, D.E., 1991. In vitro inhibition of mouse and rat glutathione S-transferases by di(2-ethylhexyl) phthalate, mono(2-ethylhexyl) phthalate, 2-ethylhexanol, 2-ethylhexanoic acid and clofibrac acid. *Toxicol. In Vitro* 5, 207–210. [https://doi.org/10.1016/0887-2333\(91\)90019-A](https://doi.org/10.1016/0887-2333(91)90019-A)
- Lee, E., Ahn, M.Y., Kim, H.J., Kim, I.Y., Han, S.Y., Kang, T.S., Hong, J.H., Park, K.L., Lee, B.M., Kim, H.S., 2007. Effect of di(n-butyl) phthalate on testicular oxidative damage and antioxidant enzymes in hyperthyroid rats. *Environ. Toxicol.* 22, 245–255. <https://doi.org/10.1002/tox.20259>
- Lee, S.S., Pineau, T., Drago, J., Lee, E.J., Owens, J.W., Kroetz, D.L., Fernandez-Salguero, P.M., Westphal, H., Gonzalez, F.J., 1995. Targeted disruption of the alpha isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators. *Mol. Cell. Biol.* 15, 3012–3022.
- Lepage, M.L., Simhadri, C., Liu, C., Takaffoli, M., Bi, L., Crawford, B., Milani, A.S., Wulff, J.E., 2019. A broadly applicable cross-linker for aliphatic polymers containing C–H bonds. *Science* 366, 875–878. <https://doi.org/10.1126/science.aay6230>
- Leslie, H.A., van Velzen, M.J.M., Brandsma, S.H., Vethaak, A.D., Garcia-Vallejo, J.J., Lamoree, M.H., 2022. Discovery and quantification of plastic particle pollution in human blood. *Environ. Int.* 107199. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107199>
- Leung, D., Hardouin, C., Boger, D.L., Cravatt, B.F., 2003. Discovering potent and selective reversible inhibitors of enzymes in complex proteomes. *Nat. Biotechnol.* 21, 687–691. <https://doi.org/10.1038/nbt826>
- Lewis, W.G., Magallon, F.G., Fokin, V.V., Finn, M.G., 2004. Discovery and Characterization of Catalysts for Azide–Alkyne Cycloaddition by Fluorescence Quenching. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 9152–9153. <https://doi.org/10.1021/ja048425z>
- Li, N., Kuo, C.-L., Paniagua, G., van den Elst, H., Verdoes, M., Willems, L.I., van der Linden, W.A., Ruben, M., van Genderen, E., Gubbens, J., van Wezel, G.P., Overkleeft, H.S., Florea, B.I., 2013. Relative quantification of proteasome activity by activity-based protein profiling and LC-MS/MS. *Nat. Protoc.* 8, 1155–1168. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.065>
- Li, W., Blankman, J.L., Cravatt, B.F., 2007. A Functional Proteomic Strategy to Discover Inhibitors for Uncharacterized Hydrolases. *J. Am. Chem. Soc.* 129, 9594–9595. <https://doi.org/10.1021/ja073650c>

- Liang, D.-W., Zhang, T., Fang, H.H.P., He, J., 2008. Phthalates biodegradation in the environment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80, 183. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1548-5>
- Lin, Q., Chen, S., Chao, Y., Huang, X., Wang, S., Qiu, R., 2017. Carboxylesterase-involved metabolism of di-n-butyl phthalate in pumpkin (*Cucurbita moschata*) seedlings. *Environ. Pollut.* 220, 421–430. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.09.084>
- Lind, P.M., Roos, V., Rönn, M., Johansson, L., Ahlström, H., Kullberg, J., Lind, L., 2012. Serum concentrations of phthalate metabolites are related to abdominal fat distribution two years later in elderly women. *Environ. Health* 11, 21. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-11-21>
- Liu, Y., Patricelli, M.P., Cravatt, B.F., 1999. Activity-based protein profiling: The serine hydrolases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 14694–14699. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.26.14694>
- Liu, Y., Shreder, K.R., Gai, W., Corral, S., Ferris, D.K., Rosenblum, J.S., 2005. Wortmannin, a Widely Used Phosphoinositide 3-Kinase Inhibitor, also Potently Inhibits Mammalian Polo-like Kinase. *Chem. Biol.* 12, 99–107. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2004.11.009>
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25, 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lyche, J.L., Gutleb, A.C., Bergman, Å., Eriksen, G.S., Murk, A.J., Ropstad, E., Saunders, M., Skaare, J.U., 2009. Reproductive and Developmental Toxicity of Phthalates. *J. Toxicol. Environ. Health Part B* 12, 225–249. <https://doi.org/10.1080/10937400903094091>
- MacKinnon, A.L., Taunton, J., 2009a. Target Identification by Diazirine Photo-Cross-Linking and Click Chemistry. *Curr. Protoc. Chem. Biol.* 1, 55–73. <https://doi.org/10.1002/9780470559277.ch090167>
- MacKinnon, A.L., Taunton, J., 2009b. Target Identification by Diazirine Photo-Cross-linking and Click Chemistry. *Curr. Protoc. Chem. Biol.* 1, 55–73. <https://doi.org/10.1002/9780470559277.ch090167>
- Mahajan, R., Verma, S., Kushwaha, M., Singh, D., Akhter, Y., Chatterjee, S., 2019. Biodegradation of di-n-butyl phthalate by psychrotolerant *Sphingobium yanoikuyae* strain P4 and protein structural analysis of carboxylesterase involved in the pathway. *Int. J. Biol. Macromol.* 122, 806–816. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.225>
- Maradonna, F., Evangelisti, M., Gioacchini, G., Migliarini, B., Olivotto, I., Carnevali, O., 2013. Assay of vtg, ERs and PPARs as endpoint for the rapid in vitro screening of the harmful effect of Di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) and phthalic acid (PA) in zebrafish primary hepatocyte cultures. *Toxicol. In Vitro* 27, 84–91. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.09.018>
- Marlatt, V.L., Martyniuk, C.J., Zhang, D., Xiong, H., Watt, J., Xia, X., Moon, T., Trudeau, V.L., 2008. Auto-regulation of estrogen receptor subtypes and gene expression profiling of 17 β -estradiol action in the neuroendocrine axis of male goldfish. *Mol. Cell. Endocrinol.* 283, 38–48. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2007.10.013>
- Mathieu-Denoncourt, J., Wallace, S.J., de Solla, S.R., Langlois, V.S., 2015. Plasticizer endocrine disruption: Highlighting developmental and reproductive effects in mammals and non-mammalian aquatic species. *Gen. Comp. Endocrinol.* 219, 74–88. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.11.003>
- Medina-Cleghorn, D., Bateman, L.A., Ford, B., Heslin, A., Fisher, K.J., Dalvie, E.D., Nomura, D.K., 2015. Mapping Proteome-Wide Targets of Environmental Chemicals Using Reactivity-Based Chemoproteomic Platforms. *Chem. Biol.* 22, 1394–1405. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2015.09.008>
- Merdanovic, M., Burston, S.G., Schmitz, A.L., Köcher, S., Knapp, S., Clausen, T., Kaiser, M., Huber, R., Ehrmann, M., 2020. Activation by substoichiometric inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 117, 1414–1418. <https://doi.org/10.1073/pnas.1918721117>
- Mettang, T., Pauli-Magnus, C., Alscher, D.M., Kirchgessner, J., Wodarz, R., Rettenmeier, A.W., Kuhlmann, U., 2000. Influence of plasticizer-free CAPD bags and tubings on serum, urine, and dialysate levels of phthalic acid esters in CAPD patients. *Perit. Dial. Int. J. Int. Soc. Perit. Dial.* 20, 80–84.

- Meyer, A., Biermann, C.H., Orti, G., 1993. The Phylogenetic Position of the Zebrafish (*Danio rerio*), a Model System in Developmental Biology: An Invitation to the Comparative Method. *Proc R Soc Lond B* 1993 252 231-236 231–236.
- Miller, I., Serchi, T., Murk, A.J., Gutleb, A.C., 2014. The Added Value of Proteomics for Toxicological Studies. *J. Toxicol. Environ. Health Part B* 17, 225–246. <https://doi.org/10.1080/10937404.2014.904730>
- Mindnich, R., Möller, G., Adamski, J., 2004. The role of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases. *Mol. Cell. Endocrinol.* 218, 7–20. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2003.12.006>
- Modèles QSAR - ECHA [WWW Document], n.d. URL <https://echa.europa.eu/fr/support/registration/how-to-avoid-unnecessary-testing-on-animals/qsar-models> (accessed 2.25.22).
- Monsees, T.K., Schill, W.B., Miska, W., 1997. Protease-protease inhibitor interactions in Sertoli cell-germ cell crosstalk. *Adv. Exp. Med. Biol.* 424, 111–123. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5913-9_20
- Morais, S., Knoll-Gellida, A., André, M., Barthe, C., Babin, P.J., 2007. Conserved expression of alternative splicing variants of peroxisomal *acyl-CoA oxidase 1* in vertebrates and developmental and nutritional regulation in fish. *Physiol. Genomics* 28, 239–252. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00136.2006>
- Mu, X., Huang, Y., Li, J., Yang, K., Yang, W., Shen, G., Li, Xuxing, Lei, Y., Pang, S., Wang, C., Li, Xuefeng, Li, Y., 2018. New insights into the mechanism of phthalate-induced developmental effects. *Environ. Pollut.* 241, 674–683. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.05.095>
- Murale, D.P., Hong, S.C., Haque, Md.M., Lee, J.-S., 2016. Photo-affinity labeling (PAL) in chemical proteomics: a handy tool to investigate protein-protein interactions (PPIs). *Proteome Sci.* 15, 14. <https://doi.org/10.1186/s12953-017-0123-3>
- Mylchreest, E., 2000. Dose-Dependent Alterations in Androgen-Regulated Male Reproductive Development in Rats Exposed to Di(n-butyl) Phthalate during Late Gestation. *Toxicol. Sci.* 55, 143–151. <https://doi.org/10.1093/toxsci/55.1.143>
- Mylchreest, E., Sar, M., Cattley, R.C., Foster, P.M.D., 1999. Disruption of Androgen-Regulated Male Reproductive Development by Di(n-Butyl) Phthalate during Late Gestation in Rats Is Different from Flutamide. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 156, 81–95. <https://doi.org/10.1006/taap.1999.8643>
- Nelson, E.R., Habibi, H.R., 2010. Functional Significance of Nuclear Estrogen Receptor Subtypes in the Liver of Goldfish. *Endocrinology* 151, 1668–1676. <https://doi.org/10.1210/en.2009-1447>
- Net, S., Delmont, A., Sempéré, R., Paluselli, A., Ouddane, B., 2015a. Reliable quantification of phthalates in environmental matrices (air, water, sludge, sediment and soil): A review. *Sci. Total Environ.* 515–516, 162–180. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.02.013>
- Net, S., Sempéré, R., Delmont, A., Paluselli, A., Ouddane, B., 2015b. Occurrence, fate, behavior and ecotoxicological state of phthalates in different environmental matrices. *Environ. Sci. Technol.* 49, 4019–4035. <https://doi.org/10.1021/es505233b>
- Net, S., Sempéré, R., Delmont, A., Paluselli, A., Ouddane, B., 2015c. Occurrence, Fate, Behavior and Ecotoxicological State of Phthalates in Different Environmental Matrices. *Environ. Sci. Technol.* 49, 4019–4035. <https://doi.org/10.1021/es505233b>
- Netzeva, T., Worth, A., 2007. Classification of Phthalates According to Their (Q) SAR Predicted Acute Toxicity to Fish: A Case Study.
- Ning, X., Guo, J., Wolfert, M.A., Boons, G.-J., 2008. Visualizing Metabolically-Labeled Glycoconjugates of Living Cells by Copper-Free and Fast Huisgen Cycloadditions. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 47, 2253–2255. <https://doi.org/10.1002/anie.200705456>
- Niphakis, M.J., Cravatt, B.F., 2014. Enzyme Inhibitor Discovery by Activity-Based Protein Profiling. *Annu. Rev. Biochem.* 83, 341–377. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060713-035708>
- Nistala, R., Habibi, J., Lastra, G., Manrique, C., Aroor, A.R., Hayden, M.R., Garro, M., Meuth, A., Johnson, M., Whaley-Connell, A., Sowers, J.R., 2014. Prevention of Obesity-Induced Renal

- Injury in Male Mice by DPP4 Inhibition. *Endocrinology* 155, 2266–2276.
<https://doi.org/10.1210/en.2013-1920>
- Nomura, D.K., Dix, M.M., Cravatt, B.F., 2010a. Activity-based protein profiling for biochemical pathway discovery in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 10, 630–638. <https://doi.org/10.1038/nrc2901>
- Nomura, D.K., Long, J.Z., Niessen, S., Hoover, H.S., Ng, S.-W., Cravatt, B.F., 2010b. Monoacylglycerol lipase regulates a fatty acid network that promotes cancer pathogenesis. *Cell* 140, 49–61.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.027>
- O'Brien, J.G.K., Jemas, A., Asare-Okai, P.N., am Ende, C.W., Fox, J.M., 2020. Probing the Mechanism of Photoaffinity Labeling by Dialkyldiazirines through Bioorthogonal Capture of Diazoalkanes. *Org. Lett.* 22, 9415–9420. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.0c02714>
- Onorato, T.M., Brown, P.W., Morris, P.L., 2008. Mono-(2-ethylhexyl) phthalate increases spermatocyte mitochondrial peroxiredoxin 3 and cyclooxygenase 2. *J. Androl.* 29, 293–303.
<https://doi.org/10.2164/jandrol.107.003335>
- Örn, S., Yamani, S., Norrgren, L., 2006. Comparison of Vitellogenin Induction, Sex Ratio, and Gonad Morphology Between Zebrafish and Japanese Medaka After Exposure to 17 α -Ethinylestradiol and 17 β -Trenbolone. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 51, 237–243.
<https://doi.org/10.1007/s00244-005-0103-y>
- Ortega, C., Anderson, L.N., Frando, A., Sadler, N.C., Brown, R.W., Smith, R.D., Wright, A.T., Grundner, C., 2016. Systematic Survey of Serine Hydrolase Activity in *Mycobacterium tuberculosis* Defines Changes Associated with Persistence. *Cell Chem. Biol.* 23, 290–298.
<https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2016.01.003>
- Ortiz-Zarragoitia, M., Cajaraville, M.P., 2005. Effects of selected xenoestrogens on liver peroxisomes, vitellogenin levels and spermatogenic cell proliferation in male zebrafish. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 141, 133–144. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2005.05.010>
- Ortiz-Zarragoitia, M., Trant, J.M., Cajaraville, M.P., 2006. Effects of dibutylphthalate and ethinylestradiol on liver peroxisomes, reproduction, and development of zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 2394.
- Otlewski, J., Jelen, F., Zakrzewska, M., Oleksy, A., 2005. The many faces of protease–protein inhibitor interaction. *EMBO J.* 24, 1303–1310. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600611>
- Otte, J.C., Schultz, B., Fruth, D., Fabian, E., van Ravenzwaay, B., Hidding, B., Salinas, E.R., 2017. Intrinsic xenobiotic metabolizing enzyme activities in early life stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 159, 86–93. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfx116>
- Papadakis, E.-N., Tsaboula, A., Vryzas, Z., Kotopoulou, A., Kintzikoglou, K., Papadopoulou-Mourkidou, E., 2018. Pesticides in the rivers and streams of two river basins in northern Greece. *Sci. Total Environ.* 624, 732–743. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.12.074>
- Park, J., Koh, M., Koo, J.Y., Lee, S., Park, S.B., 2016. Investigation of Specific Binding Proteins to Photoaffinity Linkers for Efficient Deconvolution of Target Protein. *ACS Chem. Biol.* 11, 44–52. <https://doi.org/10.1021/acschembio.5b00671>
- Park, J.D., Habeebu, S.S.M., Klaassen, C.D., 2002. Testicular toxicity of di-(2-ethylhexyl)phthalate in young Sprague–Dawley rats. *Toxicology* 171, 105–115. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(01\)00567-4](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(01)00567-4)
- Parker, C.G., Kuttruff, C.A., Galmozzi, A., Jørgensen, L., Yeh, C.-H., Hermanson, D.J., Wang, Y., Artola, M., McKerrall, S.J., Joslyn, C.M., Nørremark, B., Dünstl, G., Felding, J., Saez, E., Baran, P.S., Cravatt, B.F., 2017. Chemical Proteomics Identifies SLC25A20 as a Functional Target of the Ingenol Class of Actinic Keratosis Drugs. *ACS Cent. Sci.* 3, 1276–1285.
<https://doi.org/10.1021/acscentsci.7b00420>
- Parkerton, T.F., Konkel, W.J., 2000. Application of Quantitative Structure–Activity Relationships for Assessing the Aquatic Toxicity of Phthalate Esters. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 45, 61–78.
<https://doi.org/10.1006/eesa.1999.1841>
- Patel, A.B., Srivastava, S., Phadke, R.S., 1999. Interaction of 7-Hydroxy-8-(phenylazo)1,3-naphthalenedisulfonate with Bovine Plasma Albumin. *J. Biol. Chem.* 274, 21755–21762.
<https://doi.org/10.1074/jbc.274.31.21755>

