



(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 2003/05/27

(87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 2003/12/11

(45) Date de délivrance/Issue Date: 2013/12/03

(85) Entrée phase nationale/National Entry: 2004/11/29

(86) N° demande PCT/PCT Application No.: FR 2003/001598

(87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 2003/102176

(30) Priorité/Priority: 2002/05/30 (FR02/06669)

(51) Cl.Int./Int.Cl. *C12N 15/00* (2006.01),
A01K 67/027 (2006.01), *C12N 15/85* (2006.01),
C12N 5/10 (2006.01), *G01N 33/50* (2006.01)

(72) Inventeurs/Inventors:
DEMENEIX, BARBARA, FR;
TURQUE, NATHALIE, FR

(73) Propriétaires/Owners:
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (CNRS), FR;
MUSEUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE, FR

(74) Agent: ROBIC

(54) Titre : EMBRYONS TRANSGENIQUES DE XENOPE ET LEURS UTILISATIONS POUR LA DETECTION DE
PERTURBATEURS ENDOCRINIENS DANS L'ENVIRONNEMENT

(54) Title: TRANSGENIC CLAWED FROG EMBRYOS AND USE THEREOF AS DETECTORS OF ENDOCRINE
DISRUPTERS IN THE ENVIRONMENT



(57) Abrégé/Abstract:

La présente invention concerne des animaux aquatiques transgéniques, notamment le xénope et le poisson zèbre, et les cellules dérivées de ceux-ci, caractérisé en ce qu'ils comprennent au moins une cassette d'expression comprenant une séquence d'ADN régulatrice sélectionnée parmi les éléments de réponse aux récepteurs nucléaires d'hormones, notamment le TRE, liée de manière opérationnelle en amont d'un segment d'ADN codant pour une protéine rapporteuse, tels la luciférase ou l'eGFP. L'invention concerne également des procédés mettant en oeuvre les cellules et animaux transgéniques de l'invention et destinés à identifier la présence de perturbateurs endocriniens dans l'environnement.

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international(43) Date de la publication internationale
11 décembre 2003 (11.12.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 03/102176 A1(51) Classification internationale des brevets⁷ :
C12N 15/00, A01K 67/027,
C12N 15/85, G01N 33/50, C12N 5/10(74) Mandataires : MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet
Regimbeau, 20, rue de Chazelles, F-75847 Paris Cedex 17
(FR).(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR03/01598(81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) Date de dépôt international : 27 mai 2003 (27.05.2003)

(25) Langue de dépôt : français

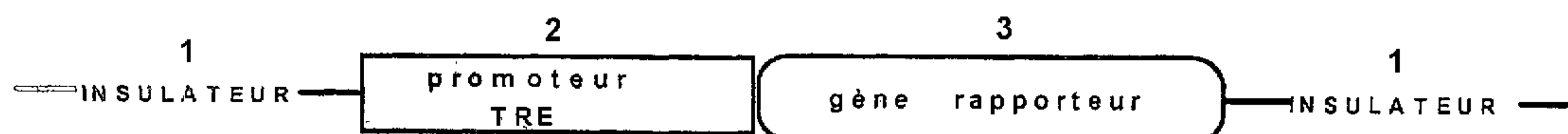
(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
02/06669 30 mai 2002 (30.05.2002) FR(84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,
TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*) :
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCI-
ENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange,
F-75016 Paris (FR).

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) :
DEMENEIX, Barbara [FR/FR]; 69, rue Broca, F-75013
Paris (FR). TURQUE, Nathalie [FR/FR]; 106, rue de
l'Université, F-75007 Paris (FR).En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abrégiactions" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.(54) Title: TRANSGENIC CLAWED FROG EMBRYOS AND USE THEREOF AS DETECTORS OF ENDOCRINE
DISRUPTERS IN THE ENVIRONMENT(54) Titre : EMBRYONS TRANSGENIQUES DE XENOPE ET LEURS UTILISATIONS POUR LA DETECTION DE PERTUR-
BATEURS ENDOCRINIENS DAN L'ENVIRONNEMENT1...ISOLATOR
2...PROMOTER
3...MARKER GENE

(57) Abstract: The invention relates to transgenic aquatic animals, particularly the clawed frog and the zebra fish and cells derived therefrom, characterised in comprising at least one expression cassette with a regulatory DNA sequence selected from the response elements to nuclear hormone receptors, particularly TRE, connected in a functional manner downstream of a DNA segment coding for a marker protein such as luciferase or GFP. The invention further relates to methods using the transgenic cells and animals according to the invention for the identification of endocrine disrupters in the environment.

(57) Abrégé : La présente invention concerne des animaux aquatiques transgéniques, notamment le xénope et le poisson zèbre, et les cellules dérivées de ceux-ci, caractérisé en ce qu'ils comprennent au moins une cassette d'expression comprenant une séquence d'ADN régulatrice sélectionnée parmi les éléments de réponse aux récepteurs nucléaires d'hormones, notamment le TRE, liée de manière opérationnelle en amont d'un segment d'ADN codant pour une protéine rapporteuse, tels la luciférase ou l'eGFP. L'invention concerne également des procédés mettant en oeuvre les cellules et animaux transgéniques de l'invention et destinés à identifier la présence de perturbateurs endocriniens dans l'environnement.



WO 03/102176 A1

EMBRYONS TRANSGENIQUES DE XENOPE ET LEURS UTILISATIONS POUR LA DETECTION DE PERTURBATEURS ENDOCRINIENS DANS L'ENVIRONNEMENT

5 La présente invention se rapporte au domaine de la
biologie, et plus particulièrement de la transgénèse
animale. Plus particulièrement la présente invention se
rapporte à des grenouilles transgéniques, notamment au
stade têtard, ou les cellules dérivées de ceux-ci, ainsi
10 que leur mise en œuvre dans des procédés destinés à
identifier la présence de perturbateurs endocriniens
dans l'environnement, tels que les molécules agonistes
ou antagonistes de récepteurs nucléaires.

 Une grande variété de composés chimiques diffuse
15 largement dans le milieu naturel. Parmi ceux-ci,
nombreux sont ceux qui ont des effets de type hormonal
indésirables du fait de leurs propriétés physio-
chimiques. La présence de polluants hormonaux dans les
eaux naturelles est ainsi révélée par l'observation de
20 problèmes de fertilité chez différentes espèces
aquatiques. De fait, plusieurs voies de recherches
actuelles confirment la présence de perturbateurs
endocriniens dans notre environnement.

 Les substances perturbatrices du système endocrinien
25 miment les effets biologiques de facteurs hormonaux
(oestrogènes, androgènes et hormones thyroïdiennes) qui
régulent finement de nombreuses fonctions telles que les
fonctions d'homéostasie, de reproduction, de
développement ou de comportement. Ces substances
30 d'origine naturelle ou de synthèse, sont en fait

reconnues par un organisme vivant comme des facteurs moléculaires intervenant dans les processus régulés par les hormones et interfèrent donc avec l'action des hormones.

5 La présence répandue de ces facteurs provoque l'attention des autorités gouvernementales à travers le monde et la nécessité pour les grandes entreprises de prendre en compte l'impact environnemental de leurs activités. En réponse à ces problèmes, il est
10 nécessaire, voire stipulé légalement de tester tout produit chimique ou rejet industriel du point de vue de leurs activités hormonales.

Il est donc crucial de mettre en place une expertise fiable, basée sur la production de modèles intégrés,
15 donnant des résultats sensibles, rapides, quantifiables, spécifiques des tissus et possédant une grande souplesse d'utilisation, de détection des perturbateurs endocriniens environnementaux. C'est le problème que se propose de résoudre la présente invention en fournissant
20 des organismes aquatiques transgéniques de préférence au stade embryonnaire et donc transparent dans les cellules desquels l'expression d'une protéine rapporteuse est modulée de manière fine par la présence de facteurs perturbateurs de la fonction hormonale. En outre, la
25 présente invention permet par la combinaison de plusieurs protéines rapporteuses, de préférence fluorescentes, de mesurer simultanément et de façon précoce dans le même animal différents polluants. Selon la construction génique utilisée, il est également

possible de déceler des effets spécifiques d'un tissu (effets neurotoxiques, effets hépato-toxiques,...).

La présente invention concerne donc une cellule transgénique d'animal aquatique sélectionné parmi les
5 amphibiens et les téléostes comprenant au moins une cassette d'expression, la dite cassette comprenant une séquence d'ADN régulatrice, de préférence de vertébrés, sélectionnée parmi les éléments de réponse aux récepteurs nucléaires d'hormones, liée de manière
10 opérationnelle en amont d'un segment d'ADN codant pour une protéine rapporteuse, et facultativement un signal de polyadénylation et facultativement une séquence "insulateur" à chaque extrémité de la dite cassette. Selon un mode de réalisation, ladite cassette comprend
15 en outre une séquence promotrice minimale.

Au sens de la présente invention, on entend désigner par transgénique une cellule, ou un animal comportant au moins une cellule, comportant un transgène. On entend désigner par « transgène » ou par
20 « séquence d'acides nucléiques exogène », ou par « gène exogène », ou par "cassette d'expression", termes qui seront indifféremment employés dans la présente demande, du matériel génétique qui a été ou qui va être inséré artificiellement dans le génome d'un animal,
25 particulièrement dans une cellule d'animal cultivée *in vitro* ou dans une cellule d'animal vivant, ou qui va se maintenir dans la dite cellule sous forme épisomale. De manière préférée, le transgène selon la présente invention comprend au moins une séquence susceptible

d'être transcrite ou transcrite et traduite en protéine.

De préférence, mais de manière non exhaustive, les éléments de réponse aux récepteurs nucléaires d'hormones sont choisis parmi l'élément de réponse aux oestrogènes (ERE) (Mader *et al.* 1993), l'élément de réponse aux hormones thyroïdiennes (TRE) l'élément de réponse aux glucocorticoides (GRE) et l'élément de réponse aux minéralocorticoides (MRE) (Kolla *et al.* 1999), l'élément de réponse à la progestérone (PRE) (Hecht *et al.* 1988), l'élément de réponse à la vitamine D (DRE) (Kitazawa *et al.* 2002).

Selon un premier mode préféré de réalisation de l'invention, l'élément de réponse aux récepteurs nucléaires d'hormones est le TRE. Différentes séquences régulatrices contenant des TRE peuvent être utilisées dans la présente invention. Par exemple, la séquence TRE de l'enzyme malique de rat (Seq ID N°1), la séquence TRE consensuelle DR4 en un exemplaire (Seq ID N°5 ; Seq ID N°6), la séquence TRE consensuelle en triple exemplaire (DR4)X3, les séquences DR4 étant espacées de 4 nucléotides. Selon un second mode préféré de réalisation de l'invention, l'élément de réponse aux récepteurs nucléaires d'hormones est le ERE.

Par séquence régulatrice ou éléments de régulation de l'expression du gène, on entend désigner toutes les séquences d'ADN impliquées dans la régulation de l'expression génique c'est-à-dire essentiellement les séquences régulatrices de la transcription, de l'épissage, de la traduction. Parmi les séquences d'ADN

régulatrices de la transcription, il convient de citer la séquence promotrice minimale, les séquences amonts (par exemple, les éléments de réponse aux récepteurs nucléaires d'hormones tels TRE, ERE, GRE,...), les 5 séquences activatrices (« enhancers »), éventuellement les séquences inhibitrices (« silencers »), les séquences insulateurs (« insulator »), telles les MAR (Matrix Attachment Region) (Seq ID N°10, N°11), les séquences d'épissage. La séquence d'ADN régulatrice 10 selon l'invention est de préférence une séquence de vertébrés, de manière préférée une séquence de xénope ou de téléostes, et de manière plus préférée une séquence humaine.

Ces séquences de régulation de l'expression sont 15 liées de manière opérationnelle au(x) gène(s) rapporteur(s). Une séquence nucléique est « liée de manière opérationnelle » lorsqu'elle est placée dans une relation fonctionnelle avec une autre séquence d'acide nucléique. Par exemple, un promoteur ou une 20 séquence régulatrice amont est liée de manière opérationnelle à une séquence codante, s'il module ou affecte la transcription de ladite séquence codante. Concernant les séquences régulatrices de la transcription, « lié de manière opérationnelle » 25 signifie que les séquences d'ADN liées sont contiguës, et lorsqu'il s'agit de lier deux régions codantes pour des protéines, contiguës et en phase de lecture.

Par séquence promotrice minimale, on entend désigner un promoteur qui dépourvu de ses séquences 30 régulatrices amonts est capable d'induire la

transcription du gène, auquel elle est opérationnellement liée à un niveau basal. A titre d'exemple de promoteur minimal, il convient de citer le promoteur du gène de la thymidine kinase du virus de l'herpès simple, le promoteur du cytomégalovirus simien (simian CMV IE94), le promoteur Elb d'adénovirus (Argenton *et al.* 1996).

Les séquences promotrices et régulatrices selon l'invention sont définies en fonction du profil d'expression désiré de la protéine rapporteuse. De préférence, le gène rapporteur est placé sous le contrôle d'éléments d'expression tissus-spécifiques ou cellules-spécifiques ou ubiquitaires.

Les éléments d'expression tissus-spécifiques ou promoteurs tissus-spécifiques sont choisis parmi les promoteurs qui permettent d'obtenir une expression spécifique, et de préférence forte, dans une ou plusieurs cellule(s), tissu(s), type(s) cellulaire(s), ou organe(s) de l'animal aquatique selon l'invention. Ces promoteurs peuvent être ou non hétérologues à l'organisme et être naturellement présents ou non dans le génome de l'organisme. Les promoteurs tissus-spécifiques selon l'invention sont de préférence choisis parmi les séquences qui dirigent l'expression dans le foie, le système nerveux central, notamment l'hypothalamus, et les ostéoblastes. L'expression dans le foie étant particulièrement intéressante étant donné que les polluants environnementaux se trouvant concentrés dans cet organe de détoxification. A ce propos, on peut citer les promoteurs des gènes :

- de la vitellogénine, CYP26, CYP3A qui dirigent l'expression du gène dans le foie. Le promoteur du gène de la vitellogénine de xénope et de poulet est un exemple de promoteur tissu-spécifique.
5 L'expression de ce gène dans le foie est induite par les oestrogènes. Le gène de la vitellogénine A2 de xénope contient un élément de réponse aux oestrogènes compris entre -331 et -319. Le gène de la vitellogénine de poulet contient différents éléments
10 de réponse aux hormones telles les glucocorticoides, les oestrogènes et les progestines situés entre -721 et -591 pb.
- le promoteur de stromélysine 3 qui code un enzyme participant au remodelage de la matrice
15 extracellulaire s'exprimant dans les bourgeons de membres, l'intestin au cours de la métamorphose, dans certains tissus en remodelage (Ishizuya-Oka et al. 1996).
- de la vasopressine, BTEB, TH/bZIP qui dirige
20 l'expression du gène dans le cerveau. La vasopressine est une hormone neuro-hypophysaire impliquée dans le métabolisme de l'eau et la régulation de la pression sanguine ; elle est également impliquée dans la neurotransmission et la neuro-modulation dans le
25 système nerveux central. L'expression de ce gène est régulée par les oestrogènes et la testostérone. La séquence promotrice de la vasopressine de rat contient deux éléments de réponse aux oestrogènes (ERE) situés dans un fragment distal de 1,5 kbp
30 (Shapiro et al., 2000). Le promoteur du gène BTEB

(Basic Transcription Element-Binding) constitue un autre exemple de promoteur tissu-spécifique (Denvers et al., 1997). Le gène BTEB s'exprime dans le cerveau et son expression est induite par l'hormone thyroïdienne T3 in vivo (Denvers et al., 1999). Une partie du promoteur du gène BTEB de xénope a été cloné (Brown et al., 1996). Un autre exemple de promoteur tissu-spécifique est constitué par le promoteur (Seq ID N°12) du gène TH/bZIP qui code pour un facteur de transcription à domaines basiques et leucine zipper (Wang et al., 1993). L'expression du gène TH/bZIP est effectivement régulée par les hormones thyroïdiennes exogènes et au moment de la métamorphose du xénope qui est un processus dépendant des hormones thyroïdiennes (Furlow et al., 1999). La portion de promoteur du gène TH/bZIP comprise entre -246 pb et +130 pb contient deux TRE (Seq ID N°2 et N°3).