- Patricelli, M.P., Szardenings, A.K., Liyanage, M., Nomanbhoy, T.K., Wu, M., Weissig, H., Aban, A., Chun, D., Tanner, S., Kozarich, J.W., 2007. Functional Interrogation of the Kinome Using Nucleotide Acyl Phosphates. *Biochemistry* 46, 350–358. <https://doi.org/10.1021/bi062142x>
- Patterson, D.M., Nazarova, L.A., Prescher, J.A., 2014. Finding the Right (Bioorthogonal) Chemistry. *ACS Chem. Biol.* 9, 592–605. <https://doi.org/10.1021/cb400828a>
- Patton, E.E., Zon, L.I., Langenau, D.M., 2021. Zebrafish disease models in drug discovery: from preclinical modelling to clinical trials. *Nat. Rev. Drug Discov.* 20, 611–628. <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00210-8>
- Peijnenburg, W J G M, 2008. Phthalates, *Ecotoxicology*, Elsevier B.V. ed.
- Peijnenburg, W. J. G. M., 2008a. Phthalates, in: Jørgensen, S.E., Fath, B.D. (Eds.), *Encyclopedia of Ecology*. Academic Press, Oxford, pp. 2733–2738. <https://doi.org/10.1016/B978-008045405-4.00419-5>
- Peijnenburg, W. J. G. M., 2008b. Phthalates, in: Jørgensen, S.E., Fath, B.D. (Eds.), *Encyclopedia of Ecology*. Academic Press, Oxford, pp. 2733–2738. <https://doi.org/10.1016/B978-008045405-4.00419-5>
- Phuong, N.N., Fauvelle, V., Grenz, C., Ourgaud, M., Schmidt, N., Strady, E., Sempéré, R., 2021. Highlights from a review of microplastics in marine sediments. *Sci. Total Environ.* 777, 146225. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146225>
- Piñeiro-Sánchez, M.L., Goldstein, L.A., Dodt, J., Howard, L., Yeh, Y., Chen, W.-T., 1997. Identification of the 170-kDa Melanoma Membrane-bound Gelatinase (Seprase) as a Serine Integral Membrane Protease*. *J. Biol. Chem.* 272, 7595–7601. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.12.7595>
- Poloukhine, A.A., Mbu, N.E., Wolfert, M.A., Boons, G.-J., Popik, V.V., 2009. Selective Labeling of Living Cells by a Photo-Triggered Click Reaction. *J. Am. Chem. Soc.* 131, 15769–15776. <https://doi.org/10.1021/ja9054096>
- Porcher, J.-M., Delahaye, C., Hervin, D., Brion, F., Poulsen, V., 2003. Caractérisation du développement embryo-larvaire chez le poisson zèbre (*Danio rerio*) et comparaison des tests de toxicité aiguë sur les stades embryo-larvaire et adulte. Rapport technique INERIS 22.
- Presolski, S., Hong, V., Finn, M.G., 2011. Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Click Chemistry for Bioconjugation. *Curr. Protoc. Chem. Biol.* 3, 153–162. <https://doi.org/10.1002/9780470559277.ch110148>
- Qiao, Q., Liu, W., Wu, K., Song, T., Hu, J., Huang, X., Wen, J., Chen, L., Zhang, X., 2013. Female zebrafish (*Danio rerio*) are more vulnerable than males to microcystin-LR exposure, without exhibiting estrogenic effects. *Aquat. Toxicol.* 142–143, 272–282. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.07.002>
- Rees, B.B., Andacht, T., Skripnikova, E., Crawford, D.L., 2011. Population Proteomics: Quantitative Variation Within and Among Populations in Cardiac Protein Expression. *Mol. Biol. Evol.* 28, 1271–1279. <https://doi.org/10.1093/molbev/msq314>
- Reich, M., Spindler, K.-D., Burret, M., Kalbacher, H., Boehm, B.O., Burster, T., 2010. Cathepsin A is expressed in primary human antigen-presenting cells. *Immunol. Lett.* 128, 143–147. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2009.11.010>
- Röhrborn, D., Wronkowitz, N., Eckel, J., 2015. DPP4 in Diabetes. *Front. Immunol.* 6.
- Roslev, P., Vorkamp, K., Aarup, J., Frederiksen, K., Nielsen, P.H., 2007. Degradation of phthalate esters in an activated sludge wastewater treatment plant. *Water Res.* 41, 969–976. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.11.049>
- Rostovtsev, V.V., Green, L.G., Fokin, V.V., Sharpless, K.B., 2002. A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective “Ligation” of Azides and Terminal Alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed.* 41, 2596–2599. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20020715\)41:14<2596::AID-ANIE2596>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20020715)41:14<2596::AID-ANIE2596>3.0.CO;2-4)
- Rotundo, R.L., Fambrough, D.M., 1980. Secretion of acetylcholinesterase: relation to acetylcholine receptor metabolism. *Cell* 22, 595–602. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(80\)90369-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(80)90369-4)

- Roy, A.S., Tripathy, D.R., Chatterjee, A., Dasgupta, S., 2010. A spectroscopic study of the interaction of the antioxidant naringin with bovine serum albumin. *J. Biophys. Chem.* 01, 141–152. <https://doi.org/10.4236/jbpc.2010.13017>
- Sabo-Attwood, T., Blum, J.L., Kroll, K.J., Patel, V., Birkholz, D., Szabo, N.J., Fisher, S.Z., McKenna, R., Campbell-Thompson, M., Denslow, N.D., 2007. Distinct expression and activity profiles of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) estrogen receptors in response to estradiol and nonylphenol. *J. Mol. Endocrinol.* 39, 223–237. <https://doi.org/10.1677/JME-07-0038>
- Sadakane, Y., Hatanaka, Y., 2006. Photochemical Fishing Approaches for Identifying Target Proteins and Elucidating the Structure of a Ligand-binding Region Using Carbene-generating Photoreactive Probes. *Anal. Sci.* 22, 209–218. <https://doi.org/10.2116/analsci.22.209>
- Salisbury, C.M., Cravatt, B.F., 2008. Optimization of Activity-Based Probes for Proteomic Profiling of Histone Deacetylase Complexes. *J. Am. Chem. Soc.* 130, 2184–2194. <https://doi.org/10.1021/ja074138u>
- Salisbury, C.M., Cravatt, B.F., 2007. Activity-based probes for proteomic profiling of histone deacetylase complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 1171–1176. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608659104>
- Saxon, E., 2000. Cell Surface Engineering by a Modified Staudinger Reaction. *Science* 287, 2007–2010. <https://doi.org/10.1126/science.287.5460.2007>
- Schiller, V., Wichmann, A., Kriehuber, R., Schäfers, C., Fischer, R., Fenske, M., 2013. Transcriptome alterations in zebrafish embryos after exposure to environmental estrogens and anti-androgens can reveal endocrine disruption. *Reprod. Toxicol.* 42, 210–223. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2013.09.003>
- Schmidt, J.-S., Schaedlich, K., Fiandanese, N., Pocar, P., Fischer, B., 2012. Effects of Di(2-ethylhexyl) Phthalate (DEHP) on Female Fertility and Adipogenesis in C3H/N Mice. *Environ. Health Perspect.* 120, 1123–1129. <https://doi.org/10.1289/ehp.1104016>
- Schreiner, V.C., Szöcs, E., Bhowmik, A.K., Vijver, M.G., Schäfer, R.B., 2016. Pesticide mixtures in streams of several European countries and the USA. *Sci. Total Environ.* 573, 680–689. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.08.163>
- Segner, H., 2009. Zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism for investigating endocrine disruption. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 149, 187–195. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.10.099>
- Shen, O., Wu, W., Du, G., Liu, R., Yu, L., Sun, H., Han, X., Jiang, Y., Shi, W., Hu, W., Song, L., Xia, Y., Wang, S., Wang, X., 2011. Thyroid disruption by di-n-butyl phthalate (DBP) and mono-n-butyl phthalate (MBP) in *Xenopus laevis*. *PLoS ONE* 6, e19159. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019159>
- Shibko, S., Pangborn, J., Tappel, A.L., 1965. STUDIES ON THE RELEASE OF LYSOSOMAL ENZYMES FROM KIDNEY LYSOSOMES. *J. Cell Biol.* 25, 479–483.
- Shiu, H.-Y., Chan, T.-C., Ho, C.-M., Liu, Y., Wong, M.-K., Che, C.-M., 2009. Electron-Deficient Alkynes as Cleavable Reagents for the Modification of Cysteine-Containing Peptides in Aqueous Medium. *Chem. – Eur. J.* 15, 3839–3850. <https://doi.org/10.1002/chem.200800669>
- Shultz, V.D., 2001. Altered Gene Profiles in Fetal Rat Testes after in Utero Exposure to Di(n-butyl) Phthalate. *Toxicol. Sci.* 64, 233–242. <https://doi.org/10.1093/toxsci/64.2.233>
- Sieber, S.A., Niessen, S., Hoover, H.S., Cravatt, B.F., 2006. Proteomic profiling of metalloprotease activities with cocktails of active-site probes. *Nat. Chem. Biol.* 2, 274–281. <https://doi.org/10.1038/nchembio781>
- Simmons, D.B.D., Benskin, J.P., Cosgrove, J.R., Duncker, B.P., Ekman, D.R., Martyniuk, C.J., Sherry, J.P., 2015. Omics for aquatic ecotoxicology: Control of extraneous variability to enhance the analysis of environmental effects: Variability of omics data in aquatic ecotoxicology. *Environ. Toxicol. Chem.* 34, 1693–1704. <https://doi.org/10.1002/etc.3002>
- Singh, A., Thornton, E.R., Westheimer, F.H., 1962. The Photolysis of Diazoacetylchymotrypsin. *J. Biol. Chem.* 237, PC3006–PC3008. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)60265-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)60265-0)

- Smith, E., Collins, I., 2015. Photoaffinity labeling in target- and binding-site identification. *Future Med. Chem.* 7, 159–183. <https://doi.org/10.4155/fmc.14.152>
- Smith, R.A.G., Knowles, J.R., 1974. The utility of photo-affinity labels as ‘mapping’ reagents. A study of sub-populations of a specific rabbit antibody by using structurally related photo-affinity reagents. *Biochem. J.* 141, 51–56. <https://doi.org/10.1042/bj1410051>
- Speers, A.E., Adam, G.C., Cravatt, B.F., 2003a. Activity-Based Protein Profiling in Vivo Using a Copper(I)-Catalyzed Azide-Alkyne [3 + 2] Cycloaddition. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 4686–4687. <https://doi.org/10.1021/ja034490h>
- Speers, A.E., Adam, G.C., Cravatt, B.F., 2003b. Activity-Based Protein Profiling in Vivo Using a Copper(I)-Catalyzed Azide-Alkyne [3 + 2] Cycloaddition. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 4686–4687. <https://doi.org/10.1021/ja034490h>
- Speers, A.E., Cravatt, B.F., 2009. Activity-Based Protein Profiling (ABPP) and Click Chemistry (CC)–ABPP by MudPIT Mass Spectrometry. *Curr. Protoc. Chem. Biol.* 1, 29–41. <https://doi.org/10.1002/9780470559277.ch090138>
- Speers, A.E., Cravatt, B.F., 2004. Profiling enzyme activities in vivo using click chemistry methods. *Chem. Biol.* 11, 535–546. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2004.03.012>
- Stanley, M.K., Robillard, K.A., Staples, C.A., 2003. The handbook of environmental chemistry: phthalate esters,.
- Staples, C.A., Guinn, R., Kramarz, K., Lampi, M., 2011. Assessing the Chronic Aquatic Toxicity of Phthalate Ester Plasticizers. *Hum. Ecol. Risk Assess. Int. J.* 17, 1057–1076. <https://doi.org/10.1080/10807039.2011.605668>
- Sugiyama, S., Shimada, N., Miyoshi, H., Yamauchi, K., 2005. Detection of Thyroid System–Disrupting Chemicals Using in Vitro and in Vivo Screening Assays in *Xenopus laevis*. *Toxicol. Sci.* 88, 367–374. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfi330>
- Szegletes, T., Bálint, T., Szegletes, Z., Nemcsók, J., 1995. In vivo effects of deltamethrin exposure on activity and distribution of molecular forms of carp AChE. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 31, 258–263. <https://doi.org/10.1006/eesa.1995.1072>
- Szklarczyk, D., Franceschini, A., Wyder, S., Forslund, K., Heller, D., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Roth, A., Santos, A., Tsafou, K.P., Kuhn, M., Bork, P., Jensen, L.J., von Mering, C., 2015. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res.* 43, D447–452. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1003>
- Tachrim, Z.P., Wang, L., Murai, Y., Hashimoto, M., 2021. New Trends in Diaziridine Formation and Transformation (a Review). *Molecules* 26, 4496. <https://doi.org/10.3390/molecules26154496>
- Tan, K.S., Zhang, Y., Liu, L., Li, S., Zou, X., Zeng, W., Cheng, G., Wang, D., Tan, W., 2021. Molecular cloning and characterization of an atypical butyrylcholinesterase-like protein in zebrafish. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 255, 110590. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2021.110590>
- Terrabuio, L.A., Haiduke, R.L.A., Matta, C.F., 2016. Difluorodiazirine (CF₂N₂): A comparative quantum mechanical study of the first triplet and first singlet excited states. *Chem. Phys. Lett.* 655–656, 96–102. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2016.05.032>
- Tierbach, A., Groh, K.J., Schönenberger, R., Schirmer, K., Suter, M.J.-F., 2018. Glutathione S-transferase protein expression in different life stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicol. Sci.* 162, 702–712. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfx293>
- Tornøe, C.W., Christensen, C., Meldal, M., 2002. Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. *J. Org. Chem.* 67, 3057–3064. <https://doi.org/10.1021/jo011148j>
- Truong, L., Reif, D.M., St Mary, L., Geier, M.C., Truong, H.D., Tanguay, R.L., 2014. Multidimensional In Vivo Hazard Assessment Using Zebrafish. *Toxicol. Sci.* 137, 212–233. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kft235>
- Uren-Webster, T.M., Lewis, C., Filby, A.L., Paull, G.C., Santos, E.M., 2010a. Mechanisms of toxicity of di(2-ethylhexyl) phthalate on the reproductive health of male zebrafish. *Aquat. Toxicol.* 99, 360–369. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.05.015>