- Cbfl qui code un facteur de transcription spécifiquement exprimé dans les ostéoblastes (Kasenty et al., 2000). L'expression de ce facteur qui joue un rôle déterminant dans la différenciation et la fonction des ostéoblastes, est induite par les oestrogènes et son promoteur contient un ERE.

25

Dans le cadre d'une cellule ou d'un animal multi-transgénique selon l'invention il est possible d'analyser simultanément une régulation positive ou négative de l'expression du gène rapporteur. Par exemple, le promoteur de la TSH (Thyroid stimulating

30

hormone) en amont de la GFP est régulé positivement par l'hormone T3, alors que le promoteur de la TRH (Thyrotropin releasing hormone) est régulé négativement par la T3. Ainsi une cellule comprenant les cassettes d'expression « promoteur de la TSH/GFP » et « promoteur de la TRH/RFP » permettrait d'identifier ou de cribler des composés agissant positivement ou négativement sur l'expression génique.

10 L'article de Metzger et Feil (1999) donne à titre d'exemple non limitatif (cf. tableau page 471) une liste de promoteurs tissus-spécifiques susceptibles d'être utilisés pour diriger l'expression de la protéine rapporteuse dans différents tissus. Les

15 promoteurs tissus-spécifiques sont d'une manière plus générale choisis parmi ceux qui dirigent l'expression de la protéine rapporteuse dans un système physiologique, un organe, un tissu, un type cellulaire, ou une cellule particulière, parmi lesquels il convient

20 de citer de manière non exhaustive le système nerveux en général, et notamment le cerveau, le cervelet, les neurones, les motoneurones, les cellules gliales, les cellules de Schwann, l'hypophyse, l'hypothalamus, la glande pituitaire, l'hippocampe et le cortex, le cœur,

25 les cardiomyocytes ventriculaires et les cardiomyocytes auriculaires, les poumons, les os, les yeux et plus particulièrement la rétine et le cristallin, la peau et plus particulièrement le derme et l'épiderme, les muscles, et plus particulièrement les muscles

30 squelettiques, le muscle cardiaque, les muscles lisses,

la glande mammaire, les gonades et plus particulièrement les testicules, les ovaires, les cellules germinales, les ovocytes, les ovogonies, les spermatozoïdes, les spermatogonies et les spermatoocytes, le rein, le foie et notamment les hépatocytes, la rate, le pancréas et notamment les cellules de Langerhans et les cellules β , la langue, l'œsophage, le tissu adipeux, les cellules endothéliales.

10 Les éléments d'expression ubiquitaire ou promoteurs ubiquitaires sont choisis parmi les promoteurs qui permettent d'obtenir une expression, de préférence forte, dans l'ensemble, ou pour le moins dans une grande proportion d'organes, ou de tissus de l'organisme selon l'invention. Ces promoteurs peuvent être hétérologues ou non à l'organisme selon l'invention. A titre d'exemple non limitatif de promoteurs ubiquitaires, on peut citer le promoteur du cytomégalovirus (CMV) (Schmidt et al., 1990) et le promoteur inductible par l'interféron (Mx1) (Hug et al., 1998; Arnheiter et al., 1990). En outre, les éléments d'expression, ou promoteurs selon l'invention, peuvent assurer un contrôle constitutif ou inductible de l'expression du gène de fusion. Parmi les éléments assurant une expression inductible, il convient de citer les promoteurs eucaryotiques inductibles par les métaux lourds (Mayo et al., 1982; Brinster et al., 1982; Seark et al., 1985), par un choc thermique (Nover et al., 1991), par les hormones (Lee et al., 1981; Hynes et al., 1981; Klock et al., 1987; Israel et al.,

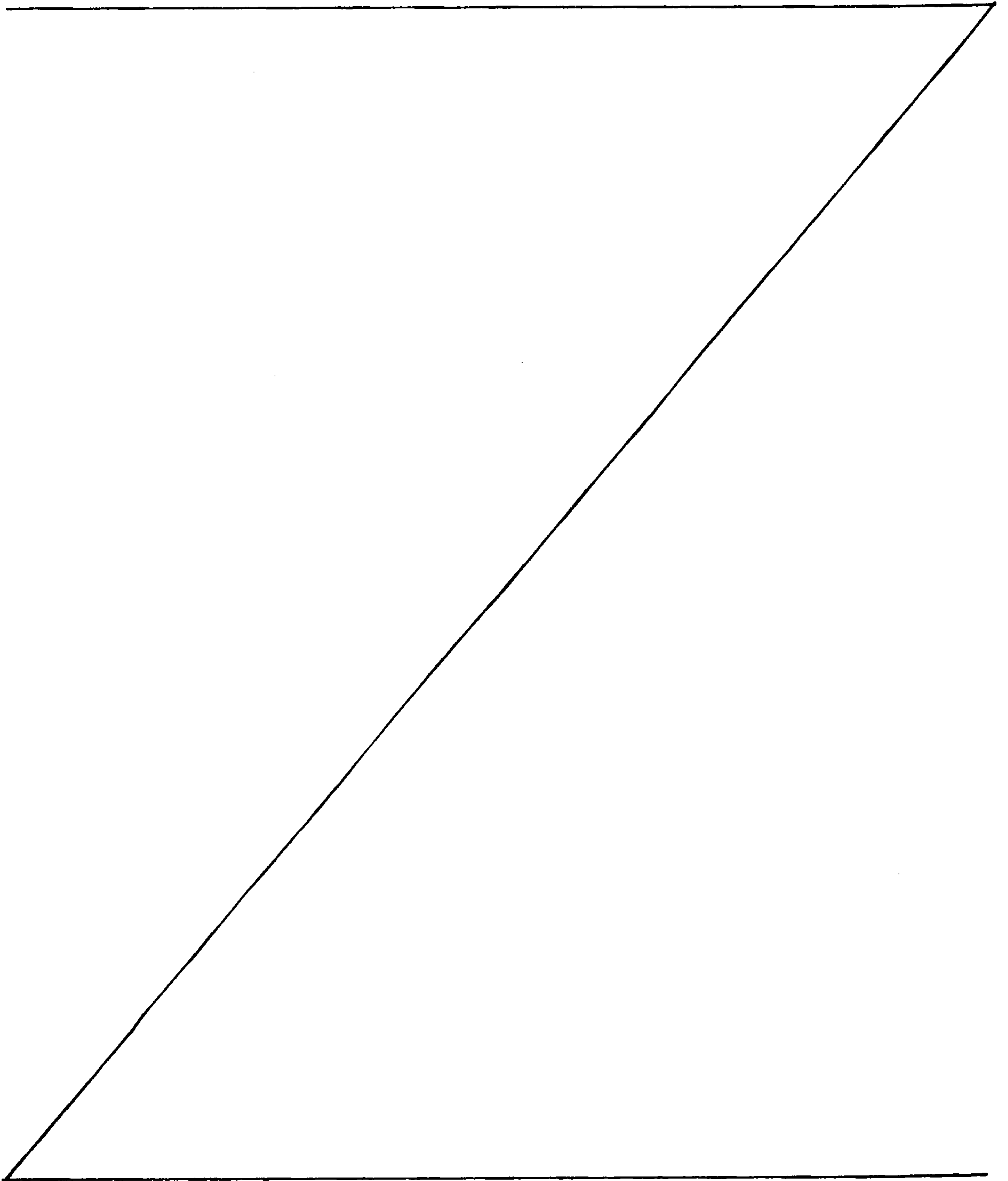
1989), par l'interféron (Hug et al., 1998); Arnheiter et al., 1990). Il convient également de citer les éléments d'expression procaryotiques inductibles tels que le système répresseur Lac (LacR/opérateur/inducteur) d'E. coli (Hu et al., 1987; Brown et al., 1987; Figge et al., 1988; Deuschle et al., 1990; Labow et al., 1990), le système de résistance à la tétracycline d'E. coli (Gossen et al., 1992) (WO 94 04 672, EP 804 565).

10 La dite protéine rapporteuse est sélectionnée dans le groupe des protéines auto-fluorescentes et des enzymes détectables par un procédé histo-chimique. De préférence, la dite protéine fluorescente est choisie dans le groupe composé de la protéine de fluorescence verte (GFP), la protéine de fluorescence verte augmentée (EGFP), la protéine de fluorescence rouge (CFP et Red FP, RFP), la protéine de fluorescence bleue (BFP), la protéine de fluorescence jaune (YFP), et les variants fluorescents de ces protéines, les protéines fluorescentes changeant de couleur avec le temps

20 (« fluorescent timerTM commercialisée par Clonetech »), les protéines fluorescentes dont le fluorochrome a une durée de vie très courte, les protéines de fusion, telles la protéine de fusion luciférase/GFP composée d'au moins deux protéines fluorescentes et qui permettent une analyse visuelle et quantitative. Parmi les protéines fluorescentes utilisées, la protéine changeant de couleur avec le temps est particulièrement

11a

appréciée, car le changement de fluorescence verte vers une fluorescence rouge reflète l'activité du promoteur



qui dirige l'expression de cette protéine rapporteuse. Il est ainsi possible d'évaluer la persistance d'un composé ou d'un polluant sur l'activité du promoteur, et ce après le contact de l'animal ou de la cellule selon l'invention avec le polluant. L'utilisation d'un tel type de protéine rapporteuse permet ainsi d'évaluer la dynamique d'activation d'un promoteur. Selon un autre type de réalisation, il est intéressant d'utiliser des protéines dont la fluorescence est de courte durée de vie. Ainsi, l'examen des cellules et des animaux sera immédiat après l'arrêt de la mise en contact avec le ou les polluants. La disparition de la fluorescence ou sa persistance après un temps supérieur à celui de la demi vie du fluorochrome indiquera si le ou les promoteurs sont encore activés. Selon un autre type de réalisation, il est intéressant d'utiliser un gène rapporteur codant pour une protéine de fusion composée de deux protéines fluorescentes différentes réunies par un peptide de liaison qui contient un site de reconnaissance de la caspase-3 (Xu *et al.*, 1998 et Luo *et al.*, 2001). Ainsi, les séquences codant pour la GFP et BFP, respectivement CFP et YFP ont été réunies par un peptide de 18 acides aminés contenant une séquence de clivage spécifique de la caspase 3, une des protéines effectrices de la mort cellulaire programmée. Il existe un transfert d'énergie entre les deux fluorophores tant que les protéases caspase-3 ne sont pas activées. L'entrée en apoptose des cellules active les caspase-3 avec, pour conséquence, le clivage de la protéine de fusion et arrêt du transfert d'énergie, et

donc la visibilité de la GFP, respectivement de la CFP. Une telle cellule ou animal transgénique permet donc de détecter l'effet du polluant sur le phénomène d'apoptose. L'utilisation de cellules ou d'animaux transgéniques comportant deux gènes rapporteurs codant pour les protéines de fusion auto-fluorescentes GFP/BFP et CFP/YFP permet d'obtenir simultanément le même type d'information sur une éventuelle toxicité de deux catégories distinctes de polluants (oestrogènes et hormones thyroïdiennes par exemple). De telles cellules ou animaux transgéniques sont particulièrement utiles dans le cas de deux transgènes répondant à des types hormonaux différents mais s'exprimant dans les mêmes tissus ou bien d'expression ubiquitaire.

Selon un autre mode de réalisation, l'enzyme détectable par un procédé histo-chimique est choisie dans le groupe composé de la luciférase, la β -galactosidase, la β -glucuronidase, la phosphatase alcaline, la chloramphénicol-acétyl-transférase, la déshydrogénase alcoolique. Selon un mode préféré de réalisation, il s'agit de la luciférase. Par luciférase, on entend désigner toutes les protéines qui catalysent ou initient une réaction bioluminescente en présence d'un substrat appelé luciférine. La luciférase selon l'invention peut provenir de nombreux organismes ou systèmes générant de la bioluminescence (voir US 6,152,358). Par exemple, la luciférase selon l'invention peut provenir de *Renilla* (US 5,418,155 et US 5,292,658) ou de *Photinus pyralis*, ou de *Luciola cruciata* (US 4,968,613).

Les technologies de l'ADN recombinant utilisées pour la construction de la cassette d'expression ou le vecteur d'expression la contenant, sont celles connues et communément utilisées par les hommes de l'art. Les techniques standard sont utilisées pour le clonage, l'isolement de l'ADN, l'amplification, et la purification ; les réactions enzymatiques impliquant l'ADN ligase, l'ADN polymérase, les endonucléases de restriction sont effectuées selon les recommandations du fabricant. Les vecteurs incluent des plasmides, les cosmides, les phagemides, les bactériophages, les rétrovirus et autres virus animaux, les chromosomes artificiels, tels les YAC, BAC, HAC et autres vecteurs analogues. Ces techniques et les autres sont généralement réalisés selon Sambrook et al. (1989 Molecular cloning: a laboratory manual second edition - Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY. USA).

La présente invention couvre également la cassette d'expression ou transgène selon l'invention, ainsi que les vecteurs les contenant. En effet, le transgène peut être cloné dans un vecteur de clonage qui permet d'en assurer sa propagation dans une cellule hôte, et/ou facultativement dans un vecteur d'expression pour assurer l'expression du transgène.

Les méthodes pour générer des cellules transgéniques sont bien connues de l'homme de l'art. Pour introduire la cassette d'expression ou le transgène selon l'invention, facultativement compris dans un vecteur linéarisé ou non, ou sous la forme d'un

fragment de vecteur, peut être introduit dans la cellule hôte par des méthodes standard telles que par exemple la micro-injection dans le noyau (US 4 873 191), la transfection par précipitation au phosphate de calcium, la lipofection, l'électroporation, le choc thermique, la transformation avec des polymères cationiques (PEG, polybrène, DEAE-Dextran...), l'infection virale, le sperme (Kroll et Amaya, 1996). Kroll et Amaya 1999) ont plus particulièrement décrit un procédé pour générer des embryons de grenouilles transgéniques. Pour réaliser le criblage des cellules dans lesquelles au moins un transgène a été introduit, des marqueurs positifs et/ou négatifs, encore appelés gènes de sélection, peuvent être insérés dans le vecteur. Différents systèmes de sélection des cellules ont été décrits ; il convient de citer le système décrit qui utilise des vecteurs de sélection positif/négatif (Capecchi et al., 1989).

Selon un premier mode de réalisation, la cellule selon l'invention comprend une cassette d'expression comprenant de manière séquentielle dans le sens 5' - 3', la séquence du TRE de l'enzyme malique de rat (Seq ID N°1), le promoteur minimal du gène de la thymidine kinase (TK) du virus de l'herpès simplex lié de manière opérationnelle à un segment d'ADN codant pour la protéine de fluorescence verte augmentée, un signal de polyadénylation et facultativement une séquence "insulateur" à chaque extrémité de la dite cassette (Seq ID N°10 ou Seq ID N°11).

Selon un second mode de réalisation, la cellule selon l'invention comprend de manière séquentielle dans le sens 5' – 3', la séquence promotrice du gène de la stromélysine 3 de xénope comprenant plusieurs TRE (SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 8, SEQ ID NO : 9), liée de manière opérationnelle à un segment d'ADN codant pour la luciférase, un site de polyadénylation et facultativement une séquence « insulateur » à chaque extrémité de ladite cassette (SEQ ID NO : 10 ou NO :11).

Selon un troisième mode de réalisation, la cellule selon l'invention comprend de manière séquentielle dans le sens 5' – 3', la séquence du TRE de l'enzyme malique de rat (SEQ ID NO : 1), le promoteur minimal du gène de la thymidine kinase (TK) du virus de l'herpès simplex lié de manière opérationnelle à un segment d'ADN codant pour la luciférase, un signal de polyadénylation et facultativement une séquence « insulateur » à chaque extrémité de ladite cassette (SEQ ID NO :10 ou NO :11).

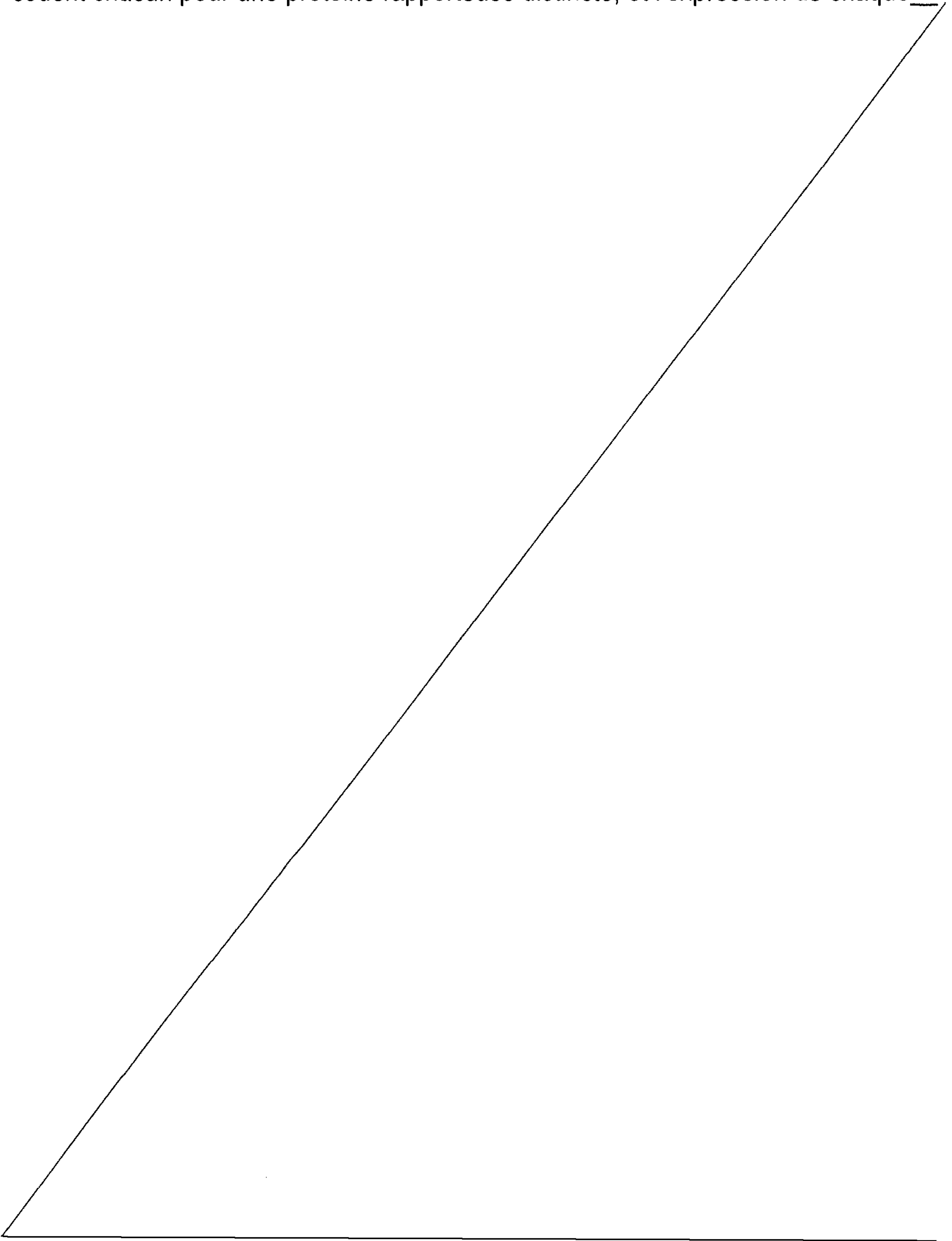
L'invention couvre une cellule d'animal aquatique transgénique obtenu par transgénèse germinale ledit animal aquatique étant un amphibien ou un téléoste, et ladite cellule comprenant au moins une cassette d'expression, ladite cassette comprenant:

- a) une séquence promotrice hétérologue tissu-spécifique ou ubiquitaire,
- b) une séquence d'ADN régulatrice de vertébré comprenant la portion du promoteur TH/bZIP comprise entre – 246 bp et +130 bp de séquence SEQ ID No 12 contenant deux éléments de réponse aux hormones thyroïdiennes TRE de séquences SEQ ID No 2 et 3 respectivement, liée de manière opérationnelle en amont d'un segment d'ADN codant pour une protéine rapporteuse, et
- c) une séquence "insulateur" à chaque extrémité de ladite cassette.

La cellule d'animal aquatique et/ou l'animal transgénique non humain selon l'invention est obtenue en introduisant au moins une cassette d'expression codant pour une protéine rapporteuse, dans une cellule, un zygote ou un embryon précoce de l'animal. L'introduction de différents transgènes dans la cellule selon l'invention peut également être réalisée de manière simultanée ou de manière décalée dans le

16a

temps. Lorsque la cellule est multitransgénique alors, de préférence, les transgènes codent chacun pour une protéine rapporteuse distincte, et l'expression de chaque



protéine rapporteuse est spécifique d'un type de polluants environnementaux.

La cellule selon l'invention comprend au moins un transgène selon l'invention, présent soit sous forme
5 d'élément extra-chromosomal, soit intégrée stablement de manière aléatoire ou ciblée dans l'ADN chromosomique. Dans le cas où plusieurs transgènes sont présents dans la cellule selon l'invention, ceux-ci peuvent être présents sous forme d'élément extra-chromosomal et/ou
10 intégré stablement de manière aléatoire ou ciblée dans l'ADN chromosomique.

Selon un mode préféré de réalisation, la cassette d'expression est intégrée stablement, de manière aléatoire ou ciblée, dans l'ADN chromosomique. Par
15 intégration de manière stable, on entend signifier l'insertion du transgène dans l'ADN génomique de la cellule selon l'invention. Le transgène ainsi inséré est ensuite transmis à la descendance cellulaire.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention,
20 la cellule est caractérisée en ce que la dite cassette d'expression ou transgène codant pour au moins une protéine rapporteuse est présent sous forme épisomale dans ladite cellule. Il est à la portée de l'homme du métier de définir la nature et les caractéristiques du
25 vecteur d'expression utilisé pour permettre le maintien et l'expression sous forme épisomale du transgène dans la cellule de l'invention.

Dans le cadre de la transgénèse germinale, l'ensemble des cellules de l'animal et notamment ses
30 cellules de la lignée germinale sont transgéniques.

Dans ce cas la cassette d'expression est de préférence intégrée stablement, de manière aléatoire ou ciblée, dans l'ADN chromosomique. Dans le cas où l'intégration du gène rapporteur est ciblée par recombinaison homologue dans le génome de l'organisme (« Knock-in »), le gène rapporteur peut être dépourvu de promoteurs et/ou d'éléments d'expression et être placé sous le contrôle d'un promoteur ou d'éléments d'expression endogènes.

10 Dans le cadre de transgénèse somatique, seule une partie des cellules de l'animal sont transgéniques, au niveau du site d'injection du transgène. Dans ce cas la cassette d'expression ou transgène est présent de préférence sous forme épisomale dans la cellule.

15 La cellule selon l'invention est de préférence une cellule de d'amphibien, de préférence la grenouille sélectionnée parmi *Xenopus laevis* et *Xenopus tropicalis*. Compte tenu des polymorphismes génétiques présents dans la population, il peut être intéressant pour analyser ou obtenir une réponse physiologique ou comportementale caractéristique que les amphibiens transgéniques selon l'invention, et notamment les grenouilles transgéniques selon l'invention présentent des fonds génétiques différents telles que les espèces 20 *Xenopus laevis*, *Xenopus tropicalis*. Selon un autre mode de réalisation, la cellule selon l'invention est une cellule de téléoste de préférence du zebra fish (poisson zèbre) ou du médaka.

La présente invention se rapporte également à un animal aquatique transgénique non humain sélectionné 30

parmi les amphibiens et les téléostes, comprenant au moins une cellule selon l'invention telle que précédemment décrite. Lorsque cet animal est un animal aquatique/terrestre comme les amphibiens ou batraciens, 5 il est sélectionné parmi les anoures, les urodèles et les apodes. De préférence il s'agit d'anoures, de manière plus préférée de xénopes des familles pipidae et ranidae. Les xénopes sont de préférence sélectionnés parmi *Xenopus laevis* et *Xenopus tropicalis*. Selon un 10 second mode de réalisation de l'invention, l'animal est un téléoste. Par téléostes, on entend désigner des poissons « osseux », c'est-à-dire que leur squelette est totalement ossifié. Le groupe des téléostes inclut par exemple le poisson zèbre (« zebrafish »), le 15 medaka, le rerio géant, le « puffer fish ».

Les animaux aquatiques de la présente invention présentent un certain nombre d'avantage par rapport aux systèmes d'animaux modèles traditionnels tels la souris, la drosophile ou le nématode. Tout d'abord, le 20 xénope et les téléostes sont d'un point de vue évolutif plus proche de l'homme, et à ce titre le modèle de criblage de la présente invention est beaucoup plus relevant. Les bases moléculaires et morphologiques du développement des tissus et des organes est soit 25 identique soit similaire aux autres vertébrés, dont l'homme. Le deuxième avantage procuré par les animaux aquatiques modèles de la présente invention, est que leurs embryons sont très transparents. Etant donné la transparence des embryons, l'activité des composés 30 administrés ou mis en contact avec l'animal, peut être

détectée et diagnostiquée beaucoup plus rapidement que chez les animaux non transparents. Ces activités ne peuvent être détectée essentiellement qu'au stade embryonnaire chez le xénope. Un autre avantage de ces animaux aquatiques est qu'ils se développent rapidement en comparaison des animaux comme la souris. Les animaux aquatiques selon l'invention présentent également l'avantage que les composés à tester peuvent être administrés directement sur l'animal en développement, ce qui n'est pas le cas pour les animaux qui se développent *in vitro*. Enfin, un autre avantage non négligeable, du choix de l'animal aquatique selon l'invention est le coût de la maintenance et de l'élevage qui est faible comparativement à celui généré par des animaux tels la souris. Enfin, compte tenu de la petite taille de l'embryon du xénope ou du zebrafish, le système selon l'invention se prête bien à l'utilisation de microplaques multi-puits pour la détection en grande quantité de l'expression du gène rapporteur, et permettre ainsi une automatisation de cette détection.

Plus particulièrement l'invention couvre une grenouille transgénique et ses descendants, aux différents stades de leur développement, et de préférence au stade têtard, obtenue par transgénèse germinale caractérisée en ce que l'ensemble des cellules de l'animal sont transgéniques. Par différents stades du développement on entend désigner le zygote, le têtard, la grenouille adulte.

Selon un autre mode de réalisation, l'invention couvre la grenouille transgénique, au différents stade de son développement, et de préférence au stade têtard, obtenue par transgénèse somatique caractérisé en ce que
5 une partie des cellules du dit animal sont transgéniques.

Il est évident que l'animal transgénique selon l'invention, peut comprendre des cellules transgéniques issues de la transgénèse germinale et des cellules
10 transgéniques issues de la transgénèse somatique.

De manière plus préférée, la grenouille transgénique selon l'invention est au stade têtard. Selon un premier mode de réalisation l'invention couvre un têtard transgénique comprenant au moins une cellule
15 comprenant une cassette d'expression comprenant de manière séquentielle dans le sens 5'-3' la séquence promotrice du gène de la stromélysine 3 de xénope comprenant plusieurs TRE (Seq iD N°7, N°8, N°9), liée de manière opérationnelle à un segment d'ADN codant
20 pour la luciférase, un signal de polyadénylation et facultativement une séquence "insulateur" à chaque extrémité de la dite cassette. Selon un second mode de réalisation, l'invention couvre un têtard transgénique comprenant au moins une cellule comprenant une cassette
25 d'ADN d'expression comprenant de manière séquentielle dans le sens 5'-3' la séquence du TRE de l'enzyme malique de rat (Seq ID N°1), le promoteur minimal du gène de la thymidine kinase (TK) du virus de l'herpès simplex lié de manière opérationnelle à un segment
30 d'ADN codant pour la luciférase, un signal de

polyadénylation et facultativement une séquence "insulateur" à chaque extrémité de la dite cassette. Selon un troisième mode de réalisation, l'invention couvre un tétard transgénique comprenant au moins une
5 cellule comprenant une cassette d'ADN d'expression comprenant de manière séquentielle dans le sens 5'-3' la séquence du TRE de l'enzyme malique de rat (Seq ID N°1), le promoteur minimal du gène de la thymidine kinase (TK) du virus de l'herpès simplex lié de manière
10 opérationnelle à un segment d'ADN codant pour la protéine de fluorescence verte augmentée, un signal de polyadénylation et facultativement une séquence "insulateur" à chaque extrémité de la dite cassette.