- Uren-Webster, T.M., Lewis, C., Filby, A.L., Paull, G.C., Santos, E.M., 2010b. Mechanisms of toxicity of di(2-ethylhexyl) phthalate on the reproductive health of male zebrafish. *Aquat. Toxicol.* 99, 360–369. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.05.015>
- US EPA, O., 2015. Download EPI Suite™ - Estimation Program Interface v4.11 [WWW Document]. URL <https://www.epa.gov/tsca-screening-tools/download-epi-suitetm-estimation-program-interface-v411> (accessed 2.25.22).
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M., 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 64, 178–189. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.03.013>
- Van den Belt, K., Verheyen, R., Witters, H., 2003. Comparison of vitellogenin responses in zebrafish and rainbow trout following exposure to environmental estrogens. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 56, 271–281. [https://doi.org/10.1016/S0147-6513\(03\)00004-6](https://doi.org/10.1016/S0147-6513(03)00004-6)
- van Geel, R., Pruijn, G.J.M., van Delft, F.L., Boelens, W.C., 2012. Preventing Thiol-Yne Addition Improves the Specificity of Strain-Promoted Azide–Alkyne Cycloaddition. *Bioconjug. Chem.* 23, 392–398. <https://doi.org/10.1021/bc200365k>
- Veale, C.G.L., 2021. Into the Fray! A Beginner’s Guide to Medicinal Chemistry. *ChemMedChem* 16, 1199–1225. <https://doi.org/10.1002/cmdc.202000929>
- Velki, M., Meyer-Alert, H., Seiler, T.-B., Hollert, H., 2017. Enzymatic activity and gene expression changes in zebrafish embryos and larvae exposed to pesticides diazinon and diuron. *Aquat. Toxicol.* 193, 187–200. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.10.019>
- Vocadlo, D.J., Bertozzi, C.R., 2004. A Strategy for Functional Proteomic Analysis of Glycosidase Activity from Cell Lysates. *Angew. Chem. Int. Ed.* 43, 5338–5342. <https://doi.org/10.1002/anie.200454235>
- Vodovozova, E.L., 2007. Photoaffinity labeling and its application in structural biology. *Biochem. Mosc.* 72, 1–20. <https://doi.org/10.1134/S0006297907010014>
- Voelker, D., Stetefeld, N., Schirmer, K., Scholz, S., 2008. The role of cyp1a and heme oxygenase 1 gene expression for the toxicity of 3,4-dichloroaniline in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Aquat. Toxicol.* 86, 112–120. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.10.007>
- Wang, D., Zou, L., Jin, Q., Hou, J., Ge, G., Yang, L., 2018. Human carboxylesterases: a comprehensive review. *Acta Pharm. Sin. B* 8, 699–712. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2018.05.005>
- Wang, L., Dong, J., Li, R., Zhao, P., Kong, J., Li, L., 2020. Elucidation of binding mechanism of dibutyl phthalate on bovine serum albumin by spectroscopic analysis and molecular docking method. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 230, 118044. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.118044>
- Wang, Q., Chan, T.R., Hilgraf, R., Fokin, V.V., Sharpless, K.B., Finn, M.G., 2003. Bioconjugation by Copper(I)-Catalyzed Azide-Alkyne [3 + 2] Cycloaddition. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 3192–3193. <https://doi.org/10.1021/ja021381e>
- Weerapana, E., Simon, G.M., Cravatt, B.F., 2008. Disparate proteome reactivity profiles of carbon electrophiles. *Nat. Chem. Biol.* 4, 405–407. <https://doi.org/10.1038/nchembio.91>
- Wei, H., Xu, Y., Wang, Y., Xu, L., Mo, C., Li, L., Shen, B., Sun, Y., Cheng, P., Yang, L., Pang, Y., Qin, A., Cao, Y., Morrison, S.J., Yue, R., 2020. Identification of Fibroblast Activation Protein as an Osteogenic Suppressor and Anti-osteoporosis Drug Target. *Cell Rep.* 33, 108252. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108252>
- Weiss, F.U., Budde, C., Lerch, M.M., 2016. Specificity of a Polyclonal Fecal Elastase ELISA for CELA3. *PLOS ONE* 11, e0159363. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159363>
- Wenzel, A., Franz, C., Breous, E., Loos, U., 2005. Modulation of iodide uptake by dialkyl phthalate plasticisers in FRTL-5 rat thyroid follicular cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 244, 63–71. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2005.02.008>
- West, A.V., Muncipinto, G., Wu, H.-Y., Huang, A.C., Labenski, M.T., Jones, L.H., Woo, C.M., 2021. Labeling Preferences of Diazirines with Protein Biomolecules. *J. Am. Chem. Soc.* 143, 6691–6700. <https://doi.org/10.1021/jacs.1c02509>

- Wójtowicz, A.K., Szychowski, K.A., Wnuk, A., Kajta, M., 2017. Dibutyl phthalate (DBP)-induced apoptosis and neurotoxicity are mediated via the aryl hydrocarbon receptor (AhR) but not by estrogen receptor alpha (ER α), estrogen receptor beta (ER β), or peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) in mouse cortical neurons. *Neurotox. Res.* 31, 77–89. <https://doi.org/10.1007/s12640-016-9665-x>
- Wolpert, L., Tickle, C., Arias, A.M., 2015. *Principles of Development*. Oxford University Press.
- Wright, M.H., Sieber, S.A., 2016. Chemical proteomics approaches for identifying the cellular targets of natural products. *Nat. Prod. Rep.* 33, 681–708. <https://doi.org/10.1039/C6NP00001K>
- Wu, T., Wu, Q., Guan, S., Su, H., Cai, Z., 2007. Binding of the Environmental Pollutant Naphthol to Bovine Serum Albumin. *Biomacromolecules* 8, 1899–1906. <https://doi.org/10.1021/bm061189v>
- Xie, H.Q., Ma, Y., Fu, H., Xu, T., Luo, Y., Liu, Y., Chen, Y., Xu, L., Xia, Y., Zhao, B., 2021. New perspective on the regulation of acetylcholinesterase via the aryl hydrocarbon receptor. *J. Neurochem.* 158, 1254–1262. <https://doi.org/10.1111/jnc.15261>
- Xie, X., Wang, Z., Zhou, X., Wang, X., Chen, X., 2011. Study on the interaction of phthalate esters to human serum albumin by steady-state and time-resolved fluorescence and circular dichroism spectroscopy. *J. Hazard. Mater.* 192, 1291–1298. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.06.038>
- Xie, Y., Yang, Q., DePIERRE, J.W., 2002. The Effects of Peroxisome Proliferators on Global Lipid Homeostasis and the Possible Significance of These Effects to Other Responses to These Xenobiotics. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 973, 17–25. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb04600.x>
- Xu, C., Wang, J., Liu, W., Sheng, G.D., Tu, Y., Ma, Y., 2008. Separation and aquatic toxicity of enantiomers of the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 174–181. <https://doi.org/10.1897/07-134.1>
- Xu, Hai, Dong, X., Zhang, Z., Yang, M., Wu, X., Liu, H., Lao, Q., Li, C., 2015. Assessment of immunotoxicity of dibutyl phthalate using live zebrafish embryos. *Fish Shellfish Immunol.* 45, 286–292. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.04.033>
- Xu, Hao, Majmudar, J.D., Davda, D., Ghanakota, P., Kim, K.H., Carlson, H.A., Showalter, H.D., Martin, B.R., Amidon, G.L., 2015. Substrate-Competitive Activity-Based Profiling of Ester Prodrug Activating Enzymes. *Mol. Pharm.* 12, 3399–3407. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.5b00414>
- Xu, H., Shao, X., Zhang, Z., Zou, Y., Chen, Y., Han, S., Wang, S., Wu, X., Yang, L., Chen, Z., 2013a. Effects of Di-n-butyl Phthalate and Diethyl Phthalate on Acetylcholinesterase Activity and Neurotoxicity Related Gene Expression in Embryonic Zebrafish. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 91, 635–639. <https://doi.org/10.1007/s00128-013-1101-9>
- Xu, H., Shao, X., Zhang, Z., Zou, Y., Chen, Y., Han, S., Wang, S., Wu, X., Yang, L., Chen, Z., 2013b. Effects of di-n-butyl phthalate and diethyl phthalate on acetylcholinesterase activity and neurotoxicity related gene expression in embryonic zebrafish. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 91, 635–639. <https://doi.org/10.1007/s00128-013-1101-9>
- Xu, H., Shao, X., Zhang, Z., Zou, Y., Wu, X., Yang, L., 2013c. Oxidative stress and immune related gene expression following exposure to di-n-butyl phthalate and diethyl phthalate in zebrafish embryos. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 93, 39–44. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.03.038>
- Xu, H., Yang, J., Wang, Y., Jiang, Q., Chen, H., Song, H., 2008. Exposure to 17 α -ethynylestradiol impairs reproductive functions of both male and female zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat. Toxicol.* 88, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.01.020>
- Yang, P., Liu, K., 2015. Activity-Based Protein Profiling: Recent Advances in Probe Development and Applications. *ChemBioChem* 16, 712–724. <https://doi.org/10.1002/cbic.201402582>
- Yang, Y., Yang, X., Verhelst, S.H.L., 2013. Comparative Analysis of Click Chemistry Mediated Activity-Based Protein Profiling in Cell Lysates. *Molecules* 18, 12599–12608. <https://doi.org/10.3390/molecules181012599>

- Zacharewski, T., 1998. Examination of their Vitro and in Vivo Estrogenic Activities of Eight Commercial Phthalate Esters. *Toxicol. Sci.* 46, 282–293. <https://doi.org/10.1006/toxs.1998.2505>
- Zeiler, E., List, A., Alte, F., Gersch, M., Wachtel, R., Poreba, M., Drag, M., Groll, M., Sieber, S.A., 2013. Structural and functional insights into caseinolytic proteases reveal an unprecedented regulation principle of their catalytic triad. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 11302–11307. <https://doi.org/10.1073/pnas.1219125110>
- Zeng, Q., Wei, C., Wu, Y., Li, K., Ding, S., Yuan, J., Yang, X., Chen, M., 2013. Approach to distribution and accumulation of dibutyl phthalate in rats by immunoassay. *Food Chem. Toxicol.* 56, 18–27. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.01.045>
- Zhang, H., Liu, E., 2012. Binding behavior of DEHP to albumin: spectroscopic investigation. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 74, 231–238. <https://doi.org/10.1007/s10847-011-0104-6>
- Zhang, M., Chen, M., Tong, W., 2012. Is Toxicogenomics a More Reliable and Sensitive Biomarker than Conventional Indicators from Rats To Predict Drug-Induced Liver Injury in Humans? *Chem. Res. Toxicol.* 25, 122–129. <https://doi.org/10.1021/tx200320e>
- Zhang, W.-W., Gao, T.-T., Xu, L.-J., Li, B.-J., 2018. Macrolactonization of Alkynyl Alcohol through Rh(I)/Yb(III) Catalysis. *Org. Lett.* 20, 6534–6538. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.8b02858>
- Zheng, W., Lin, Q., Issah, M.A., Liao, Z., Shen, J., 2021. Identification of PLA2G7 as a novel biomarker of diffuse large B cell lymphoma. *BMC Cancer* 21, 927. <https://doi.org/10.1186/s12885-021-08660-4>
- Zheng, Z.-J., Wang, D., Xu, Z., Xu, L.-W., 2015. Synthesis of bi- and bis-1,2,3-triazoles by copper-catalyzed Huisgen cycloaddition: A family of valuable products by click chemistry. *Beilstein J. Org. Chem.* 11, 2557–2576. <https://doi.org/10.3762/bjoc.11.276>
- Zhou, J., Cai, Z.-H., Xing, K.-Z., 2011. Potential mechanisms of phthalate ester embryotoxicity in the abalone *Haliotis diversicolor supertexta*. *Environ. Pollut., Adaptation of Forest Ecosystems to Air Pollution and Climate Change* 159, 1114–1122. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.02.016>
- Zhou, X.-M., Lü, W.-J., Su, L., Shan, Z.-J., Chen, X.-G., 2012. Binding of Phthalate Plasticizers to Human Serum Albumin in Vitro: A Multispectroscopic Approach and Molecular Modeling. *J. Agric. Food Chem.* 60, 1135–1145. <https://doi.org/10.1021/jf204380r>
- Zhu, Y., Hua, R., Zhou, Y., Li, H., Quan, S., Yu, Y., 2016. Chronic exposure to mono-(2-ethylhexyl)-phthalate causes endocrine disruption and reproductive dysfunction in zebrafish. *Environ. Toxicol. Chem.* 35, 2117–2124. <https://doi.org/10.1002/etc.3369>
- Ziegler, S., Pries, V., Hedberg, C., Waldmann, H., 2013. Target Identification for Small Bioactive Molecules: Finding the Needle in the Haystack. *Angew. Chem. Int. Ed.* 52, 2744–2792. <https://doi.org/10.1002/anie.201208749>
- Zinsstag, J., Schelling, E., Waltner-Toews, D., Tanner, M., 2011. From “one medicine” to “one health” and systemic approaches to health and well-being. *Prev. Vet. Med.* 101, 148–156. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2010.07.003>

Annexes

1 ANNEXE 1 : Article soumis dans le journal Zebrafish

2 **First identification of a large set of serine hydrolases by activity-based protein profiling** 3 **in dibutyl phthalate-exposed zebrafish larvae**

4 Rodrigue S. YEDJI ¹, Bénédicte SOHM ^{1,2}, Virginie SALNOT³, François GUILLONNEAU³,
5 Carole COSSU-LEGUILLE ¹, Eric BATTAGLIA ^{1*}.

6 ¹ Université de Lorraine, LIEC, UMR7360, Campus Bridoux, Metz, F-57070, France.

7 ² Pôle de compétences en biologie environnementale, ANATELo, Université de Lorraine, F-57000
8 Metz, France

9 ³ Plateforme protéomique 3P5, Inserm U1016-Institut Cochin, Université Paris Descartes, MICUSPC,
10 Paris, France

11 *Email: eric.battaglia@univ-lorraine.fr

12 Keywords: zebrafish larvae, serine hydrolases, dibutyl phthalate, activity-based protein profiling,
13 proteomics

14

15 **Abstract**

16 Despite the involvement of several serine hydrolases (SHs) in the metabolism of xenobiotics
17 such as dibutyl phthalate (DBP), no study has focused on mapping this enzyme class in
18 zebrafish, a model organism frequently used in ecotoxicology. Here, we survey and identify
19 active SHs in zebrafish larvae and search for biological markers of SH type after exposition to
20 DBP. Zebrafish were exposed to 0, 5, and 100 µg/L DBP from 4 to 120 h post-fertilization. A
21 significant decrease in vitellogenin expression level of about 2-fold compared to the control
22 was found in larvae exposed to 100 µg/L DBP for 120h. The first comprehensive profiling of
23 active SHs in zebrafish proteome was achieved with an activity-based protein profiling (ABPP)
24 approach. Among 49 SHs identified with high confidence, one was the carboxypeptidase ctsa
25 overexpressed in larvae exposed to 100 µg/L DBP for 120h. To the best of our knowledge, this
26 is the first time that a carboxypeptidase has been identified as deregulated following exposure
27 to DBP. The overall results indicate that targeted proteomics approaches such as ABPP can
28 therefore be an asset for understanding the mechanism of action related to xenobiotics in
29 ecotoxicology.

30

31

32 Introduction

33 Dibutyl phthalate (DBP) is a plasticizer belonging to the phthalate ester family widely found in
34 various environmental compartments^{1,2}. In general, phthalate esters enter the environment
35 through losses during manufacturing processes via air emissions, aqueous effluents, solid
36 wastes and leaching of end products, since they are not chemically bound to the polymer
37 matrix^{2,3}. Several phthalates including DBP have been classified by the European Chemicals
38 Agency (ECHA) as endocrine disruptors⁴. They have numerous effects on living organisms,
39 such as malformations, anti-androgenic activity, teratogenicity, peroxisome proliferation and
40 reproductive toxicity in laboratory animals². These effects involve several receptors including
41 those activated by peroxisome proliferators (PPARs)^{5,6}, aryl hydrocarbon receptors (AhR)⁷,
42 estrogen receptors (ERs)^{8,9} and nuclear thyroid hormone receptors (TRs)⁹⁻¹¹. Although the toxic
43 effects of phthalates are well known, their modes of action are not fully established.

44 In this context, the study of enzymes involved in phthalate metabolism as well as those whose
45 expression is sensitive to the exposition to phthalates may be a relevant area to explore.
46 Enzymes such as carboxylesterases (CES), acetylcholine esterase (AChE) or butyrylcholine
47 esterase (BChE) all belonging to the family of serine hydrolases (SHs) are reported for their
48 role in the metabolism of xenobiotics including phthalates^{12,13}. Carboxylesterase is also used as
49 a biomarker of xenobiotic exposure in zebrafish^{14,15}. Likewise, Acey *et al.*, (2002) demonstrated
50 in brine shrimp (*Artemia salina*) larvae that there was a correlation between acute DBP toxicity
51 and the expression of BChE, an hydrolysing enzyme of this phthalate ester¹⁶. In addition to
52 BChE, AChE, a sensitive biomarker of neurotoxicants, is frequently used to assess phthalate
53 neurotoxicity^{17,18}. Xu *et al.* (2013) reported the inhibition of AChE in zebrafish larvae exposed
54 to DBP and diethyl phthalate¹⁹. Despite the involvement of several SHs in the metabolism of
55 xenobiotics and phthalates in particular and the sensitivity of their expression or activity to these
56 compounds, no study has focused on the overall mapping of this enzyme class in zebrafish (*D.*
57 *rerio*).

58 SHs are one of the largest and diverse enzyme families in eukaryotic and prokaryotic
59 proteomes²⁰⁻²³. They share a base-activated serine nucleophile catalytic mechanism to
60 hydrolyze amide, ester and thioester bonds in small-molecule metabolites and peptide and
61 protein substrates^{24,25}. They play important roles in numerous developmental and tissue-specific
62 events *in vivo*, including peptide hormone processing and neural plasticity²⁶. A thorough
63 evaluation of the SHs change in expression upon exposure to phthalates could help shed light
64 on their modes of action. This assessment can be done using a chemoproteomic approach called
65 activity-based protein profiling (ABPP) which uses a reactive probe to serine hydrolases. This
66 probe allows the labelling and subsequent identification of enzymes through the chemical
67 recognition of a specific catalytic mechanism²⁷.

68 The present study surveys the global activity of SHs in 5-day post-fertilization (dpf) zebrafish
69 larvae. Comparison of SHs activity profile between exposed organism and control was assessed
70 in order to gain insight into larvae response to DBP exposition. We combined ABPP with the
71 measurement of known biomarkers by two classical approaches, the measurement of gene
72 expression by RT-qPCR (vitellogenin, *vgt*; 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase, *17 β -hsd*; Acyl-
73 coenzyme-A-oxidase, *acox-1*) and the enzymatic activity of AChE.

74

75 **Methods**

76 **Note:** see supplementary methods for details on chemicals and reagents, total RNA extraction
77 and reverse transcription, proteins labelling with dB-FP, affinity purification and LC-MS/MS.

78 **Animals and exposure.** The zebrafish used were wild type (AB strain). They were kept in
79 standardized breeding systems supplied by a continuous flow of water in accordance with
80 standard NF EN ISO 7346-2 (1998). The preparation and collection of zebrafish embryos were
81 done according to Mu *et al.* (2013)²⁸. We performed two series of exposures of two replicates
82 each. Two concentrations of DBP, 5 and 100 µg/L (noted C5 and C100), were tested against a
83 control. All exposure solutions including the control solvent contained the same concentration
84 of DMSO (0.005% v/v). For each of the two series of exposure, the embryos used were collected
85 from two independent mating pairs. Two hundred embryos (4 hpf) were exposed in 250 mL at
86 26°C with a photoperiod of 14 h/10 h (light/dark) for 120 h. Every 24 h, 80% of the exposure
87 media was renewed with freshly prepared medium. Observations were made daily to identify
88 abnormalities in growth and eggs division, as well as mortalities which embryos were
89 systematically removed. After 120 h of exposure, 25 larvae were randomly collected for RT-
90 qPCR analyses and the remainder for proteomic analyses. Samples were stored at -80°C.

91 **Preparation of protein fractions.** All steps were performed at 4°C. The lysis buffer was
92 composed of 25 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% (v/v) NP-40, 1 mM EDTA and 5%
93 (v/v) glycerol and phosphatase inhibitor (PI). Zebrafish larvae were thawed at 4°C in ice. The
94 larvae were quickly Dounce-homogenized in presence of 50 µL of lysis buffer and a scoop of
95 glass beads then 450 µL of lysis buffer was added and a second homogenization was done with
96 a Bead-beater (2 times, 60 s at 30 Hz). Sample was centrifuged at 1500 x g for 10 min and
97 supernatant was ultracentrifuged at 100,000 x g for 60 min to obtain the soluble (supernatant)
98 and membrane (pellet) fractions.

99 **Measurement of AChE enzymatic activities.** AChE activity was measured according to the
100 method of Ellman *et al.* (1961)²⁹ adapted for measurement in a 96-well plate (see supplementary
101 methods). The relative enzymatic activity was calculated considering the control sample
102 (DMSO) as a reference.

103 **Competitive labelling with T-FP.** Competitive labelling was carried out first between a known
104 inhibitor of serine hydrolases, PMSF (2 mM in DMSO) and the ActivX-TAMRA-FP probe (T-
105 FP), and secondly between the ActivX Desthiobiotin-probe FP (dB-FP) and the T-FP probe,
106 each at 2 µM in DMSO. 50 µg of each fraction (membrane and soluble) were incubated with
107 the inhibitor or DMSO for 15 min at 25°C, then 2 µM of T-FP probe were added, and samples
108 were incubated again for 15 min. The reaction was quenched by adding SDS-PAGE Laemmli
109 buffer and samples were run on SDS-PAGE. Visualization of enzyme profiles was performed
110 by scanning the gel at 532 nm with the Typhoon™ Imager (GE Healthcare Life Science). Gels
111 were then stained with Coomassie blue and scanned.

112 **Results**

113 **Survival and developmental abnormalities in control and DBP-exposed embryos and**
114 **larvae.** Mortality was recorded only in the first 48 h of exposure. It did not differ significantly
115 (*t*-test, *p*<0.05) between DBP-exposed and unexposed embryos. Mortality averaged 2% per
116 treatment (Table S1). Exposure to DBP did not result in developmental abnormalities. Overall
117 hatching rates were 1.3%, 69% (± 6%) and 96% (± 1%) at 72 hpf, 96 hpf and 120 hpf

118 respectively without significant difference (t -test, $p < 0.05$) between control and treatments
119 (Table S1).

120 **AChE activity assay.** The reduction of AChE activity is often used as a biomarker of
121 neurotoxicity in fish species including zebrafish¹⁹. As this enzyme can exist in a molecular form
122 that is both membrane bound and secreted into cells³⁰, activities were measured on both soluble
123 and insoluble protein fractions. Average AChE activity is 7 times higher in the insoluble
124 fractions compared to the soluble ones (Fig. 1). No statistically significant reduction of AChE
125 activity was observed in soluble nor insoluble fractions during DBP exposure (t -test, $p < 0.05$).

126 **qRT-PCR expression of relevant genes.** The expression of three relevant genes was measured
127 by qRT-PCR to check whether the associated molecular pathways are affected by DBP. For
128 C100, *vtg* expression level (Fig. 2) was significantly halved compared to the control. Although
129 the differences were not statistically significant ($p < 0.01$), there was a downward trend in the
130 relative level of *17 β -hsd* mRNA and an upward trend in the relative level of *acox-1* mRNA in
131 larvae exposed to C100 compared to control. No change in the relative expression level of the
132 three genes was observed in larvae exposed to C5 compared to control.

133 **Validation of the use of ABPP probes for profiling SHs in the zebrafish larvae proteome.**
134 An *in vitro* ABPP competition was performed with a known SHs inhibitor, PMSF, to verify the
135 specificity and selectivity of the identified SHs on gel. The potential labelling of the dB-FP
136 probe expected for affinity purification of SHs in zebrafish proteome was also tested. For these
137 *in vitro* competition assays, fractions were pre-incubated with dB-FP, PMSF or DMSO before
138 labelling with the T-FP probe. Tagged proteins were detected in both fractions, with stronger
139 signals in the soluble one (Fig. 4b vs. 4c, lane 1). The profiles of labelled proteins differ from
140 one fraction to another (Fig. 4b and 4c) and support our choice to analyse them separately in
141 the proteomic analyses described below. Pre-incubation of the fractions with PMSF totally
142 inhibited the labelling of many proteins in soluble fraction (Fig. 4b, *eg.* red asterisk) and reduced
143 the labelling of others (Fig. 4b, *eg.* blue asterisk). These results suggest that these proteins are
144 SHs. Despite the weak labelling in insoluble fraction, several proteins could be detected (Fig.
145 4d, red asterisk), whose signal was partially or totally inhibited by PMSF. However, such
146 imaging will not reveal weakly expressed SHs. These data support the utilization of these two
147 probes for gel imaging and MS identification of larvae SHs.

148 **Identification of SHs in the proteome of zebrafish larvae exposed to DBP.** Because of its
149 sensitivity for protein target identification, gel-free MS-based ABPP was used as described in
150 Fig. 3c. The SHs identified in both fractions in control and DBP-exposed larvae (C5 & C100)
151 are listed in Table 1. In total, 50 serine hydrolases were identified in C100 and control, and 53
152 in C5 samples. Among the 49 SHs common to all three conditions, 6 are enriched in both
153 fractions, 42 are specifically enriched in soluble fraction and only one SH (tripeptidyl-peptidase
154 2) is specifically enriched in insoluble fraction. Among proteins other than the SHs identified
155 (Table 1), the collagen-like tail subunit (single strand of homotrimer) of asymmetric
156 acetylcholinesterase was specifically enriched in the insoluble fraction. This protein is mainly
157 responsible for AChE presence at neuromuscular junctions³¹.

158 **Functional annotation of SHs.** We focused on SHs comparison between larvae exposed to
159 DBP and control. Only one significantly differentially regulated SH ($p < 0.05$) was observed
160 (Table S2). This enzyme is the carboxypeptidase (*ctsa*), identified in the soluble and insoluble
161 fractions but for which the t -test is only significant for the insoluble fraction. It is 2.3 times

162 more expressed at C100 compared to control. In order to obtain additional information on the
163 identified proteins, we performed an analysis with the bioinformatics resources of the STRING
164 database (<https://string-db.org/>)³². As for GO classification of biological process, all annotated
165 proteins are associated to metabolic process (Table S3). About 10% of proteins are so far not
166 annotated in GO biological process. Concerning molecular function, 96% of identified proteins
167 are reported to have a catalytic activity. Among proteins associated with KEGG pathways, we
168 found *ctsa* differentially regulated according to exposure to DBP. It is involved in the KEGG
169 pathway of lysosomes (KEGG ID dre04142). Only 9 proteins were associated with KEGG
170 pathways (Table S3).

171 We performed a BLASTP search of all 49 SHs against human reference databases (RefSeq, as
172 *D. rerio* sequences are not included) in order to analyse them with QIAGEN IPA software. A
173 total of 37 SHs were mapped on canonical pathways with the most contributing SHs related to
174 triacylglycerol degradation, retinol biosynthesis, heparan sulfate biosynthesis (late stages),
175 xenobiotic metabolism PXR signalling pathway, SPRINK1 pancreatic cancer pathway,
176 phospholipases and stearate biosynthesis (animals). Of the 37 human orthologous SHs
177 identified, 4 are used as biomarkers *i.e.* FASN for the diagnosis of breast cancer, PLA2G7 for
178 the diagnosis of ischaemic stroke and coronary artery disease, LCAT for the efficacy of
179 dyslipidaemia and CELA1 for the efficacy of pancreatic cancer.

180 Discussion

181 Although there is evidence of involvement of certain SHs in phthalates metabolism, including
182 DBP in various organisms^{13,16,19}, no studies have investigated SHs in zebrafish. We proposed
183 to fill this gap by using ABPP to map active SHs in zebrafish larvae proteome and test
184 hypothesis that disruption of the activity profile of some SHs could be associated with exposure
185 to DBP. Zebrafish was chosen because of the many advantages affiliated to its use³³⁻³⁶ as well
186 as for its sensibility to DBP^{37,38}. DBP-sensitive biomarkers were also tested to ensure that
187 different metabolic pathways are likely to be affected in zebrafish larvae under our experimental
188 conditions. These include the perturbation AChE activity¹⁹, as well as transcription level of
189 three target genes (*vtg*, *17 β -hsd*, *acox-1*) that are often deregulated in the presence of DBP³⁹⁻⁴¹.

190 We profiled AChE activity and observed no significant changes between the three conditions
191 of exposure (Fig.1). This finding suggests that there is no major disturbance of neuronal
192 development in zebrafish larvae exposed to DBP (5 and 100 μ g/L) based upon AChE, in line
193 with Xu *et al.* (2013), where no significant inhibition of AChE was found after exposure of
194 zebrafish larvae to 5 and 50 μ g/L DBP. In contrast, exposure of zebrafish larvae to high doses
195 of DBP (500 μ g/L) leads to a significant reduction of AChE activity¹⁹. We hypothesise that the
196 tested DBP concentrations are not high enough to affect metabolic pathways related to the
197 regulation of AChE activity, particularly those involving AhR^{7,42}. Concerning the high activity
198 of AChE observed in insoluble fraction, it could be linked to the abundance of ColQ protein
199 with which AChE subunits would be associated³¹.

200 We then carried out qRT-PCR analyses to assess *acox-1*, *17 β -hsd* and *vtg* gene relative
201 expression. The peroxisomal enzyme *acox-1* is widely used as an indicator of PPAR activation
202 in fish⁴⁰. No significant variations in relative *acox-1* mRNA levels was observed between the 3
203 conditions in this study (Fig. 2). Conversely, Uren-Webster *et al.* (2010) demonstrated that
204 exposure of adult male zebrafish to 5000 mg/kg of the related phthalate DEHP increases the
205 expression levels of two PPAR-responsive genes including *acox1*⁴³. The lack of variation in

206 *acox-1* expression may therefore be linked to our experimental conditions (age of the
207 organisms, phthalate concentration and duration of exposure), but also to the fact that DBP is a
208 weaker peroxisome proliferator than DEHP⁴⁴. *17 β -hsd* gene has the ability to modulate not only
209 steroid but also fatty acid and bile concentrations⁴⁵ and is considered a key regulator of early
210 embryonic development by allowing maintenance of steroid homeostasis, regulation of cell
211 differentiation and organogenesis⁴⁶. Similarly to *acox-1*, no significant change in relative
212 expression of *17 β -hsd* was observed in the present study, although there appeared to be a trend
213 towards a reduction at C100.

214 Regarding *vtg*, a 2-fold reduction in its expression level compared to control was observed in
215 larvae at C100. Many studies suggest the induction of vitellogenin as a marker of toxicity to
216 EDCs, but some chemicals appear to influence fish vitellogenin expression in a way that differs
217 from the known pattern⁴⁷. For example, when zebrafish were exposed to 100 μ g/L DBP, *vtg*
218 expression was inhibited at 6 dpf but increased at 21 dpf and was not modified at 35 dpf³⁹. This
219 variation in *vtg* expression reflects the complexity of the changes induced by EDCs in fish
220 biomarkers, particularly in zebrafish.

221 Referring to the activity of AChE and genes expression level in presence of DBP, we can
222 assume that the corresponding DBP-sensitive molecular pathways are not fully affected under
223 our experimental conditions. On other hand, *vtg* mRNA disruption suggests otherwise. This
224 indicates that corresponding pathways are differentially activated by DBP.

225 ABPP approach was used for the first time in zebrafish larvae to map SHs and evaluate their
226 profiles as a function of exposure to DBP. Classically, SHs are divided into two subgroups
227 consisting of serine proteases (SPs) and metabolic serine hydrolases (mSHs)²¹. We identified
228 with high confidence 16 serine proteases (33%) and 33 metabolic serine hydrolases (67%) in
229 the larval zebrafish proteome (Table 1). In addition, we detected a carboxypeptidase (*ctsa*)
230 overexpressed in the presence of 100 μ g/L of DBP. To the best of our knowledge, this is the
231 first time that a carboxypeptidase has been identified as deregulated following exposure to DBP.
232 For example, this protein is not one of the 41 proteins deregulated in the presence of DBP,
233 identified in zebrafish with the untargeted differential proteomics iTRAQ method⁴⁸. Targeted
234 proteomics approaches such as ABPP can therefore be an asset for understanding the MOAs
235 related to xenobiotics in ecotoxicology.