C'est également un des objets de la présente
15 invention de fournir un procédé pour identifier la présence d'au moins un polluant environnemental qui module, c'est-à-dire inhibe ou stimule (de préférence stimule), la transcription médiée par des éléments de réponse aux récepteurs nucléaires d'hormones,
20 comprenant les étapes de :

- a) mise en contact d'une cellule ou d'un animal selon l'invention, dans un milieu aqueux comprenant le polluant environnemental ;
- b) mise en contact d'une cellule ou d'un animal
25 selon l'invention dans le milieu aqueux;
- (c) détermination qualitative, facultativement quantitative, de l'expression de la protéine rapporteuse en a) et b) puis comparaison des dites expressions ;

de sorte qu'une différence d'expression de ladite protéine en a) et b) indique la présence de polluants environnementaux dans le milieu. Le procédé se caractérise en ce que à chaque type de polluant environnemental correspond une protéine rapporteuse distincte.

5 L'invention couvre également un procédé pour identifier la présence d'au moins un polluant environnemental qui module la transcription médiée par des éléments de réponse aux récepteurs nucléaires d'hormones, comprenant les étapes de:

10 a) mise en contact d'un premier animal comprenant une cellule de grenouille telle que définie par l'invention, dans un milieu aqueux comprenant le polluant environnemental;

b) mise en contact d'un second animal comprenant une cellule de grenouille telle que définie par l'invention, dans un milieu aqueux; et

15 c) détermination qualitative de l'expression de la protéine rapporteuse en a) et b) puis comparaison desdites expressions;

de sorte qu'une différence d'expression de la dite protéine rapporteuse en a) et b) indique la présence de polluants environnementaux dans le milieu.

20 C'est également un objet de la présente invention de fournir un procédé de criblage de composé(s) modulant, c'est-à-dire inhibant ou stimulant (de préférence stimulant), la transcription médiée par des éléments de réponse aux récepteurs nucléaires d'hormones, comprenant les étapes de :

a) mise en contact d'une cellule ou d'un animal selon l'invention, dans un milieu aqueux comprenant le ou les composés;

25 b) mise en contact d'une cellule ou d'un animal selon l'invention, dans ledit milieu aqueux;

c) détermination qualitative, facultativement quantitative, de l'expression de la protéine rapporteuse en a) et b) puis comparaison desdites expressions;

d) sélection du ou des composés induisant une différence d'expression de ladite protéine rapporteuse en a) et b).

23a

L'invention couvre aussi un procédé de criblage de composé(s) modulant la transcription médiée par des éléments de réponse aux récepteurs nucléaires d'hormones, comprenant les étapes de:

- a) mise en contact d'un premier animal comprenant une cellule de grenouille
5 telle que définie par l'invention, dans un milieu aqueux comprenant le ou les composés;
- b) mise en contact d'un second animal comprenant une cellule de grenouille telle que définie par l'invention, dans un milieu aqueux;
- c) détermination qualitative de l'expression de la protéine rapporteuse en a) et
10 b) puis comparaison desdites expressions; et
- d) sélection du ou des composés induisant une différence d'expression de ladite protéine rapporteuse en a) et b).

L'invention couvre aussi l'utilisation du procédé selon l'invention, pour l'analyse et l'étude du mode d'action biologique des composés modulant la
15 transcription médiée par des éléments de réponse aux récepteurs nucléaires d'hormones.

L'invention couvre aussi l'utilisation du procédé selon l'invention, pour étudier l'effet de dose de polluants environnementaux qui stimulent la transcription médiée par des éléments de réponse aux récepteurs nucléaires d'hormones.

20 L'invention couvre aussi l'utilisation d'un animal comprenant une cellule de grenouille selon l'invention, pour la détection, l'analyse et/ou l'étude des contaminants environnementaux.

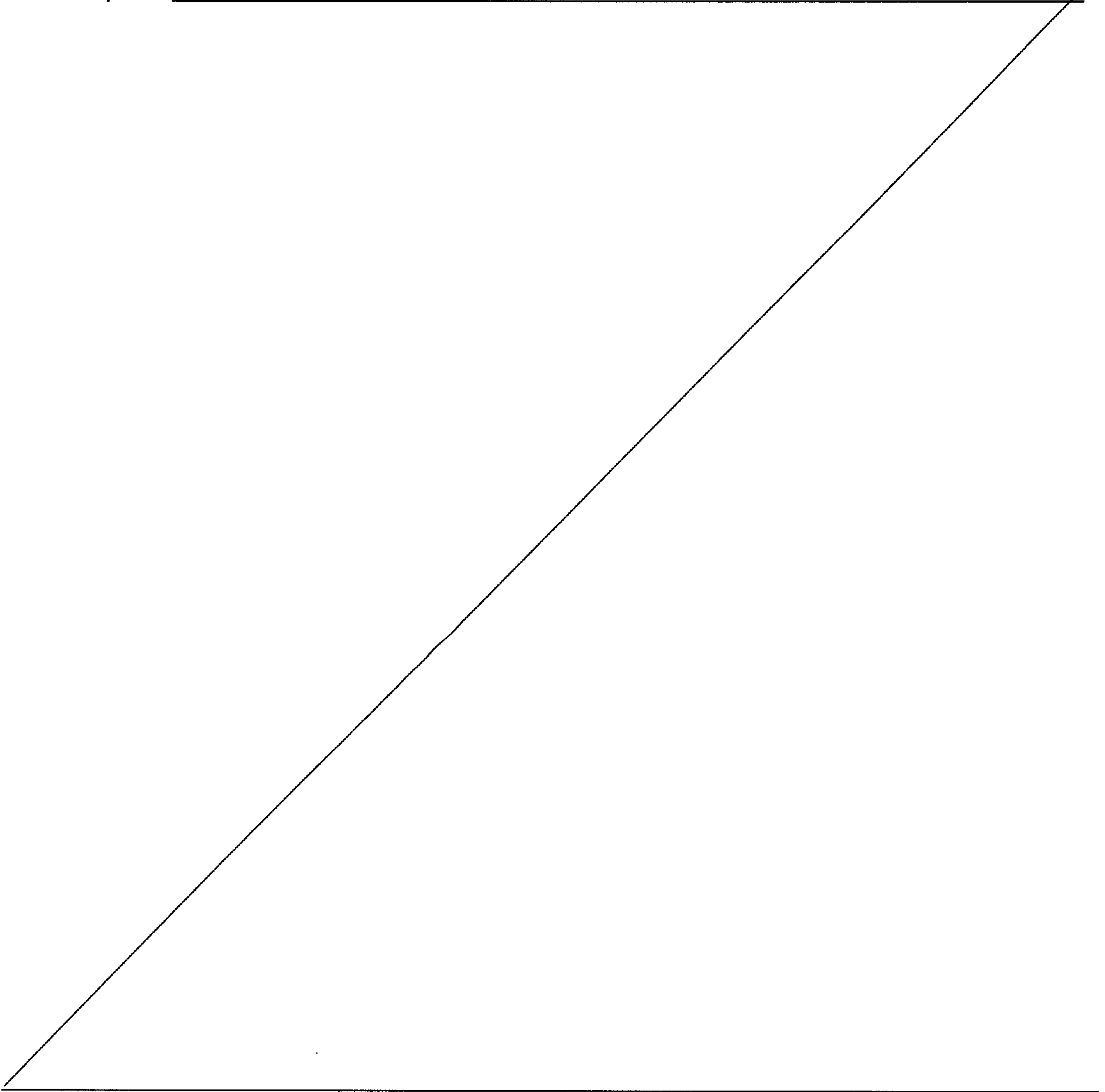
L'invention couvre aussi l'utilisation d'un animal comprenant une cellule de grenouille selon l'invention, pour analyser et/ou évaluer la qualité de l'eau.

25 L'invention couvre aussi l'utilisation d'un animal comprenant une cellule de grenouille selon l'invention, pour la réalisation d'études de toxicité et/ou de toxicologie.

L'invention couvre aussi l'utilisation d'un animal comprenant une cellule de grenouille selon l'invention, dans un protocole d'étude de la tératogénèse sur des
30 embryons de grenouille, appelé FETAX pour Frog Embryo Teratogenicity assay.

23b

L'invention couvre aussi un dispositif pour la détection de polluants environnementaux et/ou de composé(s), modulant la transcription médiée par des éléments de réponse aux récepteurs nucléaires d'hormones caractérisé en ce qu'il comprend au moins une cellule de grenouille selon l'invention.

- 5 Le procédé de criblage selon l'invention peut comprendre en outre l'étape de transfert somatique dans la cellule ou dans au moins une cellule transgénique de l'animal selon l'invention, d'au moins un gène de récepteur nucléaire d'hormones. En effet, l'adjonction d'un transgène surexprimant au moins un récepteur
- 

nucléaire d'hormones dans une cellule de l'animal selon l'invention permet d'augmenter la sensibilité de détection lorsque les procédés de l'invention sont mis en œuvre. De tels transgènes comportent des promoteurs
5 tissus spécifiques ou ubiquitaire pour diriger l'expression du dit récepteur aux endroits appropriés.

Le procédé selon la l'invention est également destiné au criblage simultané d'au moins deux composés caractérisé en ce que à chaque composé correspond une
10 protéine rapporteuse distincte.

Le procédé selon l'invention est particulièrement utile pour déterminer si un composé connu est susceptible d'être un perturbateur endocrinien. Pratiquement, le composé à tester susceptible d'avoir
15 un effet sur la transcription médiée par des éléments de réponse aux récepteurs nucléaires d'hormones est mis en présence de la cellule ou de l'animal aquatique en ajoutant directement le dit composé dans le milieu aqueux contenant la cellule ou l'animal vivant. En
20 pratique, si il s'agit d'une cellule, le ou les dits composés à tester sont placés dans le milieu de culture. Si il s'agit d'un animal, notamment d'un têtard, le ou les composés à tester sont placés dans le milieu aqueux dans lequel vit l'animal. Alternativement
25 si il s'agit de détecter la présence de composés dans l'eau d'une rivière, d'un lac ou de tout autre milieu aquatique naturel dans lequel ont suspecte la présence de contaminants environnementaux, l'animal est placé dans ce milieu aquatique. Dans ce cas, le milieu aqueux
30 servant de contrôle pour mettre en oeuvre l'étape b)

des procédés selon l'invention, peut être l'eau de la rivière, du lac ou de tout autre milieu aquatique naturel traité ou non et ne contenant pas le composé à tester ou à cribler. De telles approches sont utilisées pour introduire des agents chimiques dans les embryons de poissons (M. Westerfield, The zebrafish book : a guide for the laboratory use of zebrafish 3rd Ed., 1995). Alternativement les composés peuvent être administrés aux animaux aquatiques selon l'invention par électroporation, lipofection, ou ingestion. Alternativement, le ou les composés à cribler ou à détecter peuvent être directement mis en contact avec la cellule ou l'animal selon l'invention en le ou les injectant directement dans la cellule ou l'animal vivant. Par exemple, le composé peut être injecté dans le cerveau ou le muscle dorsal d'un têtard.

Le composé à cribler ou à étudier peut être administré seul ou en conjonction avec d'autres composés ou solvants ou transporteurs. Le composé peut être mis en présence de l'animal simultanément, au même moment ou après l'administration du réactif ou du colorant utilisé pour la détection de l'expression du gène rapporteur.

Il peut être intéressant avant de mettre en oeuvre les procédés selon l'invention de prétraiter les cellules ou animaux selon l'invention pour augmenter leur sensibilité aux composés à cribler, détecter ou mesurer. Ainsi les inventeurs ont développé un procédé de traitement à base de perchlorate. Les animaux ou cellules sont traités au perchlorate pendant une durée

pouvant allée jusqu'à 1 mois à environ 1 g/l dans le milieu aquatique ou le milieu de culture respectivement. Les animaux ou cellules sont ensuite sensibilisés aux composés (si il est connu).

5

Les composés susceptibles d'être criblés par le procédé selon l'invention sont extrêmement variés et se caractérisent par leur aptitude à lier directement ou
10 indirectement le récepteur nucléaire d'hormones. Le dit composé peut ainsi entrer en compétition avec le dit récepteur nucléaire pour sa liaison aux éléments de réponse (RE) aux récepteurs nucléaires d'hormones, ou bien avec le ligand du récepteur, c'est-à-dire
15 l'hormone. Les composés sont des molécules agonistes ou antagonistes des récepteurs nucléaires tels que le récepteur aux hormones thyroïdiennes (TR), le récepteur aux oestrogènes (ER), le récepteur à l'acide rétinoïque (RAR), le récepteur aux glucocorticoïdes (GR), le
20 récepteur aux minéralocorticoïdes (MR), les récepteurs orphelins, le récepteur à la vitamine D. Le terme composé inclut tout élément, entité, agent incluant sans limitation ni exhaustivité, les polluants ou composés pharmaceutiques, thérapeutiques,
25 pharmacologiques, chimiques, environnementaux, agricoles, aquatiques, cosmétiques, les drogues, les médicaments, les produits naturels ou synthétiques. Par exemple selon un mode préféré de réalisation, le dit composé criblé possède un effet ostéoprotecteur

dépourvu d'effets utéro-trophiques indésirables et constitue donc un agent pharmaceutique.

Les techniques et moyens de détection de l'expression du ou des gènes rapporteur sont bien
5 connues de l'homme du métier. Ils comprennent de manière non exhaustive, l'oeil humain, le film photographique, le photomultiplicateur, la photodiode (pour revue voir US 5 571 722). Les moyens de détection peuvent en outre comprendre un dispositif de mesure
10 et/ou un ordinateur pour stocker les données et calculer le taux d'expression du gène rapporteur, et par comparaison avec un étalon, calculer la concentration dudit composés ou polluant environnemental dans le milieu. Plus généralement, les
15 moyens de détection de la bioluminescence mesurent l'intensité de la lumière en fonction de la concentration en composés ou polluants environnementaux.

L'invention concerne l'utilisation du procédé
20 selon l'invention pour l'analyse et l'étude du mode d'action biologique de composé(s) modulant la transcription médiée par des éléments de réponse aux récepteurs nucléaires d'hormones. L'invention concerne également l'utilisation du procédé selon l'invention
25 pour étudier l'effet de dose des polluants environnementaux qui stimulent la transcription médiée par des éléments de réponse aux récepteurs nucléaires d'hormones.