236 However, the strong variabilities between biological replicates failed to highlight with
237 confidence more SHs affected by the presence of DBP. It is well established that the embryonic
238 membrane and chorion form a protective barrier and thus reduce the sensitivity of zebrafish
239 embryos to chemicals^{15,49,50}. At 96 hpf, 31% of the embryos were still protected by the chorion
240 while the absence of chorion in 69% of the larvae made them more likely to be susceptible to
241 DBP exposure. This biological variation between individuals in the same group may have
242 prevented observation of differences in the expression of SHs, especially as standard deviations
243 measured between replicates in the same group is high, as showed in AChE activity (Fig 1).
244 This potential pitfall has already been reported⁵¹.

245 About 70% of human genes have at least one obvious zebrafish orthologue⁵². Identification in
246 this study of 4 SHs human orthologue used as biomarkers in the diagnosis and treatment
247 efficacy of several forms of cancer (PLA2G7, CELA1 and FASN)⁵³⁻⁵⁵, dyslipidemia (LCAT)⁵⁶
248 and ischemic stroke (PLA2G7)⁵⁷ suggests that zebrafish (larvae) may be a relevant model for
249 the SHs inhibitor discovery process (*e.g.* drug discovery³⁶).

250 The present study demonstrates the utility of ABPP approach to map active SHs in zebrafish
251 larvae. Functional annotation of 49 SHs common to all 3 conditions (control, C5, C100)
252 provides new information on the involvement of these enzymes in various metabolic pathways.
253 We identify the carboxypeptidase ctsa as a SH induced by DBP at C100. The variability in
254 biological replicates limits the identification of other dysregulated SHs and highlight the
255 importance of a high number of replicates in hatching embryos. Considering the use of
256 xenobiotic-metabolizing enzymes as biomarkers⁵⁸⁻⁶⁰; it seems appropriate to continue to assess
257 SHs expression in relation to DBP or other xenobiotic exposure in order to discover sensitive
258 biomarkers using this approach.

259 **Acknowledgements**

260 We wish to acknowledge the financial support of the CNRS (EC2CO project ChemBioPE), the
261 technical help for embryos exposure of Justine Flayac from the Pôle de compétences en biologie
262 environnementale (LIEC – ANATELo - Université de Lorraine - CNRS – [http://liec.univ-](http://liec.univ-lorraine.fr)
263 [lorraine.fr](http://liec.univ-lorraine.fr)). This work is part of the PhD thesis of Rodrigue S. Yedji who received a fellowship
264 from the French Ministry of Research, Higher Education and Innovation. The 3p5 Proteom'IC
265 facility wishes to acknowledge the DIM Thérapie Génique Paris Ile-de-France Région, IBiSA,
266 Université Paris Descartes and the Labex GR-Ex for funding the Mass Spectrometer, Cedric
267 Broussard and Johanna Bruce for logistics and sample handling, respectively.

268 **Disclosure Statement**

269 No competing financial interests exist.

270 **References**

- 271 1. Net S, Sempéré R, Delmont A, et al. Occurrence, Fate, Behavior and Ecotoxicological State of
272 Phthalates in Different Environmental Matrices. *Environ Sci Technol* 2015;49(7):4019–4035; doi:
273 10.1021/es505233b.
- 274 2. Peijnenburg WJGM. Phthalates. In: *Encyclopedia of Ecology*. (Jørgensen SE and Fath BD. eds)
275 Academic Press: Oxford; 2008; pp. 2733–2738; doi: 10.1016/B978-008045405-4.00419-5.
- 276 3. Liang D-W, Zhang T, Fang HHP, et al. Phthalates Biodegradation in the Environment. *Appl*
277 *Microbiol Biotechnol* 2008;80(2):183; doi: 10.1007/s00253-008-1548-5.
- 278 4. Anonymous. ECHA. n.d. [Last accessed: 2/7/2022].
- 279 5. Gazouli M, Yao Z-X, Boujrad N, et al. Effect of Peroxisome Proliferators on Leydig Cell Peripheral-
280 Type Benzodiazepine Receptor Gene Expression, Hormone-Stimulated Cholesterol Transport,
281 and Steroidogenesis: Role of the Peroxisome Proliferator-Activator Receptor α . *Endocrinology*
282 2002;143(7):2571–2583; doi: 10.1210/endo.143.7.8895.
- 283 6. Mathieu-Denoncourt J, Wallace SJ, de Solla SR, et al. Plasticizer Endocrine Disruption:
284 Highlighting Developmental and Reproductive Effects in Mammals and Non-Mammalian Aquatic
285 Species. *Gen Comp Endocrinol* 2015;219:74–88; doi: 10.1016/j.ygcen.2014.11.003.
- 286 7. Wójtowicz AK, Szychowski KA, Wnuk A, et al. Dibutyl Phthalate (DBP)-Induced Apoptosis and
287 Neurotoxicity Are Mediated via the Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) but Not by Estrogen
288 Receptor Alpha (ER α), Estrogen Receptor Beta (ER β), or Peroxisome Proliferator-Activated

- 289 Receptor Gamma (PPAR γ) in Mouse Cortical Neurons. *Neurotox Res* 2017;31(1):77–89; doi:
290 10.1007/s12640-016-9665-x.
- 291 8. Jobling S, Reynolds T, White R, et al. A Variety of Environmentally Persistent Chemicals, Including
292 Some Phthalate Plasticizers, Are Weakly Estrogenic. *Environ Health Perspect* 1995;103(6):582–
293 587.
- 294 9. Cooke PS, Simon L and Denslow ND. Endocrine Disruptors. In: Haschek and Rousseaux's
295 Handbook of Toxicologic Pathology Elsevier; 2013; pp. 1123–1154; doi: 10.1016/B978-0-12-
296 415759-0.00037-6.
- 297 10. Shen O, Wu W, Du G, et al. Thyroid Disruption by Di-n-Butyl Phthalate (DBP) and Mono-n-Butyl
298 Phthalate (MBP) in *Xenopus Laevis*. *Laudet V. ed. PLoS ONE* 2011;6(4):e19159; doi:
299 10.1371/journal.pone.0019159.
- 300 11. Lee E, Ahn MY, Kim HJ, et al. Effect of Di(n-Butyl) Phthalate on Testicular Oxidative Damage and
301 Antioxidant Enzymes in Hyperthyroid Rats. *Environ Toxicol* 2007;22(3):245–255; doi:
302 <https://doi.org/10.1002/tox.20259>.
- 303 12. Lin Q, Chen S, Chao Y, et al. Carboxylesterase-Involved Metabolism of Di-n-Butyl Phthalate in
304 Pumpkin (*Cucurbita Moschata*) Seedlings. *Environ Pollut* 2017;220:421–430; doi:
305 10.1016/j.envpol.2016.09.084.
- 306 13. Mahajan R, Verma S, Kushwaha M, et al. Biodegradation of Di-n-butyl Phthalate by
307 Psychrotolerant *Sphingobium Yanoikuyae* Strain P4 and Protein Structural Analysis of
308 Carboxylesterase Involved in the Pathway. *Int J Biol Macromol* 2019;122:806–816; doi:
309 10.1016/j.ijbiomac.2018.10.225.
- 310 14. de Lima D, Roque GM and de Almeida EA. In Vitro and in Vivo Inhibition of Acetylcholinesterase
311 and Carboxylesterase by Metals in Zebrafish (*Danio Rerio*). *Mar Environ Res* 2013;91:45–51; doi:
312 10.1016/j.marenvres.2012.11.005.
- 313 15. Velki M, Meyer-Alert H, Seiler T-B, et al. Enzymatic Activity and Gene Expression Changes in
314 Zebrafish Embryos and Larvae Exposed to Pesticides Diazinon and Diuron. *Aquat Toxicol*
315 2017;193:187–200; doi: 10.1016/j.aquatox.2017.10.019.
- 316 16. Acey RA, Bailey S, Healy P, et al. A Butyrylcholinesterase in the Early Development of the Brine
317 Shrimp (*Artemia Salina*) Larvae: A Target for Phthalate Ester Embryotoxicity? *Biochem Biophys*
318 *Res Commun* 2002;299(4):659–662; doi: 10.1016/S0006-291X(02)02716-X.
- 319 17. Ghorpade N, Mehta V, Khare M, et al. Toxicity Study of Diethyl Phthalate on Freshwater Fish
320 *Cirrhina Mrigala*. *Ecotoxicol Environ Saf* 2002;53(2):255–258; doi: 10.1006/eesa.2002.2212.
- 321 18. Jee JH, Koo JG, Keum YH, et al. Effects of Dibutyl Phthalate and Di-Ethylhexyl Phthalate on
322 Acetylcholinesterase Activity in Bagrid Catfish, *Pseudobagrus Fulvidraco* (Richardson). *J Appl*
323 *Ichthyol* 2009;25(6):771–775; doi: 10.1111/j.1439-0426.2009.01331.x.
- 324 19. Xu H, Shao X, Zhang Z, et al. Effects of Di-n-Butyl Phthalate and Diethyl Phthalate on
325 Acetylcholinesterase Activity and Neurotoxicity Related Gene Expression in Embryonic Zebrafish.
326 *Bull Environ Contam Toxicol* 2013;91(6):635–639; doi: 10.1007/s00128-013-1101-9.

- 327 20. Chen B, Ge S-S, Zhao Y-C, et al. Activity-Based Protein Profiling: An Efficient Approach to Study
328 Serine Hydrolases and Their Inhibitors in Mammals and Microbes. *RSC Adv* 2016;6(114):113327–
329 113343; doi: 10.1039/C6RA20006K.
- 330 21. Bachovchin DA and Cravatt BF. The Pharmacological Landscape and Therapeutic Potential of
331 Serine Hydrolases. *Nat Rev Drug Discov* 2012;11(1):52–68; doi: 10.1038/nrd3620.
- 332 22. Adibekian A, Martin BR, Wang C, et al. Click-Generated Triazole Ureas as Ultrapotent in Vivo–
333 Active Serine Hydrolase Inhibitors. *Nat Chem Biol* 2011;7(7):469–478; doi:
334 10.1038/nchembio.579.
- 335 23. Long JZ and Cravatt BF. The Metabolic Serine Hydrolases and Their Functions in Mammalian
336 Physiology and Disease. *Chem Rev* 2011;111(10):6022–6063; doi: 10.1021/cr200075y.
- 337 24. Simon GM and Cravatt BF. Activity-Based Proteomics of Enzyme Superfamilies: Serine Hydrolases
338 as a Case Study. *J Biol Chem* 2010;285(15):11051–11055; doi: 10.1074/jbc.R109.097600.
- 339 25. Moellering RE and Cravatt BF. How Chemoproteomics Can Enable Drug Discovery and
340 Development. *Chem Biol* 2012;19(1):11–22; doi: 10.1016/j.chembiol.2012.01.001.
- 341 26. Liu Y, Patricelli MP and Cravatt BF. Activity-Based Protein Profiling: The Serine Hydrolases. *Proc*
342 *Natl Acad Sci* 1999;96(26):14694–14699; doi: 10.1073/pnas.96.26.14694.
- 343 27. Cravatt BF, Wright AT and Kozarich JW. Activity-Based Protein Profiling: From Enzyme Chemistry
344 to Proteomic Chemistry. *Annu Rev Biochem* 2008;77(1):383–414; doi:
345 10.1146/annurev.biochem.75.101304.124125.
- 346 28. Mu X, Pang S, Sun X, et al. Evaluation of Acute and Developmental Effects of Difenoconazole via
347 Multiple Stage Zebrafish Assays. *Environ Pollut* 2013;175:147–157; doi:
348 10.1016/j.envpol.2012.12.029.
- 349 29. Ellman GL, Courtney KD, Andres V, et al. A New and Rapid Colorimetric Determination of
350 Acetylcholinesterase Activity. *Biochem Pharmacol* 1961;7(2):88–95; doi: 10.1016/0006-
351 2952(61)90145-9.
- 352 30. Szegletes T, Bálint T, Szegletes Z, et al. In Vivo Effects of Deltamethrin Exposure on Activity and
353 Distribution of Molecular Forms of Carp AChE. *Ecotoxicol Environ Saf* 1995;31(3):258–263; doi:
354 10.1006/eesa.1995.1072.
- 355 31. Bernard V, Girard E, Hrabovska A, et al. Distinct Localization of Collagen Q and PRiMA Forms of
356 Acetylcholinesterase at the Neuromuscular Junction. *Mol Cell Neurosci* 2011;46(1):272–281; doi:
357 10.1016/j.mcn.2010.09.010.
- 358 32. Szklarczyk D, Gable AL, Nastou KC, et al. The STRING Database in 2021: Customizable Protein-
359 Protein Networks, and Functional Characterization of User-Uploaded Gene/Measurement Sets.
360 *Nucleic Acids Res* 2021;49(D1):D605–D612; doi: 10.1093/nar/gkaa1074.
- 361 33. Kantae V, Krekels EHJ, Ordas A, et al. Pharmacokinetic Modeling of Paracetamol Uptake and
362 Clearance in Zebrafish Larvae: Expanding the Allometric Scale in Vertebrates with Five Orders of
363 Magnitude. *Zebrafish* 2016;13(6):504–510; doi: 10.1089/zeb.2016.1313.
- 364 34. Vliegthart ADB, Tucker CS, Del Pozo J, et al. Zebrafish as Model Organisms for Studying Drug-
365 Induced Liver Injury. *Br J Clin Pharmacol* 2014;78(6):1217–1227; doi: 10.1111/bcp.12408.

- 366 35. Santoro MM. Zebrafish as a Model to Explore Cell Metabolism. *Trends Endocrinol Metab*
367 2014;25(10):546–554; doi: 10.1016/j.tem.2014.06.003.
- 368 36. Patton EE, Zon LI and Langenau DM. Zebrafish Disease Models in Drug Discovery: From
369 Preclinical Modelling to Clinical Trials. *Nat Rev Drug Discov* 2021;20(8):611–628; doi:
370 10.1038/s41573-021-00210-8.
- 371 37. Xu H, Dong X, Zhang Z, et al. Assessment of Immunotoxicity of Dibutyl Phthalate Using Live
372 Zebrafish Embryos. *Fish Shellfish Immunol* 2015;45(2):286–292; doi: 10.1016/j.fsi.2015.04.033.
- 373 38. Ortiz-Zarragoitia M, Trant JM and Cajaraville MP. Effects of Dibutylphthalate and Ethynylestradiol
374 on Liver Peroxisomes, Reproduction, and Development of Zebrafish (*Danio Rerio*). *Environ*
375 *Toxicol Chem* 2006;25(9):2394.
- 376 39. Dang Z. Interpretation of Fish Biomarker Data for Identification, Classification, Risk Assessment
377 and Testing of Endocrine Disrupting Chemicals. *Environ Int* 2016;92–93:422–441; doi:
378 10.1016/j.envint.2016.04.003.
- 379 40. Ortiz-Zarragoitia M and Cajaraville MP. Effects of Selected Xenoestrogens on Liver Peroxisomes,
380 Vitellogenin Levels and Spermatogenic Cell Proliferation in Male Zebrafish. *Comp Biochem*
381 *Physiol Part C Toxicol Pharmacol* 2005;141(2):133–144; doi: 10.1016/j.cca.2005.05.010.
- 382 41. Zhou J, Cai Z-H and Xing K-Z. Potential Mechanisms of Phthalate Ester Embryotoxicity in the
383 Abalone *Haliotis Diversicolor Supertexta*. *Environ Pollut* 2011;159(5):1114–1122; doi:
384 10.1016/j.envpol.2011.02.016.
- 385 42. Xie HQ, Ma Y, Fu H, et al. New Perspective on the Regulation of Acetylcholinesterase via the Aryl
386 Hydrocarbon Receptor. *J Neurochem* 2021;158(6):1254–1262; doi: 10.1111/jnc.15261.
- 387 43. Uren-Webster TM, Lewis C, Filby AL, et al. Mechanisms of Toxicity of Di(2-Ethylhexyl) Phthalate
388 on the Reproductive Health of Male Zebrafish. *Aquat Toxicol* 2010;99(3):360–369; doi:
389 10.1016/j.aquatox.2010.05.015.
- 390 44. Lapinskas PJ, Brown S, Leesnitzer LM, et al. Role of PPAR α in Mediating the Effects of Phthalates
391 and Metabolites in the Liver. *Toxicology* 2005;207(1):149–163; doi: 10.1016/j.tox.2004.09.008.
- 392 45. Mindnich R, Möller G and Adamski J. The Role of 17 Beta-Hydroxysteroid Dehydrogenases. *Mol*
393 *Cell Endocrinol* 2004;218(1–2):7–20; doi: 10.1016/j.mce.2003.12.006.
- 394 46. Khan MN, Renaud RL and Leatherland JF. Steroid Metabolism by Embryonic Tissues of Arctic
395 Charr, *Salvelinus Alpinus*. *Gen Comp Endocrinol* 1997;105(3):344–357; doi:
396 10.1006/gcen.1996.6835.
- 397 47. Dang Z. Fish Biomarkers for Regulatory Identification of Endocrine Disrupting Chemicals. *Environ*
398 *Pollut* 2014;185:266–270; doi: 10.1016/j.envpol.2013.11.006.
- 399 48. Dong X, Qiu X, Meng S, et al. Proteomic Profile and Toxicity Pathway Analysis in Zebrafish
400 Embryos Exposed to Bisphenol A and Di-n-Butyl Phthalate at Environmentally Relevant Levels.
401 *Chemosphere* 2018;193:313–320; doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.11.042.
- 402 49. Xu C, Wang J, Liu W, et al. Separation and Aquatic Toxicity of Enantiomers of the Pyrethroid
403 Insecticide Lambda-Cyhalothrin. *Environ Toxicol Chem* 2008;27(1):174–181; doi: 10.1897/07-
404 134.1.