Plus généralement c'est un objet de la présente
30 invention d'utiliser une cellule et/ou un animal selon

l'invention, pour la détection, l'analyse et/ou l'étude des contaminants environnementaux, notamment dans l'eau. L'invention est particulièrement utile pour analyser et/ou évaluer la qualité de l'eau.

5 Une autre utilisation de la cellule et/ou de l'animal selon l'invention réside dans l'étude de toxicité et/ou de toxicologie, notamment en cosmétologie, en agrochimie, en pharmacie. Ainsi, la présente invention est particulièrement utile dans un
10 protocole d'étude par FETAX.

Les cellules et animaux transgéniques selon l'invention sont également particulièrement utiles pour détecter, étudier et mesurer la léthalité cellulaire induite par certains composés, la tératogénicité et la
15 tumorigénicité de certains composés, ainsi que les propriétés pro-apoptotique de certains composés.

L'invention vise également à protéger un dispositif pour la détection de polluants environnementaux, notamment dans l'eau, et/ou de
20 composé(s) modulant la transcription médiée par des éléments de réponse aux récepteurs nucléaires d'hormones caractérisé en ce qu'il comprend au moins une cellule et/ou au moins un animal, de préférence un xénope au stade têtard ou un zebrafish, selon
25 l'invention, et facultativement des moyens de détection de l'expression de ou des gènes rapporteur.

D'autres caractéristiques et avantages de la présente invention seront mieux mis en évidence à la

lecture des exemples suivants. Dans ces exemples on se réfèrera aux figures suivantes.

FIGURES

Figure 1 : Représentation schématique du promoteur du gène TH/bZIP et de la position des amorces pour isoler par PCR, le fragment d'ADN contenant les deux éléments de réponses aux hormones thyroïdienne (TRE) le produit d'amplification de 410 pb est visualisé sur gel d'agarose.

10

Figure 2: Représentation schématique d'une cassette d'expression contenant une séquence promotrice contenant des TRE (Thyroid Responsive Element).

Figure 3 : Transgénèse somatique dans le muscle (à gauche) et dans le cerveau (à droite). Dans le muscle, l'ADN est introduit dans les cellules par microinjection d'ADN nu. Dans le cerveau l'ADN est complexée à du polyéthylènimine (PEI), puis micro injecté dans le cerveau.

Figure 4 : Test de fonctionnalité de la construction « promoteur de la stromélysine 3 de xénope couplée à la luciférase ». La construction est transfectée dans les cellules XTC en complexant l'ADN avec du PEI (22 kDA, à 6 équivalents), les cellules transfectées sont cultivées en présence (10^{-8} M) ou en absence (-T3) d'hormone thyroïdienne T3.

25

Figure 5 : Transgénèse somatique par injection dans le muscle dorsal de xénope la construction TRE-tk-luciférase. Les animaux sont transfectés par injection dans le muscle dorsal de 1 mg/animal de la construction TRE-tk-luciférase. Les animaux sont ensuite traités avec (10^{-8} M) ou sans (-T3) hormone thyroïdienne T3. 4 jours après le traitement, l'expression de la luciférase est mesurée.

Figure 6 : Transgénèse somatique par injection dans le muscle dorsal de xénope prétraités de la construction TRE-tk-luciférase. Les animaux sont prétraités 48 heures avec 10^{-11} M d'hormones thyroïdiennes T3, puis rincer pendant 24 heures. Les animaux sont ensuite transfectés par injection dans le muscle dorsal de 1 mg/animal de la construction TRE-tk-luciférase les animaux sont ensuite traités 48 heures avec (10^{-8} M) ou sans (-T3) hormone thyroïdienne. 2 jours après le traitement l'expression de la luciférase est mesurée.

20

Figure 7 : Transgénèse somatique par injection dans le muscle dorsal de xénope de la construction TRE-tk-EGFP. Les animaux sont transfectés par injection dans le muscle dorsal de 1mg/animal de la construction TRE-tk-EGFP. Les animaux sont ensuite traités 48 heures avec (+ T3 10nM) ou sans (-T3) hormone thyroïdienne T3. La bioluminescence est visible dans les cellules de l'animal traité.

Figure 8 : Vue ventrale d'un têtard transgénique pour la construction DR4(X3)-GFP avec éléments génétiques insulateurs (« insulators »), répondant à la présence d'hormone thyroïdienne dans l'eau de l'aquarium ($10^{-8}M$)
5 par l'émission de fluorescence dans l'ensemble du système nerveux et dans les bourgeons de membres.

EXEMPLES

1. Matériels et méthodes

1.1. Le vecteur de clonage.

Les cassettes d'expression sont insérées dans le vecteur de base pBluescript II SK* (PROMEGA) au niveau du site multiple de clonage contenant notamment les sites de restriction: SacI, SacII, NotI, XbaI, BamHI, SmaI, PstI, EcoRI, EcoRV, HindIII, SalI, XhoI, ApaI, KpnI.

De préférence, la cassette d'expression est introduite au niveau du site SalI. Au préalable, la cassette et le vecteur ont été linéarisés par SalI et les extrémités ont été rendues franches.

1.2. Les éléments de réponse aux récepteurs nucléaires d'hormones.

Différentes séquences de TRE (Thyroid Responsive Element) seront utilisées :

- TRE de l'enzyme malique su rat (Seq ID N°1)
- TRE consensus en une copie (DR4) (Seq ID N°3, N°5, N°6, N°7, N°9)
- TRE consensus en triple copies (DR4)X3 espacés de 4 nucléotides.

Différentes séquences de séquences promotrices contenant des TRE seront utilisées :

* marque de commerce

- promoteur de myc murin contenant un TRE négatif (Perez-Juste et al., 2000) (clonage dans les sites PstI-XhoI de pBS-SK II) (Seq ID N°4)
- promoteur du gène de xénope TH/bZIP (Furlow and Brown, 1999) (Seq ID N°12 ; numéro d'accèsion AF192492 (gi 6707362) genbank) contenant deux TRE positifs (Seq ID N°2 et N°3) (clonage dans les sites SacI-PstI de pBS-SK II) (figure 1).
- Promoteur de la stromélysine 3 de xénope contenant plusieurs TRE (clonage dans le site HindIII).

Les oligonucléotides contenant ces séquences sont clonées dans le vecteur pBS-SK II (PROMEGA) de préférence au niveau des sites XbaI et BamHI.

15

1.3. Le promoteur minimal

Le promoteur minimal de 170 pb du gène de la thymidine kinase (TK) du virus de l'herpès simplex (HSV) est isolé par PCR puis cloné au niveau des sites BamHI-HindIII du pBS-SK II, contenant les séquences de promoteurs contenant les TRE.

20

Les gènes rapporteurs sont clonés en aval de la séquence TRE-tk.

25

Ensuite, la séquence « TRE-tk-gène rapporteur » est excisée du vecteur pBS-SK II, puis ses extrémités sont rendues franches afin d'être clonées dans le vecteur contenant les insulateurs.

1.4. Le gène rapporteur

Dans un premier temps, les constructions sont réalisées avec les gènes EGFP et luciférase de firefly.

5 Les constructions suivantes ont ainsi été construites :

- TRE (enzyme malique)-TK-EGFP
- TRE (enzyme malique)-TK-luciférase
- Stromélysine-3-luciférase

10 Par la suite des gènes de fusion seront générés en associant les séquences codant pour les protéines fluorescentes EGFP ou RedFep (CLONTECH) avec la luciférase de Firefly (PROMEGA) ou de Renilla. Les séquences ADNc de EGFP et RedFep seront amplifiées par
15 PCR en utilisant des amorces contenant des sites de restriction KpnI et BglII. Les fragments amplifiés seront clonés dans ces sites dans le vecteur pGL2 Basic Vector de PROMEGA, qui contient le gène de la luciférase de firefly. Le bloc de séquence « protéine
20 fluorescente/luciférase/signal de polyadénylation » sera extrait du vecteur pGL2 basic vector par digestion avec les enzymes SmaI et SalI. Les extrémités seront ensuite rendues franches et les fragments de digestion seront clonés en aval des différents promoteurs dans un
25 des sites de restriction du site multiple de clonage du vecteur pBS-SK II qui est libre et situé en 3' des promoteurs, tel par exemple le site SalI.

Les gènes de fusion seront au préalable testés « à
30 vide », c'est-à-dire ils seront clonés dans le site

BamHI-HindIII en aval du promoteur TK de HSV dans le pBS-SK II, afin de vérifier l'absence d'éléments cryptiques de réponse aux récepteurs nucléaires d'hormones (notamment TRE) capables d'influencer la
5 réponse des promoteurs et donc de se comporter comme des séquences « enhancers ».

1.5. La séquence « insulateur ».

Deux séquences insulateurs sont de préférence
10 utilisées ; celle du gène de la bêta-globine de poulet (Seq ID N°11 ; Numéro d'accèsion AY 040835 (gi : 171 49 284) dans genbank) et celle du gène du lysozyme de poulet (Seq ID N°10 ; Numéro d'accèsion X98 408 (gi : 1403311)).

15 Les séquences « insulateurs » sont isolées par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) en utilisant de l'ADN génomique de poulet ou un vecteur le contenant, comme matrice ADN. Le couple d'amorces utilisées contient des sites de restriction pour faciliter le clonage
20 ultérieur. Ainsi les séquences « insulateurs » du gène de la bêta-globine sont clonées dans le vecteur : en position 5' aux niveau des sites SacI-BamHI, en position 3' aux niveau des sites XhoI-KpnI. Les séquences « insulateurs » du gène du lysozyme sont
25 clonées dans le vecteur : en position 5' aux niveau des sites BamHI-HindIII, en position 3' aux niveau des sites XhoI-KpnI.

Les séquences « insulateurs » ainsi isolées sont
30 clonées de part et d'autre de la cassette d'expression

contenant le gène rapporteur sous le contrôle de séquence régulatrice de la transcription sélectionnée parmi les éléments de réponse aux récepteurs nucléaires d'hormones.

5

Les séquences définitives « promoteur-gène rapporteur » sont extraits du pBS-SK II et les extrémités sont rendues franches afin d'intégrer ces séquences dans les vecteurs contenant les insulateurs (Figure 2).

10

1.6. Transgénèse somatique

La transgénèse somatique (Ouatas et al., 1998) est utilisée pour vérifier la validité des constructions (Figure 3) et leur potentielle régulation par les
15 composés, tels l'hormone thyroïdienne T3, avant l'emploi en transgénèse germinale.

La transgénèse somatique est réalisée soit :

- par injection de 1 µl ADN nu dans le muscle dorsal
20 de l'embryon. L'ADN a une concentration de 100ng/µl à 5 µg/µl dans du NaCl 0,07 M.
- par micro-injection de 1 µl d'ADN/PEI (poléthylèneimine) dans le cerveau de l'embryon. L'ADN a une concentration comprise entre 50 et 500 ng/µl dans
25 du glucose 5%.

La transgénèse germinale est réalisée selon le protocole décrit par Kroll et Amaya (1996).

2. Test de fonctionnalités des constructions

2.1. Tests sur cellules en culture

Les constructions transgéniques sont testées dans les
5 cellules de xénopes XTC en culture.

Les cellules XTC sont obtenues à partir de carcasses de
têtards de xénopes juste avant métamorphose (Pudney et
al., 1973). Les cellules sont cultivées à température
10 ambiante et ce jusqu'à 20 passages.

Les cellules sont transfectées en complexant l'ADN avec
du polyéthylène imine (PEI) de 22 kDa à 6 équivalents
(Ouatas et *al.*, 1998).

15

Le protocole permet une vérification rapide des
constructions et ainsi de vérifier que celles-ci
répondent bien aux substances, telles que l'hormone
thyroïdienne T3 lorsqu'elle est injectée dans le milieu
20 de culture des cellules.

Des cellules XTC seront produites à partir de têtards
transgéniques afin de réaliser des tests. Ces cellules
XTC transgéniques pourront être transfectées par des
25 vecteurs surexprimant différentes isoformes de
récepteurs nucléaires des hormones pour étudier
l'action des perturbateurs endocriniens.

2.2. Transfection de cellule XTC avec la construction stromélysine 3/ luciférase.

En absence d'hormone thyroïdienne T3 dans le milieu de culture des cellules XTC transgéniques, un niveau
5 d'expression basale de la protéine rapporteuse luciférase est observée. L'adjonction d'hormone thyroïdienne T3 au milieu de culture à une concentration de 10^{-8} M induit l'expression plus importante de la protéine rapporteuse (Figure 4).

10

3. Transgénèse somatique chez le xénope avec TRE-TK-Luciférase

15 3.1. La construction TRE-tk-luciférase a été injectée dans le muscle dorsal d'embryon de xénope (1 mg/animal). La moitié des animaux sont traités avec de l'hormone thyroïdienne T3 à 10^{-8} M. Quatre jours après, l'expression du gène rapporteur est mesurée chez les
20 animaux traités (10^{-8} M de T3) et non traités (- T3). L'adjonction d'hormone thyroïdienne T3 au milieu de culture à une concentration de 10^{-8} M induit l'expression beaucoup plus importante de la protéine rapporteuse (Figure 5).

25

3.2. Selon une mode alternatif, les animaux transgéniques selon l'invention sont au préalable traités au perchlorate pendant 1 mois à 1g/l puis sont sensibilisés par le composé à tester, telles l'hormone
30 T3 (10^{-11} M) pendant 18 à 48 heures sans nourriture. Les

animaux sont ensuite lavés dans un milieu ne contenant pas de T3 et nourris pendant 36 heures. La construction (par exemple TRE-tk-luciférase) est injectée dans le muscle dorsal de l'embryon de xénope (1 mg/animal).

5

Sur les 24 tétards prétraités, puis soumis à la transgénèse somatique, douze tétards sont traités pendant 48 heures avec de l'hormone thyroïdienne T3 à 10^{-8} M ; les douze autres tétards restant servant de
10 contrôle. L'adjonction d'hormone thyroïdienne T3 au milieu de culture à une concentration de 10^{-8} M induit l'expression beaucoup plus importante de la protéine rapporteuse (Figure 6).

15 3.3. La construction TRE-tk-EGFP a été injectée dans le muscle dorsal d'embryon de xénope (1 mg/animal). La moitié des animaux sont traités avec de l'hormone thyroïdienne T3 à 10 nM. Quatre jours après, l'expression du gène rapporteur est détectée chez les
20 animaux traités (10 nM de T3) et non traités (- T3). L'adjonction d'hormone thyroïdienne T3 au milieu de culture à une concentration de 10 nM induit l'expression beaucoup plus importante de la protéine rapporteuse (Figure 7).

REFERENCES

- Arnheiter *et al.*, (1990) *Cell* 62 : 51
- Argenton *et al.* (1996) *Mol Cell Biol* 16 : 1714-1724
- 5 Brinster *et al.*, (1982) *Nature* 296 : 39-42
- Brown *et al.*, (1987) *Cell* 49 : 603-612
- Brown *et al.*, (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:
1924-9
- Capecchi *et al.*, (1989) *Science* 244 :1288-1291
- 10 Ciana *et al.* (2001) *Mol. Endocrinol* 15: 1104-13
- Coen *et al.* (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 7869-
74
- Day *et al.*, (1998) *Biotechniques* 25: 848-50, 852-4, 856
- De Luze *et al.*, (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:
15 7322-6
- Denver *et al.*, (1997) *J. Biol. Chem* 272: 8179-88
- Denver *et al.*, (1999) *J. Biol. Chem* 274 (33) : 23128-34
- Deuschle *et al.*, (1990) *Science* 2 : 480-483
- Echt *et al.* (1988) *Embo J.* 7 : 2063-2073
- 20 Farsetti *et al.* (1992) *J. Biol. Chem* 267: 15784-8
- Figge *et al.*, (1988) *Cell* 49 : 603-612
- Furlow *et al.* (1999) *Mol. Endocrinol* 13: 2076-89
- Gossen *et al.*, (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:
5547-5551)
- 25 Hu *et al.*, (1987) *Cell* 48 : 555-556
- Hug *et al.*, (1998) *Mol. Cell. Biol.* 8:3065
- Hynes *et al.*, (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 :
2038-2042
- Ishizuya-Oka *et al.* (1996) *Cell Tissue Research*
- 30 Israel *et al.*, (1989) *Nucleic Acids Res.* 17 : 2589-2604

- Karsenti *et al.* (2000) *Semin. Cell. Biol* 11(5) : 343-6
- Kitazawa *et al.* (2002) *Biochem Biophys Res Commun* 290: 650-655
- Klock *et al.*, (1987) *Nature* 329: 734-736
- 5 Kolla *et al.* (1998) *Biophys Res Commun.* 266: 5 -14
- Kroll *et al.*, (1996) *Development* 122: 3173-83
- Kroll *et al.*, (1999) *Methods Mol Biol* 97: 393-414
- Labow *et al.*, (1990) *Mol. Cell. Biol.* 10: 3343-3356
- Lee *et al.*, (1981) *Nature* 294 : 228-232
- 10 Liu *et al.*, (2000) *Luminescence* 15: 45-9
- Luo *et al.*, (2001) *Biochem Biophys Res Commun*
- Mader *et al.* (1993) *Nucleic Acids Res* 21: 1125-1132
- Mayo *et al.*, (1982) *Cell* 29 : 99-108
- Metzger *et al.* (1999), *Curr. Opin. Biotechnol.* 5 :
- 15 470-476
- Namciu *et al.* (1998) *Mol. Cell. Biol* 18: 2382-91
- Nover *et al.*, (1991) in « Heat Shock Response », e.d. Nover, L CRC, Boca Raton, Fl pp. 167-220
- Oofusa *et al.*, (2001) *Mol. Cell. Endocrinol* 181: 97-110
- 20 Ouatas *et al.*, (1998) *Int. J. Dev. Biol* 42: 1159-64
- Perez-Juste *et al.*, (2000) *J. Biol. Chem* 275: 1307-14
- Pudney *et al.* (1973) *Experientia* 29: 466-467
- Roberto *et al.*, (2000) *Endocrinology* 141: 4056-4064
- Schmidt *et al.*, (1990) *Mol. Cell. Biol.* 10 : 4406-4411
- 25 Seark *et al.*, 1985 *Mol. Cell. Biol.* 5: 1480-1489
- Stief *et al.*, (1989) *Nature* 341: 343-5
- Wang *et al.*, (1993) *J. Biol. Chem* 268 (22): 16270-8
- Xiang *et al.*, (1998) *Nucleic Acids Research* 26: 2034-2035

LISTE DE SEQUENCES

<110> CNRS Centre National de la Recherche Scientifique
 <120> Embryons transgéniques de xénope et leurs utilisations
 pour la détection de perturbateurs endocriniens dans
 l'environnement
 <130> 003429-0344
 <140> 2.487.765
 <141> 2003-05-27
 <150> PCT/FR0301598
 <151> 2003-05-27
 <150> FR 02/06 669
 <151> 2002-05-30
 <160> 12
 <170> PatentIn Ver. 2.1
 <210> 1
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Rattus sp.
 <400> 1
 ttgggggtag gggaggacag 20
 <210> 2
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Xenopus sp.
 <400> 2
 ctaggggtaa gtaaggtgaa 20
 <210> 3
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Xenopus sp.
 <400> 3
 ctaaggtaag cccgggtag 20
 <210> 4
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Xenopus sp.
 <400> 4
 gggcgacctta agaaggcag 19
 <210> 5
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Xenopus sp.
 <400> 5
 ggcaggtcat ttcaggacag 20

<210> 6
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Xenopus sp.

<400> 6
 gtctgacact gccgacctc

19

<210> 7
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Xenopus sp.

<400> 7
 aggtcagtta aggtga

16

<210> 8
 <211> 14
 <212> ADN
 <213> Xenopus sp.

<400> 8
 aggtgaacag gaca

14

<210> 9
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Xenopus sp.

<400> 9
 gggtagatat aggtca

16

<210> 10
 <211> 1668
 <212> ADN
 <213> Gallus gallus

<400> 10
 ggatccataa tataactgta ccagggttttg gtttattaca tgtgactgac ggcttcctat 60
 gcgtgctcag aaaacggcag ttgggcactg cactgcccgg tgatgggtgcc acggtggctc 120
 ctgccgcctt ctttgatatt cactctgttg tatttcattc cttggttgccg atgaaaggat 180
 ataacagtct ctgaggaaat acttggtatt tcttctgatc agcgttttta taagtaatgt 240
 tgaatatagg ataaggctgt gtgtcccttg tcttgggaga caaagcccac agcagggtgg 300
 gggtgggtgg tggcagctca gtgacaggag aggttttttt gcctgttttt tttgttggtt 360
 ttttttttta agtaagggtgt tcttttttct tagtaaaatt tctactggac tgtatgtttt 420
 gacaggctcag aaacattttct tcaaaagaag aaccttttgg aaactgtaca gcccttttct 480
 ttcattccct ttttgctttc tgtgccaatg cctttgggtc tgattgcatt atggaaaacg 540
 ttgatcggaa cttgagggtt ttattttatag tgtggcctga aagcttggtat agctgttggt 600
 acatgagata ccttattaag tttaggccag cttgatgctt tatttttttt ctttgaagt 660
 agtgagcgtt ctctgggttt tttcctttga aactggcgag gcttagattt ttctaattgg 720
 attttttacc tgatgatcta gttgcatacc caaatgcttg taaatgtttt cctagttaac 780
 atgttgataa cttcggattt acatgttgta tatacttgct atctgtgttt ctagtaaaaa 840
 tatatggcat ttatagaaat acgtaattcc tgatttcctt ttttttttat ctctatgctc 900
 tgtgtgtaca ggtcaaacag acttcactcc tattttttatt tatagaattt tatatgcagt 960
 ctgtcgttgg ttcttgtgtt gtaaggatac agccttaaat ttcctagagc gatgctcagt 1020
 aaggcgggtt gtcacatggg ttcaaagtga aaacgggcac gtttgctgct gccttcccag 1080
 atccaggaca ctaaactgct tctgcaactg aggtataaat cgcttcagat cccaggaagt 1140
 gtagatccac gtgcataatt ttaaagaaga atgaatactt tctaaaatat gttggcatag 1200
 gaagcaagct gcatggattt atttgggact taaattattt tggtaacgga gtgcataggt 1260
 tttaaacaca gttgcagcat gctaacgagt cacagcattt atgcagaagt gatgcctgtt 1320
 gcagctgttt acggcactgc cttgcagtga gcattgcaga taggggtggg gtgctttgtg 1380
 tcgtgttggg acacgctgcc acacagccac ctcccgaaca tatctcacct gctgggtact 1440
 tttcaaacca tcttagcagt agtagatgag ttactatgaa acagagaagt tcctcagttg 1500
 gatatttctca tgggatgtct tttttcccat gttgggcaaa gtatgataaa gcatctctat 1560

ttgtaaatta	tgcacttggt	agttcctgaa	tcctttctat	agcaccactt	attgcagcag	1620
gtgtaggctc	tggtgtggcc	tgtgtctgtg	cttcaatctt	ttaagctt		1668

<210> 11
 <211> 1216
 <212> ADN
 <213> Gallus gallus

<400> 11

tctagagggga	cagccccccc	ccaaagcccc	cagggatgta	attacgtccc	tcccccgcta	60
gggggcagca	gcgagccgcc	cggggctccg	ctccgggtccg	gcgctcccc	cgcatccccg	120
agccggcagc	gtgcggggac	agcccgggca	cggggaaggt	ggcacgggat	cgctttcctc	180
tgaacgcttc	tcgctgctct	ttgagcctgc	agacacctgg	ggggatacgg	ggaaaaagct	240
ttaggctgaa	agagagattt	agaatgacag	aatcatagaa	cggcctgggt	tgcaaaggag	300
cacagtgtc	atccagatcc	aaccccctgc	tatgtgcagg	gtcatcaacc	agcagcccag	360
gctgccca	gccacatcca	gcctggcctt	gaatgcctgc	agggatgggg	catccacagc	420
ctccttgggc	aacctgttca	gtgcgtcacc	accctctggg	ggaaaaactg	cctcctcata	480
tccaacccaa	acctcccctg	tctcagtgtg	aagccattcc	cccttgtcct	atcaaggggg	540
agtttgctgt	gacattgttg	gtctgggggtg	acacatgttt	gccaattcag	tgcatcacgg	600
agaggcagat	cttggggata	aggaagtgc	ggacagcatg	gacgtgggac	atgcagggtg	660
tgagggtctt	gggacactct	ccaagtcaca	gcgttcagaa	cagccttaag	gataagaaga	720
taggatagaa	ggacaaagag	caagttaaaa	cccagcatgg	agaggagcac	aaaaaggcca	780
cagacactgc	tggtccctgt	gtctgagcct	gcatgtttga	tggtgtctgg	atgcaagcag	840
aaggggtgga	agagcttgcc	tggagagata	cagctgggtc	agtaggactg	ggacaggcag	900
ctggagaatt	gccatgtaga	tgttcataca	atcgtcaaat	catgaaggct	ggaaaagccc	960
tccaagatcc	ccaagaccaa	ccccaaccca	cccaccgtgc	ccactggcca	tgtccctcag	1020
tgccacatcc	ccacagttct	tcatcacctc	cagggacggt	gaccccccca	cctccgtggg	1080
cagctgtgcc	actgcagcac	cgctcttttg	agaaggtaaa	tcttgctaaa	tccagcccga	1140
ccctcccctg	gcacaacgta	aggccattat	ctctcatcca	actccaggac	ggagtcagtg	1200
aggatggggc	tctaga					1216

<210> 12
 <211> 836
 <212> ADN
 <213> Xenopus laevis

<400> 12

gatctccctg	ctctttataa	aatgactgaa	tgtctccctg	ttgtgtataa	tggtgcagag	60
tatgttatgg	ttgctaatag	actgagctgt	tatatagagg	cagagggaca	tgttgatagg	120
ctgtgcattc	agtacacatg	agtagcgagt	gccgttcagg	agttgagaga	ggggagaggg	180
aggcttgggg	agttgtgagc	aagagaaggg	gacagagtga	gtgagaggag	gggaaaggct	240
ggcacatttt	cacaggacgc	actaggggta	agtaagggtg	atgctcagcc	tcatttgaac	300
tctgtagggg	tgggagagac	acacacgctg	tgtatataca	tagtgataga	gagagggggc	360
cgggagcgag	acaggggctg	gggagagttc	agcacaggag	agagaggcag	ggagagggag	420
aaagagacac	ttagcaacag	ggatcagctt	ggggacaagt	gagaagcaag	agcaagttct	480
gctgcccat	caggtatagt	ataacctgca	atctgcatgc	aactgccatg	tactcccact	540
cccacctctc	ttctactgca	tatacactga	tagcacagcc	tagtctgctg	agcttacact	600
ctaataataca	gtgagacaca	gatacaatac	agggagagga	actattggga	gaagagaata	660
ctgctctgca	aagcttacac	tccattatac	agagggacac	agatacaata	cagagagggg	720
accattggta	gaagagagta	ctgccctgca	gagcttacac	tctagtgtac	aggcggacac	780
ataaacactt	catggaaatg	ggagcaaatt	aggtaaagaa	tagatttcag	aaagat	836

REVENDICATIONS

1. Cellule d'animal aquatique transgénique obtenu par transgénèse germinale, ledit animal aquatique étant un amphibien ou un téléoste, et ladite cellule comprenant au moins une cassette d'expression, ladite cassette comprenant:
- 5 a) une séquence promotrice hétérologue tissu-spécifique ou ubiquitaire,
b) une séquence d'ADN régulatrice de vertébré comprenant la portion du promoteur TH/bZIP comprise entre -246bp et +130bp de séquence SEQ ID No 12 contenant deux éléments de réponse aux hormones thyroïdiennes TRE de séquences SEQ ID No 2 et 3 respectivement, liée de manière opérationnelle en
10 amont d'un segment d'ADN codant pour une protéine rapporteuse, et
c) une séquence « insulateur » à chaque extrémité de ladite cassette.
2. La cellule selon la revendication 1, caractérisée en ce que ladite protéine rapporteuse est une protéine auto-fluorescente ou une enzyme détectable par un procédé histochimique.
- 15 3. La cellule selon la revendication 2, caractérisée en ce que ladite protéine fluorescente est une protéine de fluorescence verte (GFP), une protéine de fluorescence verte augmentée (EGFP), une protéine de fluorescence rouge (RFP), une protéine de fluorescence cyan (CFP), une protéine de fluorescence bleue (BFP), une protéine de fluorescence jaune (YFP), un variant fluorescent de ces
20 protéines, une protéine fluorescente changeant de couleur avec le temps (« fluorescent timer* »), ou une protéine fluorescente dont le fluorochrome a une durée de vie très courte.
4. La cellule selon la revendication 2, caractérisée en ce que ladite enzyme détectable par un procédé histochimique est une luciférase, une β -galactosidase,
25 une β -glucuronidase, une phosphatase alcaline, une chloramphénicol-acétyltransférase, ou une déshydrogénase alcoolique.

* **marque de commerce**

5. La cellule selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que ladite cassette d'expression est insérée de manière stable dans le génome cellulaire.

6. La cellule selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que ledit amphibien est une grenouille et ledit téléoste est un poisson zèbre (zebrafish) ou un medaka.

7. La cellule selon la revendication 6, caractérisée en ce que ledit amphibien est *Xenopus laevis* ou *Xenopus tropicalis*.

8. La cellule selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée en ce qu'elle est obtenue par transgénése germinale, caractérisée en ce que l'ensemble des cellules dudit amphibien ou dudit téléoste sont transgéniques.