- 405 50. Embry MR, Belanger SE, Braunbeck TA, et al. The Fish Embryo Toxicity Test as an Animal
406 Alternative Method in Hazard and Risk Assessment and Scientific Research. *Aquat Toxicol*
407 2010;97(2):79–87; doi: 10.1016/j.aquatox.2009.12.008.
- 408 51. Simmons DBD, Benskin JP, Cosgrove JR, et al. Omics for Aquatic Ecotoxicology: Control of
409 Extraneous Variability to Enhance the Analysis of Environmental Effects: Variability of Omics Data
410 in Aquatic Ecotoxicology. *Environ Toxicol Chem* 2015;34(8):1693–1704; doi: 10.1002/etc.3002.
- 411 52. Howe K, Clark MD, Torroja CF, et al. The Zebrafish Reference Genome Sequence and Its
412 Relationship to the Human Genome. *Nature* 2013;496(7446):498–503; doi:
413 10.1038/nature12111.
- 414 53. Zheng W, Lin Q, Issah MA, et al. Identification of PLA2G7 as a Novel Biomarker of Diffuse Large B
415 Cell Lymphoma. *BMC Cancer* 2021;21(1):927; doi: 10.1186/s12885-021-08660-4.
- 416 54. MD LDL. An in Vivo Proof of Principle Trial to Determine Whether the Nutritional Supplement
417 Conjugated Linoleic Acid (CLA, Clarinol™) Can Modulate the Lipogenic Pathway in Breast Cancer
418 Tissue. Clinical trial registration. clinicaltrials.gov; 2019.
- 419 55. Columbia University. MRCP With Secretin Stimulation for the Evaluation of Pancreatic Endocrine
420 and Exocrine Function Following Surgical Resection for Pancreatic Adenocarcinoma. Clinical trial
421 registration. clinicaltrials.gov; 2015.
- 422 56. GlaxoSmithKline. A Two Part, Multicenter Phase IIa, Placebo Controlled Study, to Examine the
423 Safety, Tolerability, and Effects of GSK256073 on Lipids in Subjects With Dyslipidemia. Clinical
424 trial registration. clinicaltrials.gov; 2019.
- 425 57. Albers GW. TIA Triage Trial and Evaluation of Vascular-Specific Inflammatory Biomarker Lp-PLA2
426 as a Stratification Tool for TIA Triage and Stroke Risk. Clinical trial registration. clinicaltrials.gov;
427 2019.
- 428 58. Tierbach A, Groh KJ, Schönenberger R, et al. Glutathione S-Transferase Protein Expression in
429 Different Life Stages of Zebrafish (*Danio Rerio*). *Toxicol Sci* 2018;162(2):702–712; doi:
430 10.1093/toxsci/kfx293.
- 431 59. Cravedi J-P and Perdu-durand E. The Phthalate Diesters DEHP and DBP Do Not Induce Lauric Acid
432 Hydroxylase Activity in Rainbow Trout. *Mar Environ Res* 2002;54(3):787–791; doi:
433 10.1016/S0141-1136(02)00196-4.
- 434 60. Otte JC, Schultz B, Fruth D, et al. Intrinsic Xenobiotic Metabolizing Enzyme Activities in Early Life
435 Stages of Zebrafish (*Danio Rerio*). *Toxicol Sci Off J Soc Toxicol* 2017;159(1):86–93; doi:
436 10.1093/toxsci/kfx116.
- 437 61. Livak KJ and Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time
438 Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 2001;25(4):402–408; doi:
439 10.1006/meth.2001.1262.

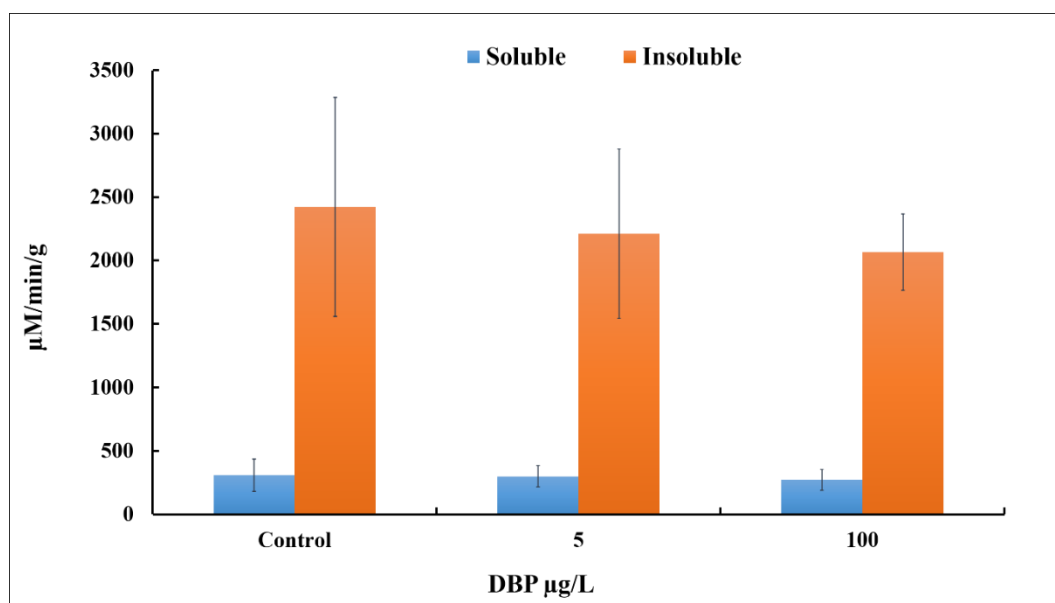
440

441

442 **Figure Legends**

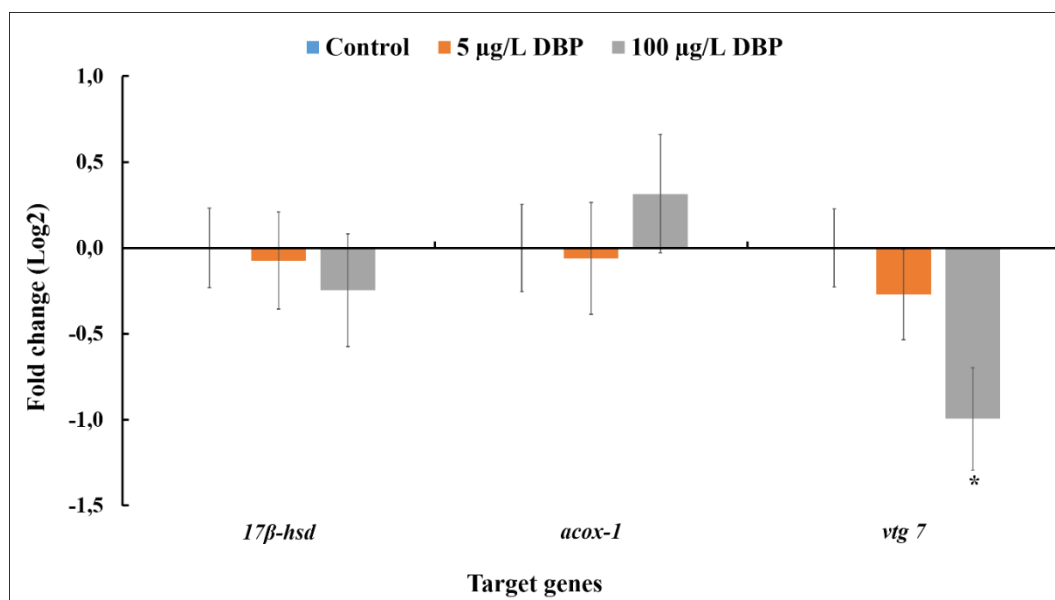
443

444

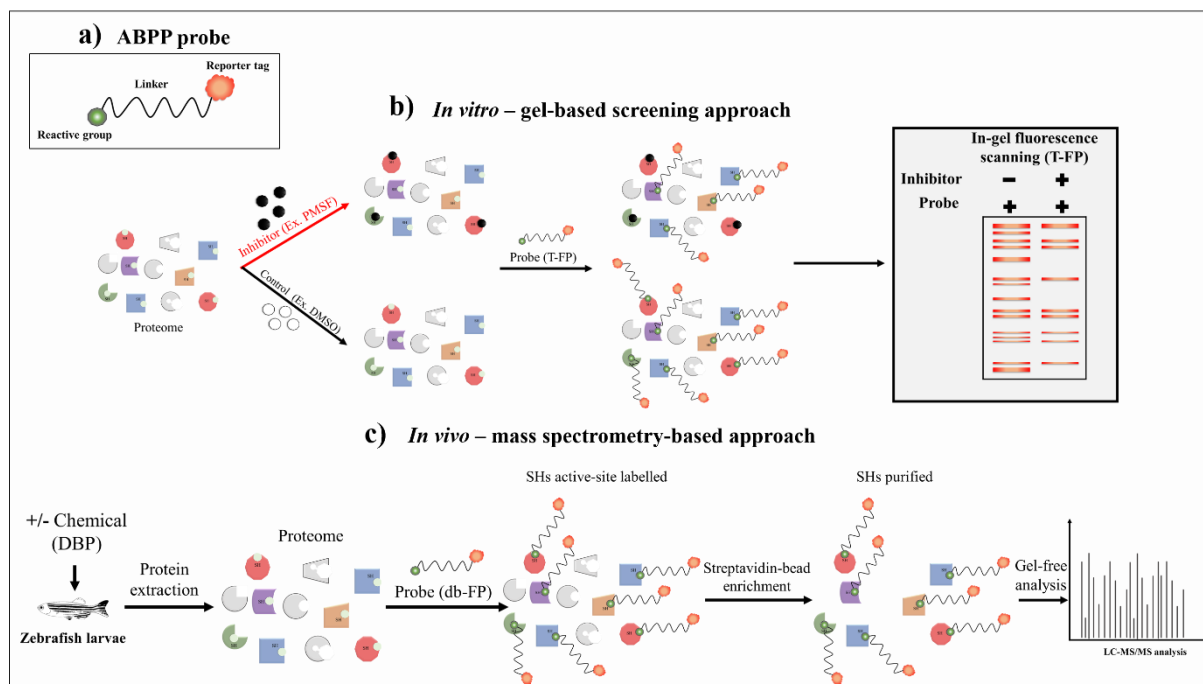


445 **Figure 1.** AChE activity in zebrafish (*D. rerio*) larvae exposed to different concentrations of
 446 DBP (0, 5 and 100 µg/L) for 5 days. Measurements were performed on the soluble and insoluble
 447 protein fractions. Results are the mean \pm SD of replicate samples. For controls, AChE activity
 448 was 307 µM/min/g (\pm 127) and 2422 µM/min/g (\pm 863) for soluble and insoluble fractions,
 449 respectively. A *t*-test was used to determine statistical differences between experimental groups,
 450 with $p < 0.05$ considered as significant.

451

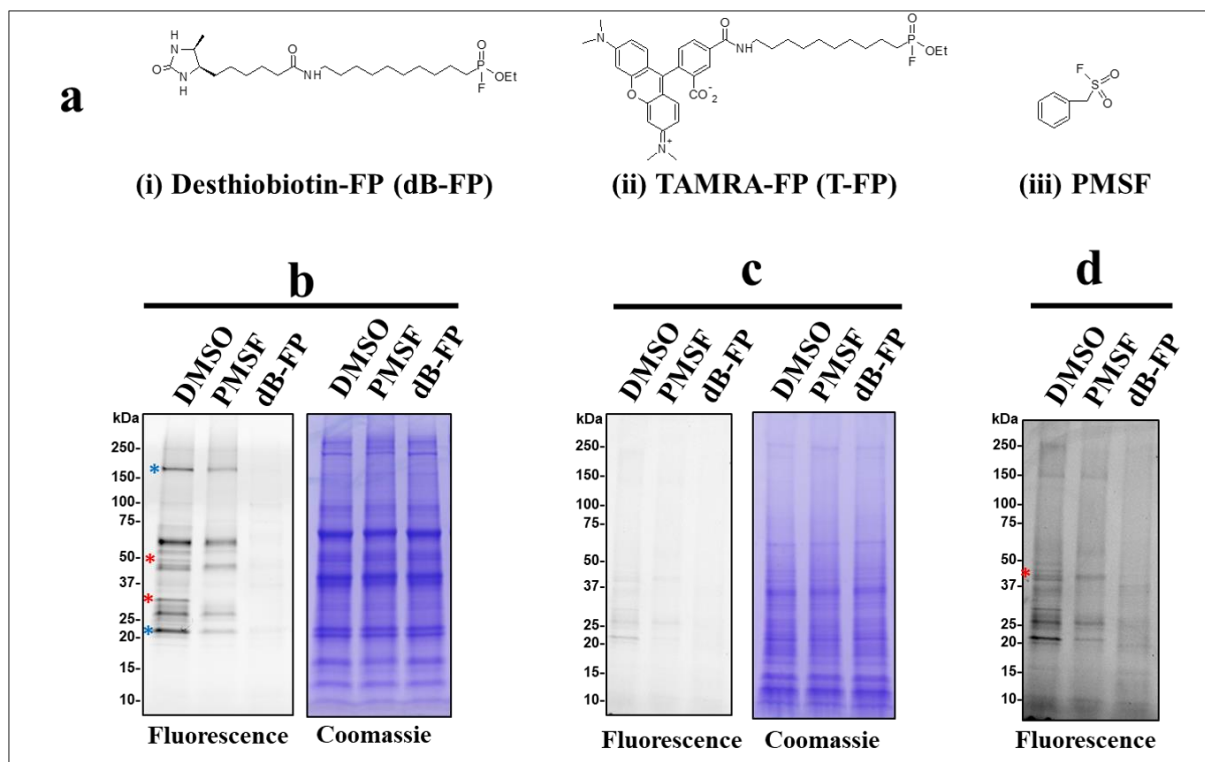


452 **Figure 2.** Disruption of the expression of three target genes (*acox1*, *17β-hsd*, *vtg 7*) revealed by
 453 qRT-PCR in zebrafish larvae exposed to solvent (DMSO control) and DBP for 5 days. The CT
 454 values of each gene of interest were normalized to the expression of the housekeeping genes
 455 (*rpl13a* and *EF1a*) by using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ⁶¹. Results are given as mean \pm standard deviation (n= 4)
 456 for each treatment group. A *t*-test was used to determine statistical differences between
 457 experimental groups and $p < 0.01$ was considered as significant. The asterisk shows a
 458 statistically significant difference ($p < 0.01$) between control and exposed larvae.