9. La cellule selon l'une quelconque des revendications 6 à 8, caractérisée en ce que la cellule est obtenue d'une grenouille transgénique, au stade têtard.

10. Procédé pour identifier la présence d'au moins un polluant environnemental qui module la transcription médiée par des éléments de réponse aux récepteurs nucléaires d'hormones, comprenant les étapes de:

a) mise en contact d'un premier animal comprenant une cellule de grenouille définie selon l'une quelconque des revendications 6 à 9, dans un milieu aqueux comprenant le polluant environnemental;

b) mise en contact d'un second animal comprenant une cellule de grenouille définie selon l'une quelconque des revendications 6 à 9, dans un milieu aqueux; et

c) détermination qualitative de l'expression de la protéine rapporteuse en a) et b) puis comparaison desdites expressions;

de sorte qu'une différence d'expression de la dite protéine rapporteuse en a) et b) indique la présence de polluants environnementaux dans le milieu.

11. Le procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que ledit polluant environnemental stimule la transcription médiée par des éléments de réponse aux récepteurs nucléaires d'hormones.

12. Le procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que ledit procédé
5 comprend en outre une étape de détermination quantitative de l'expression de la protéine rapporteuse.

13. Procédé de criblage de composé(s) modulant la transcription médiée par des éléments de réponse aux récepteurs nucléaires d'hormones, comprenant les étapes de:

- 10 a) mise en contact d'un premier animal comprenant une cellule de grenouille définie selon l'une quelconque des revendications 6 à 9, dans un milieu aqueux comprenant le ou les composés;
- b) mise en contact d'un second animal comprenant une cellule de grenouille définie selon l'une quelconque des revendications 6 à 9, dans un milieu
15 aqueux;
- c) détermination qualitative de l'expression de la protéine rapporteuse en a) et b) puis comparaison desdites expressions; et
- d) sélection du ou des composés induisant une différence d'expression de ladite protéine rapporteuse en a) et b).

20

14. Le procédé selon la revendication 13, caractérisé en ce que lesdits composé(s) stimule(nt) la transcription médiée par des éléments de réponse aux récepteurs nucléaires d'hormones.

15. Le procédé selon la revendication 13, caractérisé en ce que ledit procédé
25 comprend en outre une étape de détermination quantitative de l'expression de la protéine rapporteuse.

16. Utilisation du procédé défini selon la revendication 13, pour l'analyse et l'étude du mode d'action biologique des composés modulant la transcription médiée par des éléments de réponse aux récepteurs nucléaires d'hormones.

5 17. Utilisation du procédé défini selon la revendication 11, pour étudier l'effet de dose de polluants environnementaux qui stimulent la transcription médiée par des éléments de réponse aux récepteurs nucléaires d'hormones.

18. Utilisation d'un animal comprenant une cellule de grenouille définie selon l'une quelconque des revendications 6 à 9, pour la détection, l'analyse et/ou l'étude des contaminants environnementaux.

10 19. L'utilisation selon la revendication 18, caractérisée en ce que les contaminants environnementaux sont recherchés dans l'eau.

20. Utilisation d'un animal comprenant une cellule de grenouille définie selon l'une quelconque des revendications 6 à 9, pour analyser et/ou évaluer la qualité de l'eau.

15 21. Utilisation d'un animal comprenant une cellule de grenouille définie selon l'une quelconque des revendications 6 à 9, pour la réalisation d'études de toxicité et/ou de toxicologie.

20 22. L'utilisation selon la revendication 21, caractérisée en ce que les études de toxicité et/ou de toxicologie sont réalisées en cosmétologie, en agrochimie ou en pharmacie.

23. Utilisation d'un animal comprenant une cellule de grenouille définie selon l'une quelconque des revendications 6 à 9, dans un protocole d'étude de la tératogénèse sur des embryons de grenouille, appelé FETAX pour Frog Embryo Teratogenicity assay.

24. Dispositif pour la détection de polluants environnementaux et/ou de composé(s), modulant la transcription médiée par des éléments de réponse aux récepteurs nucléaires d'hormones caractérisé en ce qu'il comprend au moins une cellule de grenouille définie selon l'une quelconque des revendications 6 à 9.

5 25. Le dispositif selon la revendication 24, caractérisé en ce que les polluants environnementaux sont recherchés dans l'eau.

26. Le dispositif selon la revendication 24 ou 25, caractérisé en ce qu'il comprend des moyens de détection de l'expression du ou des gènes rapporteur.