459 **Figure 3.** Schematic representation of ABPP approach used. **a)** Generic structure of an activity-
 460 based probe, having three components, i.e., the reactive group, a linker, and a reporter tag. **b)**
 461 Protein active site labelling by competitive ABPP assay (*in vitro*). For this, zebrafish proteome
 462 was pre-incubated with either inhibitor (PMSF) or DMSO, followed by labelling with TAMRA-
 463 FP (T-FP). Proteins were separated by SDS-PAGE, followed by in-gel fluorescent scanning to
 464 detect the labelled SHs. **c)** Protein active site labelling by ABPP assay (*in vivo*). Zebrafish
 465 embryos were exposed to DBP (0, 5 and 100 $\mu\text{g/L}$) for 120 h. After exposure, larvae were
 466 collected, and proteome were extracted, then SHs were labelled with desthiobiotin-FP (db-
 467 FP) probe followed by streptavidin enrichment before being analysed by gel-free LC-MS/MS.

468



469

470 **Figure 4.** On-gel fluorescence labelling of zebrafish serine hydrolases. (a) Structures of the FP
 471 probes (T-FP and dB-FP) and serine hydrolase inhibitor (PMSF) used. (b) 1 D gel visualization
 472 of the soluble protein fraction of labelled serine hydrolases. *In vitro* competitive profiling was
 473 performed by incubating the proteins at 25°C for 15 min with the competitor or DMSO (control
 474 without competitor), followed by labelling with the T-FP probe for 15 min. The competition
 475 was performed with 2 mM PMSF and 2 μM dB-FP. After the fluorescence scan, the gel was
 476 stained with Coomassie blue to visualize the protein profile (right picture). (c) competitive
 477 profiling of the membrane fraction as in (b). (d) shows the high contrast fluorescence scan of
 478 the insoluble fraction performed with ImageJ.

479

Table 1: *Danio rerio* proteins enriched by dB-FP affinity purification. For each protein identified, we have the following information: name of the gene, name of the protein, Uniprot accession, mass (kDa), fraction in which it was identified (**S** for soluble and **I** for insoluble), type of SH (**SP** for serine protease and **mSH** for metabolic serine hydrolase), unique peptides identified in each of the 4 biological replicates and in each sample (**100 µg/L DBP**, **5 µg/L DBP** and **control**) . For each sample, we have the unique peptides identified without probe (**No probe**) and those identified in the presence of probe (**dB-FP**).

Gene	Protein name	Uniprot accession	Mass (kDa)	S/I	SP/mSH	Unique Peptides					
						100 µg/L DBP		5 µg/L DBP		Control (DMSO)	
						No probe	dB-FP	No probe	dB-FP	No probe	dB-FP
<i>aadac</i>	Arylacetamide deacetylase	E7F2W1_DANRE	46,923	S	mSH	0,0,0,0	9,6,7,12	0,0,0,0	8,7,8,13	0,0,0,0	9,7,9,13
<i>abhd10a</i>	Abhydrolase domain-containing 10, depalmitoylase a	A0A0R4ILM1_DANRE	31,639	S	mSH	0,0,0,0	8,3,6,9	0,0,0,0	6,8,8,11	0,0,0,0	6,3,6,8
<i>abhd10b</i>	Transgelin 3b	E7F9Y7_DANRE	31,94	S	mSH	0,0,0,0	11,8,9,11	0,0,0,0	12,11,12,12	0,0,0,0	12,8,11,11
<i>abhd17ab</i>	Abhydrolase domain-containing 17A, depalmitoylase b	A0A2R8PY04_DANRE	32,846	S	SP	0,0,0,0	4,1,3,5	0,0,0,0	6,5,4,5	0,0,0,0	6,1,5,5
<i>abhd17b</i>	Abhydrolase domain-containing 17B, depalmitoylase (Fragment)	A3KPQ6_DANRE	32,28	S	SP	0,0,0,0	4,4,5,6	0,0,0,0	5,5,5,8	0,0,0,0	5,4,4,7
<i>abhd6a</i>	Abhydrolase domain-containing 6, acylglycerol lipase a	E7F881_DANRE	38,103	S	mSH	0,0,0,0	5,3,5,9	0,0,0,0	5,9,4,9	0,0,0,0	7,3,4,7
<i>acot14</i>	Acyl-CoA thioesterase 14	Q5RHG4_DANRE	49,161	S	mSH	0,0,0,0	4,1,3,4	0,0,0,0	4,4,4,6	0,0,0,0	3,2,3,5
<i>acot18</i>	Acyl-CoA thioesterase 18 (Fragment)	Q5RH36_DANRE	48,765	S	mSH	0,0,0,0	5,5,5,8	0,0,0,0	4,7,6,11	0,0,0,0	6,6,4,9
<i>acot20</i>	Acyl-CoA thioesterase 20	Q5SPG8_DANRE	48,601	S	mSH	0,0,0,0	10,4,10,15	0,0,0,0	9,9,13,16	0,0,0,0	8,3,8,12
<i>afmid</i>	Kynurenine formamidase (Fragment)	A0A0R4INQ3_DANRE	30,694	S	mSH	0,0,0,0	6,2,7,5	0,0,0,0	4,6,9,6	0,0,0,0	5,5,7,6
<i>apeh</i>	Acyl-peptide hydrolase	F1QTY6_DANRE	83,262	S	SP	0,0,0,0	6,3,3,6	0,0,0,0	5,6,9,9	0,0,0,0	5,3,10,7
<i>ccdc57</i>	3-hydroxyacyl-[acyl-carrier-protein] dehydratase	E7F5V3_DANRE	274,19	S	mSH	0,0,0,0	23,11,21,40	0,0,0,0	21,21,26,26	0,0,0,0	25,9,28,28
				I	mSH	0,0,0,0	7,7,5,4	0,0,0,0	6,7,10,3	0,0,0,0	7,5,6,3
<i>cel.1</i>	Carboxylic ester hydrolase	F1R1T7_DANRE	60,783	S	mSH	0,0,0,0	7,5,5,6	0,0,0,0	3,5,6,7	0,0,0,0	3,5,4,7
<i>cel.2</i>	Carboxylic ester hydrolase	F6P131_DANRE	60,555	S	mSH	0,0,0,0	5,5,4,8	0,0,0,0	4,5,6,10	0,0,0,0	2,4,6,8
<i>cela1.6</i>	Chymotrypsin-like elastase family member 1, tandem duplicate 6	A0A2R8RMN0_DANRE	29,475	S	SP	0,4,1,3	5,7,3,3	0,1,1,3	2,7,3,5	0,4,1,3	2,7,1,5
<i>ces2a</i>	Carboxylic ester hydrolase	Q1LYL6_DANRE	60,611	S	mSH	0,0,0,0	7,8,8,7	0,0,0,0	8,10,9,7	0,0,0,0	8,7,8,7
<i>ces2a</i>	Carboxylic ester hydrolase (Fragment)	Q6GMJ1_DANRE	60,634	S	mSH	0,0,0,0	4,5,7,5	0,0,0,0	6,5,8,4	0,0,0,0	7,4,5,5
<i>ces2b</i>	Carboxylic ester hydrolase	A0A0R4IMR1_DANRE	29,286	S	mSH	0,0,0,0	4,5,5,3	0,0,0,0	4,4,4,3	0,0,0,0	4,4,4,3
<i>ces2b</i>	Carboxylesterase 2b (Fragment)	A0A0R4IU19_DANRE	104,95	S	mSH	0,0,0,0	21,23,17,16	0,0,0,0	20,25,20,19	0,0,0,0	19,18,20,20
			104,95	I	mSH	0,0,0,0	4,7,3,4	0,0,0,0	1,3,7,3	0,0,0,0	5,5,3,2
<i>ces3</i>	Carboxylic ester hydrolase	A0A2R8QSI8_DANRE	59,431	S	mSH	0,0,0,0	2,2,2,2	0,0,0,0	2,2,2,2	0,0,0,0	1,2,2,2

<i>ces3</i>	Carboxylic ester hydrolase	Q1LUZ9_DANRE	60,297	S	mSH	0,0,0,0	4,3,4,4	0,0,0,0	4,3,4,4	0,0,0,0	3,2,4,4
<i>cpvl</i>	Carboxypeptidase vitellogenic-like	Q7ZU43_DANRE	54,514	S	SP	0,0,0,0	13,11,12,15	0,0,0,0	15,13,15,13	0,0,0,0	13,10,13,12
<i>ctrb1</i>	Chymotrypsinogen B1	F1QFX9_DANRE	28,245	S	SP	0,0,0,0	1,5,1,1	0,0,0,0	0,4,2,1	0,0,0,0	0,5,0,2
<i>Ctsa</i>	Carboxypeptidase	A0A0R4ILY1_DANRE	53,007	S	SP	0,0,1,1	8,5,7,6	0,0,0,1	6,7,8,6	0,0,0,0	8,5,6,5
					I	SP	0,0,0,0	4,4,3,3	0,0,0,0	3,1,2,3	0,0,0,1
<i>dpp4</i>	Dipeptidyl peptidase 4	B5DDZ4_DANRE	84,667	S	mSH	0,0,0,0	14,12,11,6	0,0,0,0	12,13,12,10	0,0,0,0	12,10,12,12
<i>dpp9</i>	Dipeptidyl-peptidase 9	A0A2R8QM73_DANRE	98,325	S	SP	0,0,0,0	18,8,13,7	0,0,0,0	17,13,18,11	0,0,0,1	16,7,17,13
					I	SP	0,0,0,0	5,6,6,4	0,0,0,0	6,4,9,6	0,0,0,0
<i>ela2</i>	Elastase 2	A0A0R4IXD6_DANRE	28,887	S	SP	0,2,0,0	3,5,1,2	0,1,0,0	0,5,2,2	0,0,0,1	0,4,1,3
<i>esd</i>	S-formylglutathione hydrolase	Q567K2_DANRE	31,171	S	SP	0,0,0,0	6,4,5,6	0,0,0,0	5,6,8,6	0,0,0,1	3,3,3,7
<i>faah</i>	Fatty acid amide hydrolase	F1RCW3_DANRE	65,153	S	SP	0,0,0,0	1,1,3,11	0,0,0,0	2,6,4,6	0,0,0,0	2,0,6,7
<i>faah2b</i>	Fatty-acid amide hydrolase 2-B	F1QM44_DANRE	57,151	S	SP	0,0,0,0	12,8,8,15	0,0,0,0	12,11,13,13	0,0,0,0	14,7,13,17
<i>fap</i>	Dipeptidyl peptidase 4	B0R1C4_DANRE	85,806	S	SP	0,0,0,0	25,28,27,23	0,0,0,0	28,34,30,28	0,0,0,0	29,25,26,29
					I	SP	0,0,0,0	9,14,15,16	0,0,0,0	12,12,14,16	0,0,0,0
<i>Lcat</i>	Lecithin-cholesterol acyltransferase	A0A0R4IDL2_DANRE	49,139	S	mSH	0,0,0,0	8,6,10,10	0,0,0,0	7,10,10,10	0,0,0,0	8,5,9,9
<i>lypla1</i>	Lysophospholipase 1	Q568J5_DANRE	21,218	S	mSH	0,0,0,0	2,1,1,4	0,0,0,0	1,3,1,4	0,0,0,0	1,2,1,4
<i>lypla2</i>	Lysophospholipase 2	Q6PBW8_DANRE	25,067	S	mSH	0,0,0,0	8,8,11,10	0,0,0,0	11,11,10,10	0,0,0,0	10,10,10,10
					I	mSH	0,0,0,0	2,2,1,1	0,0,0,0	0,1,1,0	0,0,0,0
<i>mgll</i>	Monoglyceride lipase	Q7ZWC2_DANRE	33,66	S	mSH	0,0,0,0	7,4,7,10	0,0,0,0	8,9,9,11	0,0,0,0	6,7,6,10
<i>N/A</i>	2-arachidonoylglycerol hydrolase ABHD12	A0A2R8QQD0_DANRE	40,472	S	SP	0,0,0,0	4,4,4,4	0,0,0,0	4,5,5,4	0,0,0,0	5,4,4,5
<i>nceh1b.1</i>	Neutral cholesterol ester hydrolase 1b, tandem duplicate 1	F1Q8P9_DANRE	45,39	S	mSH	0,0,0,0	7,2,5,7	0,0,0,0	5,7,8,7	0,0,0,0	3,3,4,7
<i>pla2g15</i>	Phospholipase A2, group XV (Fragment)	A0A0R4IE29_DANRE	53,521	S	mSH	0,0,0,0	1,3,5,9	0,0,0,0	2,7,7,9	0,0,0,0	2,5,4,8
<i>pla2g7</i>	Platelet-activating factor acetylhydrolase	Q5RHM0_DANRE	50,429	S	mSH	0,0,0,0	1,2,4,8	0,0,0,0	2,4,4,10	0,0,0,0	2,2,3,7
<i>ppme1</i>	Protein phosphatase methylesterase 1	Q7ZV37_DANRE	41,64	S	mSH	0,0,0,0	4,0,4,6	0,0,0,0	3,3,5,9	0,0,0,0	4,1,5,8
<i>ppt2b</i>	Novel protein similar to vertebrate palmitoyl-protein thioesterase 2 (PPT2)	A3KPZ6_DANRE	32,366	S	mSH	0,0,0,0	1,2,1,2	0,0,0,0	2,2,2,3	0,0,0,0	2,2,1,3
<i>prcp</i>	Prolylcarboxypeptidase (Angiotensinase c)	Q6DG46_DANRE	55,132	S	SP	0,0,0,0	3,0,0,5	0,0,0,0	0,2,3,4	0,0,0,0	0,0,0,5
<i>prep</i>	Prolyl endopeptidase	Q503E2_DANRE	80,336	S	SP	0,0,0,1	22,14,20,22	0,0,0,1	20,20,25,22	0,1,0,0	19,11,22,25
<i>rbbp9</i>	Retinoblastoma-binding protein 9	Q1MT41_DANRE	20,887	S	mSH	0,0,0,0	6,3,4,4	0,0,0,0	6,6,6,4	0,0,0,0	4,2,4,5
<i>si:ch211-117n7.6</i>	Si:ch211-117n7.6	A8E7H0_DANRE	38,7	S	mSH	0,0,0,0	5,2,6,8	0,0,0,0	7,9,9,8	0,0,0,0	7,3,5,8
<i>si:ch211-117n7.7</i>	Si:ch211-117n7.7	A8E7G9_DANRE	39,501	S	mSH	0,0,0,0	7,5,3,9	0,0,0,0	7,6,8,9	0,0,0,0	5,5,5,8
<i>si:ch211-122f10.4</i>	Carboxypeptidase	F1QYP6_DANRE	51,525	S	mSH	0,0,0,0	7,7,4,5	0,0,0,0	8,4,5,6	0,0,0,0	6,7,6,5

<i>si:ch211-71n6.4</i>	Carboxylic ester hydrolase	A0A0R4IYT8_DANRE	67,565	S	mSH	0,0,0,0	11,7,6,14	0,0,0,0	9,11,12,15	0,0,0,0	13,3,8,14
<i>si:ch73-89b15.3</i>	Carboxylic ester hydrolase	A0A0R4IPW5_DANRE	63,523	S	mSH	0,0,0,0	3,1,3,10	0,0,0,0	5,6,6,10	0,0,0,0	5,1,4,11
<i>si:dkey-21e2.16</i>	Si:dkey-21e2.16 (Fragment)	Q1LUQ6_DANRE	25,62	S	SP	0,0,0,0	2,2,0,3	0,0,0,0	0,4,2,4	0,0,0,0	0,2,0,3
<i>siae</i>	Sialic acid acetyltransferase	Q1LUX8_DANRE	56,624	S	SP	0,0,0,0	3,2,2,6	0,0,0,0	2,3,3,2	0,0,0,0	0,1,2,4
<i>tpp2</i>	Tripeptidyl-peptidase 2	R4GDQ0_DANRE	139,25	I	SP	0,0,0,0	8,8,7,7	0,0,0,0	11,13,17,10	0,0,0,0	20,6,8,9
<i>zgc:154142</i>	Zgc:154142	A5PKM4_DANRE	118,63	S	SP	0,0,0,0	1,1,1,2	0,0,0,0	0,7,2,4	0,0,0,0	0,3,1,3
Other proteins											
<i>cltc3</i>	Chloride intracellular channel 3	E7F4S2_DANRE	151,36	S	-	0,0,0,0	1,0,0,6	0,0,0,0	1,2,3,6	0,0,0,0	0,0,2,8
<i>a2ml</i>	Alpha-2-macroglobulin-like	A0A0R4IDD1_DANRE	159,76	S	-	0,0,0,0	11,12,9,10	0,0,0,0	5,14,11,11	0,0,0,0	5,10,4,12
<i>colq</i>	Collagen-like tail subunit (single strand of homotrimer) of asymmetric acetylcholinesterase	F1Q7Y1_DANRE	47,825	I	-	0,0,3,0	3, 5, 3, 3	0,0,0,0	3, 4, 4, 3	1,0,1,0	4,3,2,3

1 Supplementary material and methods

2 **Chemicals and reagents.** Dibutyl phthalate (cat n°524980), Dimethyl sulfoxide (cat n°D4540),
 3 Phosphate buffered saline (cat n°P4417), Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride (cat
 4 n°75259), Phenylmethanesulfonyl fluoride (cat n°P7626) were purchased from Sigma Aldrich.
 5 ActivX Desthiobiotin-FP Serine Hydrolase Probe (cat n°88317), ActivX TAMRA-FP Serine
 6 Hydrolase Probe (cat n°88318), Halt™ phosphatase inhibitor cocktail (cat n°78420),
 7 Dynabeads™ MyOne™ Streptavidine C1 (cat n°65001) and Pierce™ Rapid Gold BCA Protein
 8 Assay kit (cat n°A53225) were purchased from Thermo Fisher Scientific, and Acetone (cat
 9 n°412502) was from Carlo Erba reagents.

10 **Total RNA extraction and reverse transcription.** Total RNAs from zebrafish larvae were
 11 extracted with the QIAGEN® RNeasy kit according to the supplier's instructions. RNA purity
 12 and quantity were assessed by spectrophotometry (260 nm and ratio 260/280 and 260/230) and
 13 RNA integrity was checked using Bioanalyser 2100 (Agilent, CA, USA). Reverse transcription
 14 (RT) was performed with 1 µg of total RNA using SuperScript® IV Reverse Transcriptase from
 15 Invitrogen (Life Science). The generated cDNAs were stored at -20°C until use. The choice of
 16 target genes was based on data from the literature. In total, 2 household genes and 3 genes of
 17 interest were chosen. The genes of interest were those whose expression were reported to be
 18 altered in the presence of a phthalate-type EDC. These are vitellogenin (*vtg*)^{1,2}, 17β-
 19 hydroxysteroid dehydrogenase (*17 b-hsd*)², Acyl-coenzyme-A-oxidase (*acox-1*)³. For the
 20 standardization of the results, 2 household genes were selected: ribosomal protein L13a
 21 (*rpl13a*) and elongation factor 1α (*ef1α*)⁴. The specific primer sequences (see below) were
 22 extracted from the literature for some genes, while for others, the primers were designed with
 23 the bioinformatics tools Beacon Designer™ (Premier Biosoft) and Primer3Plus. The PCR
 24 efficiency tests were carried out on the pairs of primers (2,5 µM) before use, and were between
 25 94% and 105%. Hybridization/amplification were performed at 60°C for 1 min × 40 cycles.
 26 The CT values of each gene of interest were normalized against the expression of the
 27 housekeeping genes *rpl13a* and *ef1α* (geometric means of CT). Relative quantification was
 28 performed using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method⁵ and standard deviation was calculated between four
 29 biological replicates.

30 Primer sequences of genes tested in this study.

Genes	Primers (5' – 3')	Amplicon (pb)
Elongation factor 1 alpha (<i>ef1-α</i>) ⁴	Foward : TACAAATGCGGTGGAATCGAC Reverse : GTCAGCCTGAGAAGTACCACT	248
Ribosomal protein L 13a (<i>rpl13a</i>) ⁴	Foward : TCTGGAGGACTGTAAGAGGTATGC Reverse : AGACGCACAATCTTGAGAGCAG	149
Vitellogenin (<i>vtg7</i>) ¹	Foward : GCCAAAAAGCTGGGTAAACA Reverse : AGTTCCTGCTGGATTGATGG	210
Acyl-coenzyme-A-oxidase 1 (<i>acox-1</i>)	Foward : TCCATGAGTCCCACAACAAG Reverse : CCTTTCTTCCCCTTTCTTGC	75
17β-hydroxysteroid dehydrogenase (<i>17b-HSD 12a</i>)	Foward : ACCAGACCAACGGCTATTTTC Reverse : ATCGCAGTTTTCTCCTCCTG	141

31

32 **Measurement of AChE enzymatic activities.** AChE activity was measured according to the
33 method of Ellman et al. (1961)⁶ adapted for measurement in a 96-well plate. The reaction
34 medium consists of 180 μ L of 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid, DTNB) solution (0.355 mM,
35 0.1 M phosphate buffer pH 7.5), 10 μ L of acetylcholine iodide (9.54 mM) and 10 μ L of protein
36 sample. The reaction rate was measured in triplicate for each sample at 405 nm for 3 minutes
37 (one measurement every 30 seconds). The relative enzymatic activity was calculated
38 considering the control sample (DMSO) as a reference.

39 **Labelling with dB-FP and affinity purification.** The ActivX Desthiobiotin-FP (dB-FP) probe
40 was used for labelling and affinity purification of zebrafish proteome (from soluble and
41 insoluble fractions). For each affinity purification with dB-FP, the same starting protein amount
42 was used, *i.e.* 650 μ g for the soluble fraction and 150 μ g for the insoluble fraction, due to the
43 small number of organisms used for the exposure experiments. Briefly, the proteins were
44 incubated with 2 μ M dB-FP (in 2 % DMSO v/v) or 2% DMSO (no-probe control) at 25°C for
45 60 minutes with occasional gentle mixing. The proteins were then denatured with 0.5% w/v
46 SDS at 95°C for 5 minutes, then allowed to cool down to room temperature before being
47 precipitated with cold acetone to remove excess probe. Precipitation was performed by adding
48 4 volumes of cold acetone to each sample and then incubated at -20°C for 60 minutes. The
49 samples were then centrifuged at maximum speed (21000 x g) for 10 minutes at 4°C. Pellets
50 were taken up with PBS containing 0.05% w/v SDS, 1 mL for the soluble fraction and 300 μ L
51 for the insoluble (membrane) fraction. Streptavidin beads (DynabeadsTM MyOneTM
52 Streptavidin C1) were washed (3 times with PBS, 150 mM NaCl) and then added to the soluble
53 (50 μ L) and insoluble (10 μ L) denatured samples. They were then incubated overnight at 4°C
54 and 6 rpm on an orbital shaker (Hula-Mixer, Invitrogen Thermo Fisher). The paramagnetic
55 beads were washed twice with the washing solution (PBS, 150 mM NaCl) and one last time
56 with PBS. Protein targets attached to the beads were eluted by heating the beads at 95°C for 5
57 minutes with an eluting solution (50 mM Tris-HCl pH 8.5, 2% w/v SDS and 10 mM TCEP).
58 The eluted enzyme targets were stored at -20°C until analysis by mass spectrometry at the
59 Proteom'IC core facility.

60 **Mass spectrometry**

61 **LC-MS/MS sample preparation.** The eluted proteins were digested by “Strap” Micro Spin
62 Column (from ProtiFi) using 1 μ g trypsin (sequencing-grade from Promega) mostly according
63 to manufacturer’s instruction with modifications: The totality of the sample was denatured v/v
64 with a solution containing 4% w/v SDS (GE Healthcare), 400 mM TEAB (Sigma Aldrich), 20
65 mM TCEP (Sigma Aldrich) and 100 mM Chloro-acetamide (Fluka) for 5 min at 95°C. The
66 samples were acidified with 12% phosphoric acid at 1:10 (acid : protein volume ratio). 6
67 volumes of Strap Binding Buffer (90% v/v Methanol, 100 mM TEAB) were added. The
68 resulting protein suspension was transferred to the Strap filter. After centrifugation and wash
69 with the same buffer, the filter was incubated with 1 μ g of Trypsin in 100 μ L of 50 mM TEAB
70 at 37°C overnight. Resulting peptides were dried by speed-vacuum (speed-vac.from
71 Eppendorf), then solubilized in 10 μ L of 0.1% v/v TFA containing 10 % v/v acetonitrile (ACN).

72 **Liquid Chromatography-coupled Mass spectrometry analysis (LC-MS).** Analyses were
73 performed on a Dionex U3000 RSLC nano-LC- system (Thermo Fisher scientific) coupled to
74 a TIMS-TOF Pro mass spectrometer (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany). One μ L was
75 loaded, concentrated and washed for 3 min on a C₁₈ reverse phase precolumn (3 μ m particle

76 size, 100 Å pore size, 75 µm inner diameter, 2 cm length, from Thermo Fisher Scientific).
77 Peptides were separated on an Aurora C₁₈ reverse phase resin (1.6 µm particle size, 100Å pore
78 size, 75 µm inner diameter, 25 cm length mounted to the Captive nanoSpray Ionisation module,
79 (IonOpticks, Middle Camberwell Australia) in a 60 min. run time with a gradient ranging from
80 99% of solvent A containing (v/v) 0.1% formic acid in milliQ-grade H₂O to 40% of solvent B
81 containing 80% acetonitrile, 0.085% formic acid in mQH₂O. The mass spectrometer acquired
82 data throughout the elution process and operated in DDA PASEF mode with a 1.1 s./cycle, with
83 Timed Ion Mobility Spectrometry (TIMS) mode enabled and a data-dependent scheme with full
84 MS scans in PASEF mode. This enabled a recurrent loop analysis of a maximum of the 120
85 most intense nLC-eluting peptides which were CID-fragmented between each full scan every
86 1.1 s. Ion accumulation and ramp time in the dual TIMS analyzer were set to 50 ms each and
87 the ion mobility range was set from $1/K0 = 0.6 \text{ Vs cm}^{-2}$ to 1.6 Vs cm^{-2} . Precursor ions for
88 MS/MS analysis were isolated in positive mode with the PASEF mode set to « on » in the 100-
89 1.700 m/z range by synchronizing quadrupole switching events with the precursor elution
90 profile from the TIMS device. The cycle duty time was set to 100%, accommodating as many
91 MS/MS in the PASEF frame as possible. Singly charged precursor ions were excluded from the
92 TIMS stage by tuning the TIMS using the otof control software, (Bruker Daltonik GmbH).
93 Precursors for MS/MS were picked from an intensity threshold of 2.500 arbitrary units (a.u.)
94 and refragmented and summed until reaching a ‘target value’ of 20.000 a.u taking into account
95 a dynamic exclusion of 0.40 s elution gap.

96 Samples from each of the three treatments (DMSO control, 5 and 100 µg/L DBP) were analyzed
97 to identify and quantify the SHs by LC-MS/MS. Proteins of interest were identified with high
98 confidence based on the following criteria:

- 99 - (1) Absent in no probe (DMSO) samples and present in labelled samples with probe
100 (dB-FP), (2) in labelled samples with probe (dB-FP), presence in at least 3 out of 4
101 replicates i.e. present in 2 of 4 replicates with at least 2 unique peptides and at least 1
102 unique peptide in a third replicate.
- 103 - When proteins are present in no-probe samples, (3) a significant difference $p < 0.05$ (t -
104 test)* between labelled samples with probe (dB-FP) and no-probe (DMSO) samples,
105 (4) an abundance of at least 2 times higher in labelled samples with probe than in no-
106 probe (DMSO) samples.

107 *Log₂ LFQ were used for comparison with t-test.

108 **Protein quantification and data analysis.** The mass spectrometry data were analyzed using
109 Maxquant version 1.6.17⁷. The database used was a concatenation of Danio rerio sequences
110 from the Uniprot databases (release 2021-04) and a list of contaminant sequences from
111 Maxquant. The enzyme specificity was trypsin's. The precursor's and fragment's mass
112 tolerances were set to 20ppm. Carbamidomethylation of cysteins was set as permanent
113 modification and acetylation of protein N-terminus and oxidation of methionines were set as
114 variable modifications. Second peptide search was allowed and minimal length of peptides was
115 set at 7 amino acids. False discovery rate (FDR) was kept below 1% on both peptides and
116 proteins. Label-free protein quantification (LFQ) was done using both unique and razor
117 peptides. At least 2 such peptides were required for LFQ. The “match between runs” (MBR)
118 option wasn't allowed and the normalisation was skipped. For differential analysis, LFQ results
119 from MaxQuant were imported into the Perseus software (version 1.6.15)⁸. Reverse and

120 contaminant proteins were excluded from analysis. The data were transformed to log₂. The
121 number of Valid Value per condition (T, C5, C100) was calculated.

122 **Statistical analyses.** All data were analysed using the *t*-test to determine statistical differences
123 between experimental groups. The *p*-values < 0.05 were considered significant for all statistical
124 analyses.

125 **References**

- 126 1. Maradonna F, Evangelisti M, Gioacchini G, et al. Assay of Vtg, ERs and PPARs as
127 Endpoint for the Rapid in Vitro Screening of the Harmful Effect of Di-(2-Ethylhexyl)-
128 Phthalate (DEHP) and Phthalic Acid (PA) in Zebrafish Primary Hepatocyte Cultures.
129 *Toxicology in Vitro* 2013;27(1):84–91; doi: 10.1016/j.tiv.2012.09.018.
- 130 2. Zhu Y, Hua R, Zhou Y, et al. Chronic Exposure to Mono-(2-Ethylhexyl)-Phthalate
131 Causes Endocrine Disruption and Reproductive Dysfunction in Zebrafish. *Environmental*
132 *Toxicology and Chemistry* 2016;35(8):2117–2124; doi: 10.1002/etc.3369.
- 133 3. Uren-Webster TM, Lewis C, Filby AL, et al. Mechanisms of Toxicity of Di(2-
134 Ethylhexyl) Phthalate on the Reproductive Health of Male Zebrafish. *Aquatic Toxicology*
135 2010;99(3):360–369; doi: 10.1016/j.aquatox.2010.05.015.
- 136 4. Lang X, Wang L and Zhang Z. Stability Evaluation of Reference Genes for Real-Time
137 PCR in Zebrafish (*Danio Rerio*) Exposed to Cadmium Chloride and Subsequently Infected by
138 Bacteria *Aeromonas Hydrophila*. *Aquatic Toxicology* 2016;170:240–250; doi:
139 10.1016/j.aquatox.2015.11.029.
- 140 5. Livak KJ and Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-
141 Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* 2001;25(4):402–408; doi:
142 10.1006/meth.2001.1262.
- 143 6. Ellman GL, Courtney KD, Andres V, et al. A New and Rapid Colorimetric
144 Determination of Acetylcholinesterase Activity. *Biochemical Pharmacology* 1961;7(2):88–95;
145 doi: 10.1016/0006-2952(61)90145-9.
- 146 7. Tyanova S, Temu T, Carlson A, et al. Visualization of LC-MS/MS Proteomics Data in
147 MaxQuant. *Proteomics* 2015;15(8):1453–1456; doi: 10.1002/pmic.201400449.
- 148 8. Tyanova S, Temu T, Sinitcyn P, et al. The Perseus Computational Platform for
149 Comprehensive Analysis of (Prote)Omics Data. *Nat Methods* 2016;13(9):731–740; doi:
150 10.1038/nmeth.3901.

151