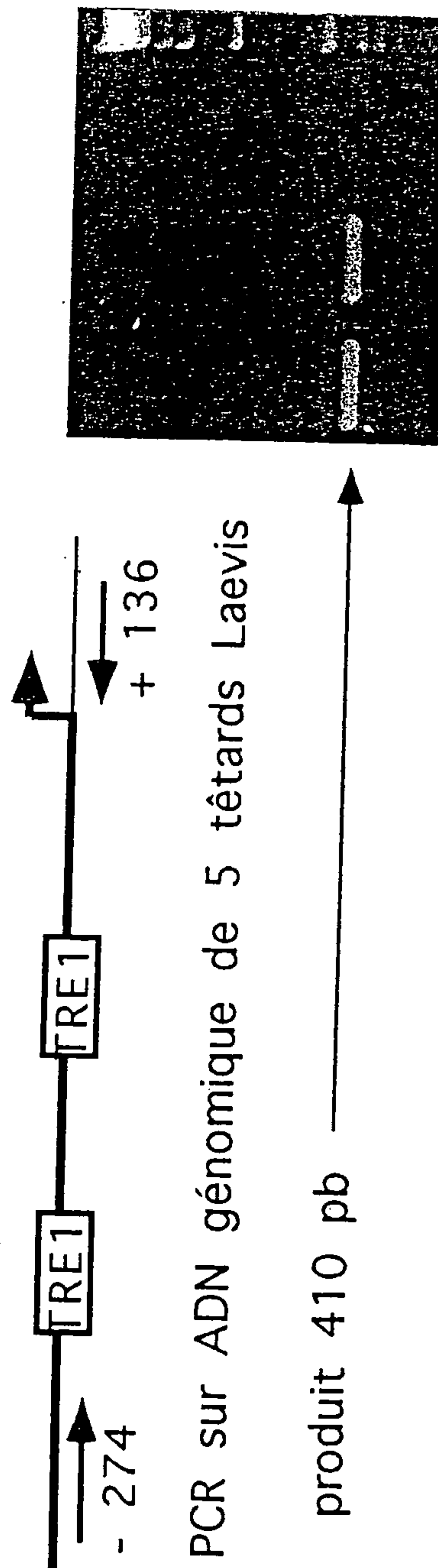


Figure 1

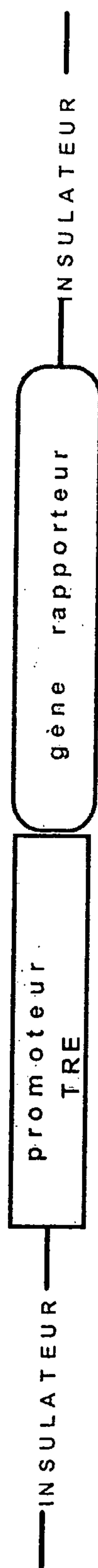


Figure 2

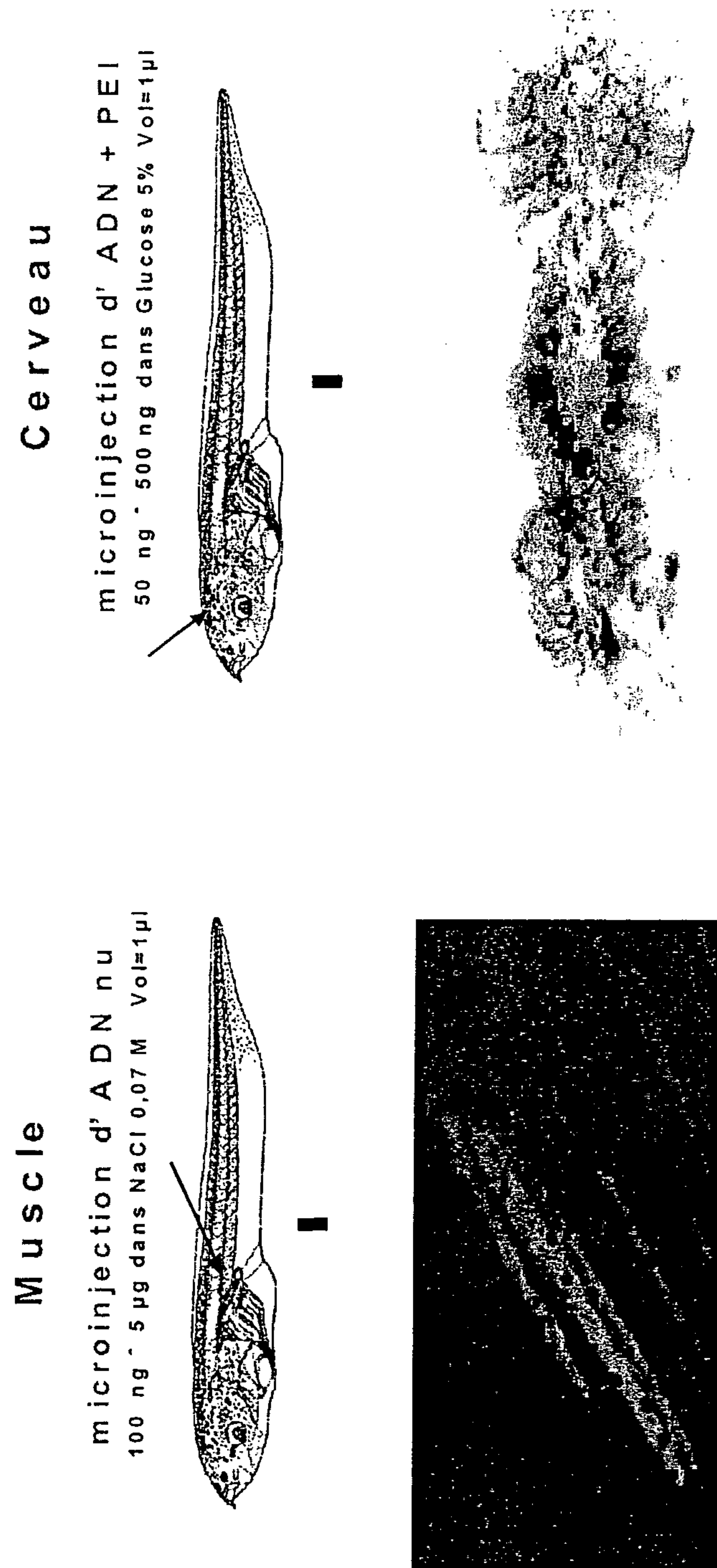


Figure 3

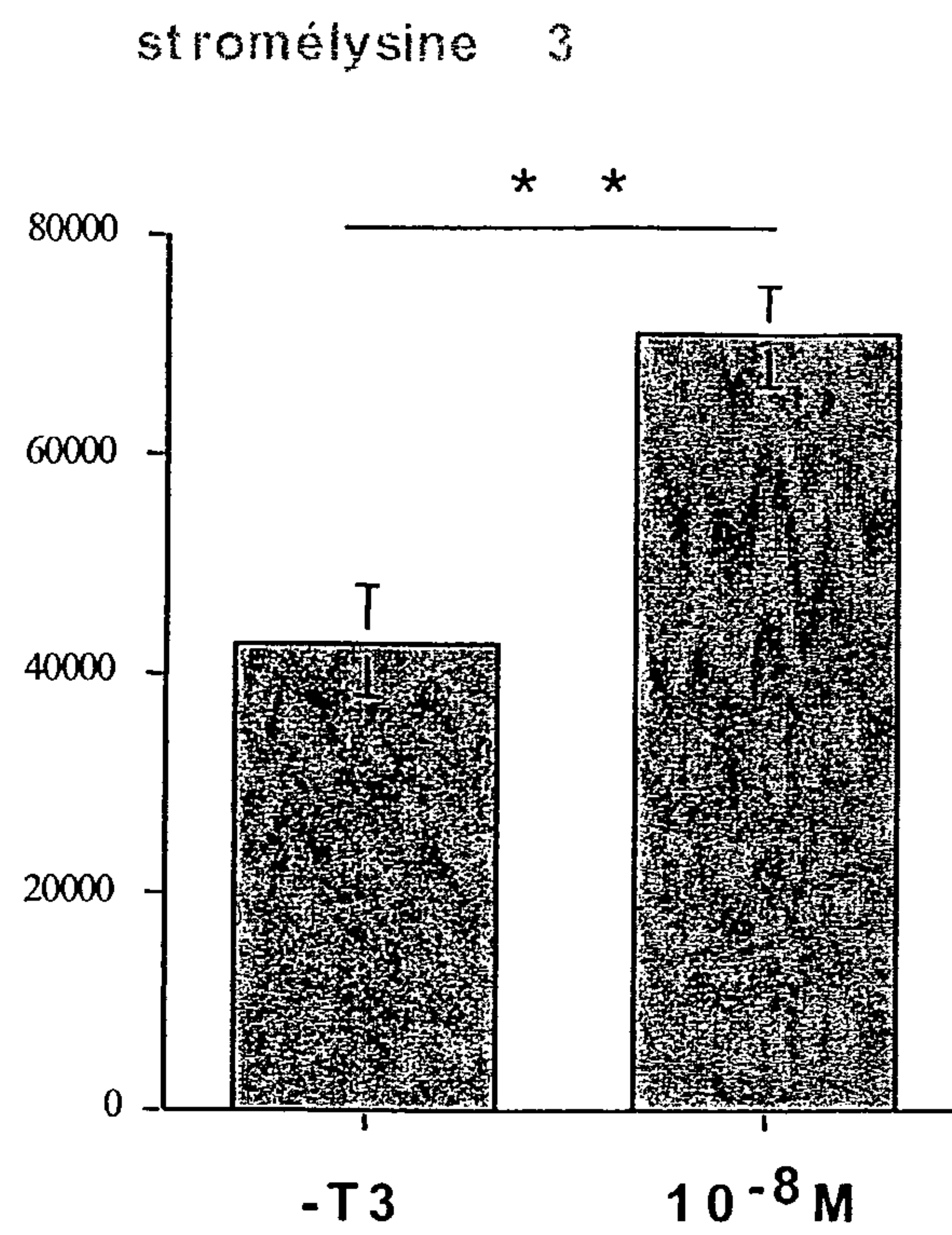


Figure 4

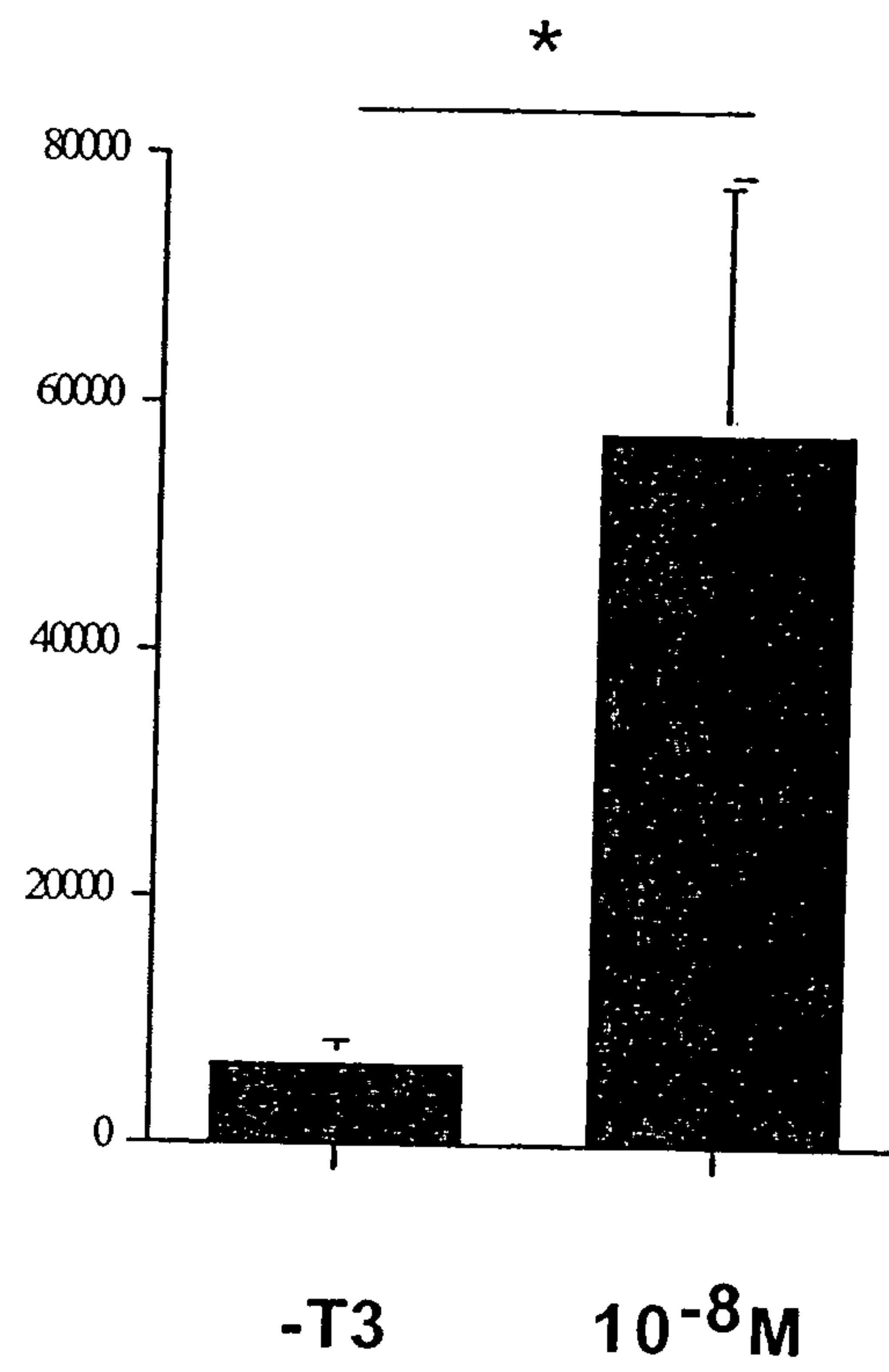


Figure 5

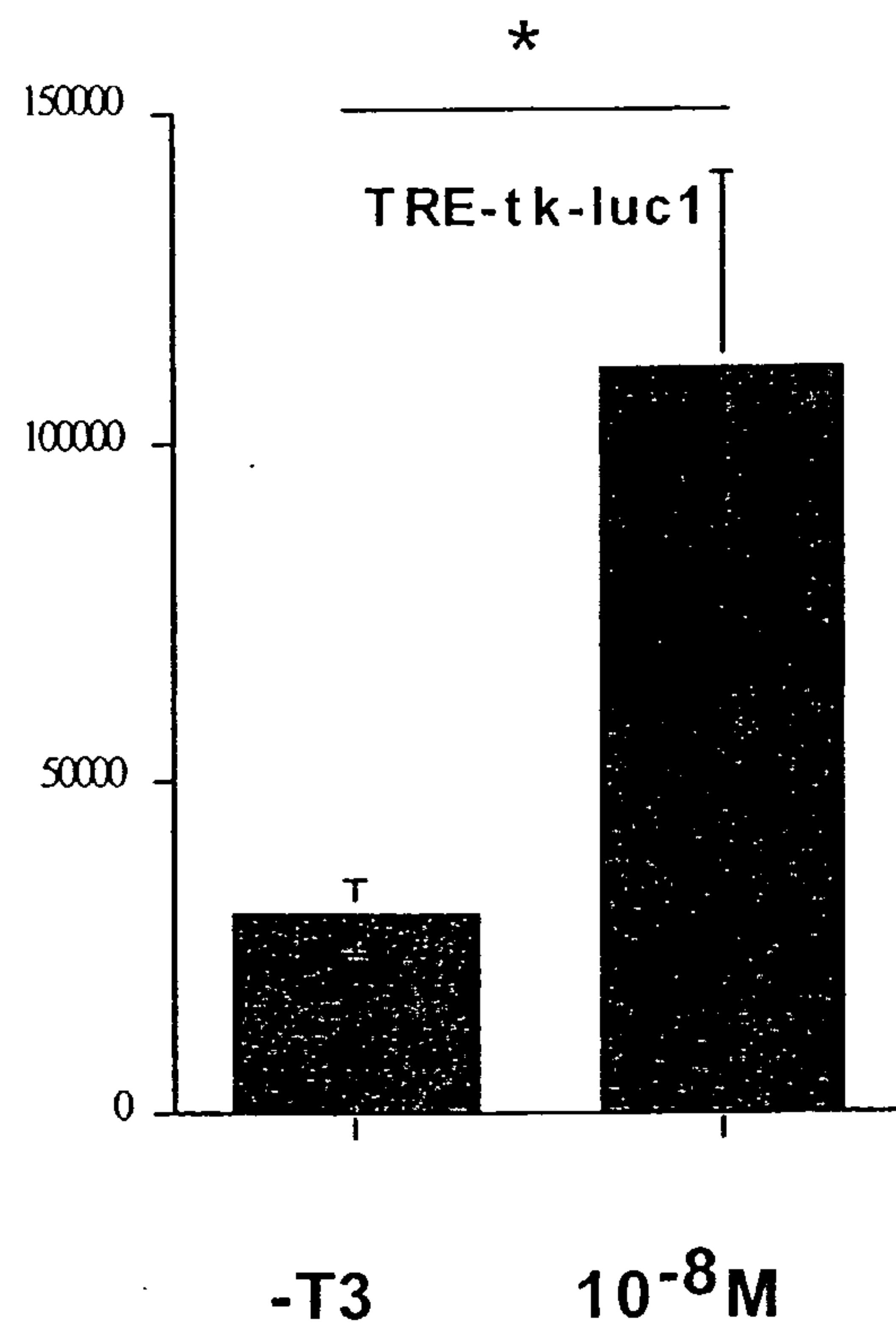
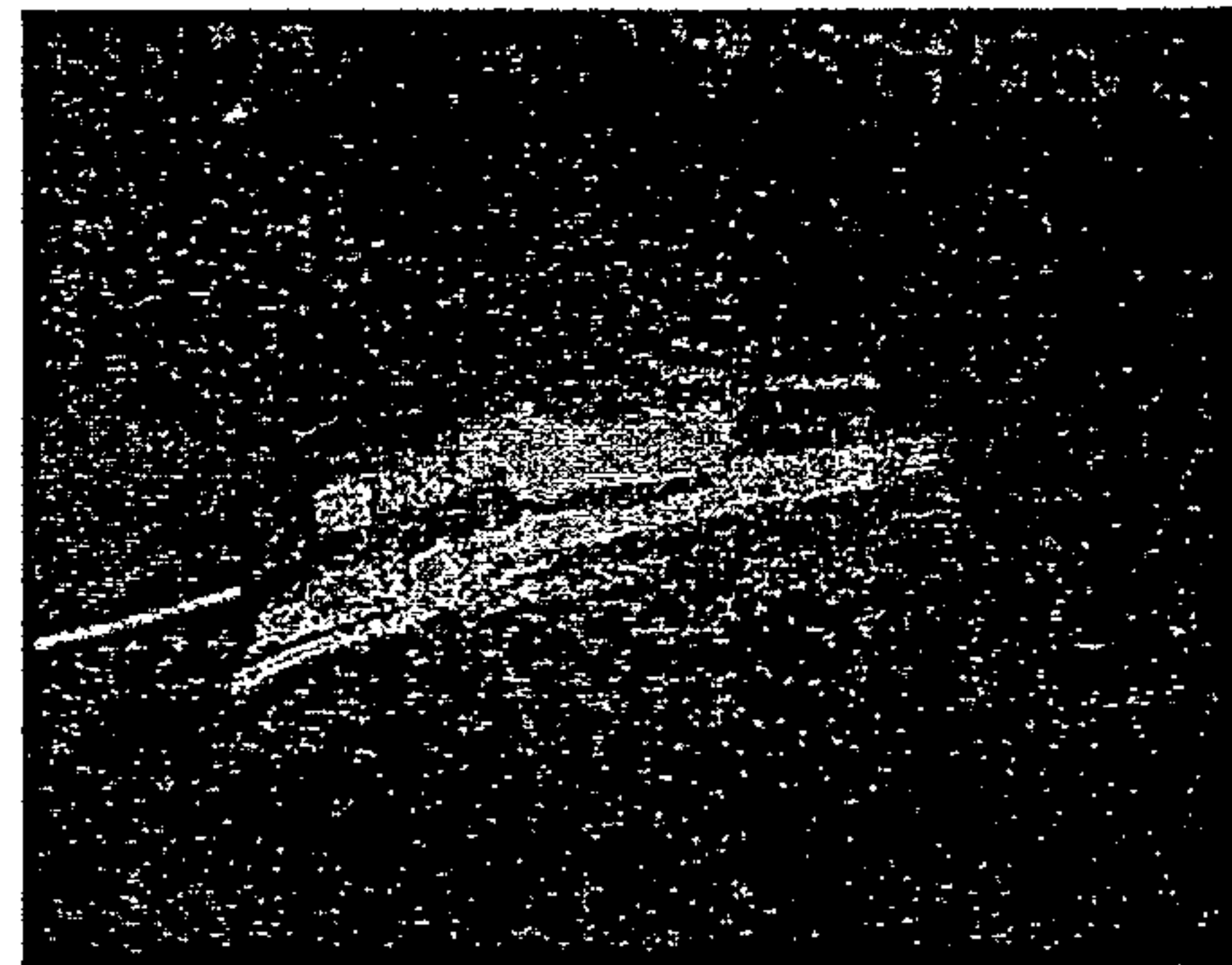
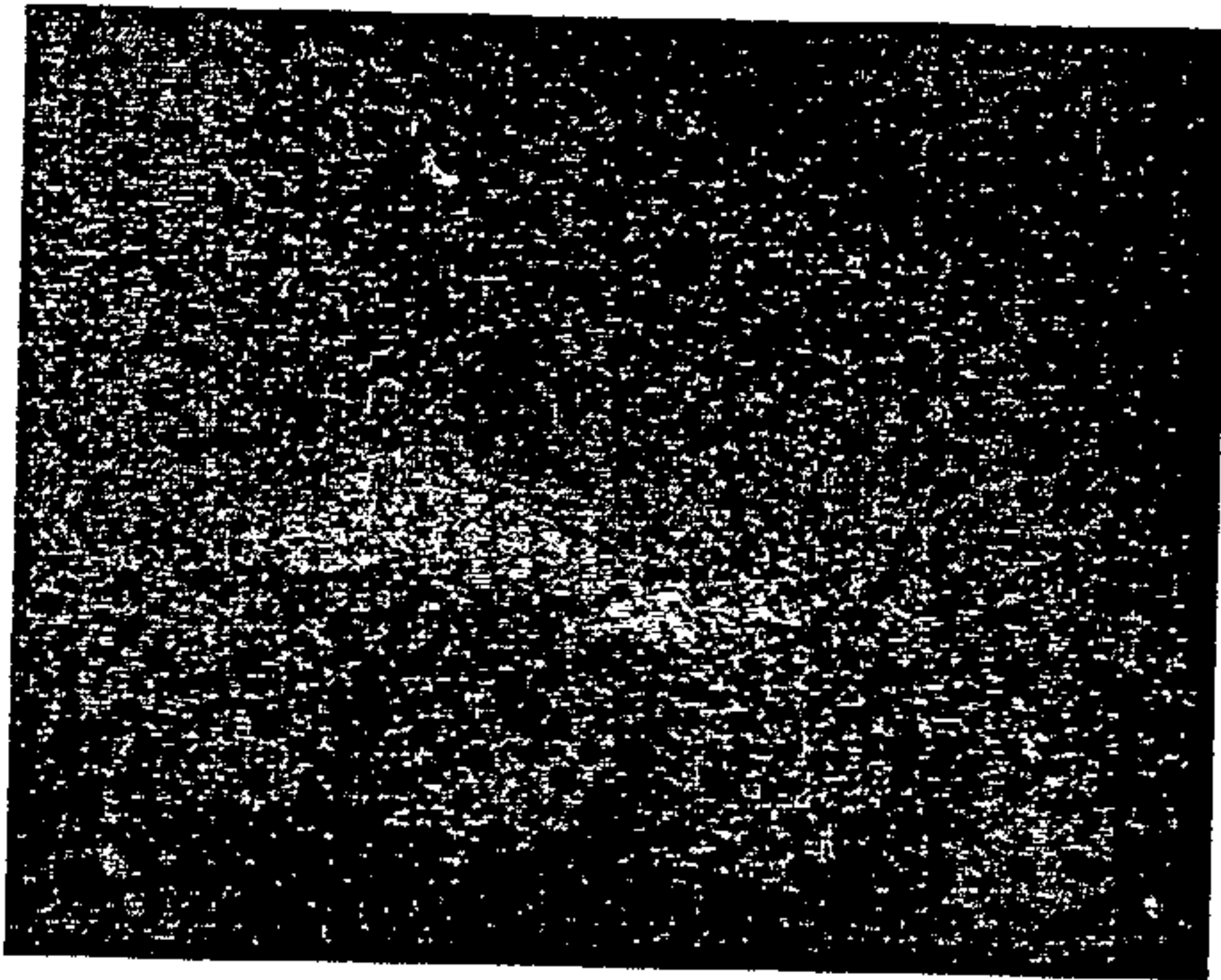


Figure 6



+T3 10nM

Figure 7



Figure 8

