



HAL
open science

Écotoxicologie : effets des perturbateurs endocriniens sur la reproduction chez le poisson

Nathalie Hinfray, Selim Ait-Aissa, Jean-Marc Porcher, François Brion

► **To cite this version:**

Nathalie Hinfray, Selim Ait-Aissa, Jean-Marc Porcher, François Brion. Écotoxicologie : effets des perturbateurs endocriniens sur la reproduction chez le poisson. Rapport Scientifique INERIS, 2007, 2006-2007, pp.34-36. ineris-01869083

HAL Id: ineris-01869083

<https://ineris.hal.science/ineris-01869083>

Submitted on 6 Sep 2018

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

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

Écotoxicologie: effets des perturbateurs endocriniens sur la reproduction chez le poisson

Nathalie Hinfray, Sélim Aït-Aïssa, Jean-Marc Porcher, François Brion



Coupe transversale de cerveau de larve de poisson-zèbre témoin (TS) et exposée à l'œstradiol (E2). L'exposition à de l'œstradiol pendant 7 jours entraîne une synthèse de novo de la protéine aromatasase B (aromatase cérébrale) dans les cellules gliales radiaires (flèche rouge) qui sont connues pour jouer un rôle prépondérant dans la neurogenèse. Collaboration Laboratoire d'Endocrinologie Moléculaire de la Reproduction UMR CNRS 6026-Université de Rennes.

La présence dans l'environnement aquatique des perturbateurs endocriniens (PE), c'est-à-dire des substances d'origine naturelle ou anthropique, comme les résidus de certains médicaments, capables d'interférer avec le système endocrinien est une préoccupation majeure depuis quelques années. Cette problématique s'est imposée au début des années 1990 avec la publication d'études sur des anomalies du système reproducteur chez diverses espèces d'invertébrés et de vertébrés aquatiques. Chez de nombreuses espèces de gastéropodes prosobranches du littoral a été décrit l'apparition d'individus imposex (apparition d'un appareil reproducteur mâle chez les femelles) dont la sévérité et l'occurrence sont corrélées aux concentrations d'exposition en TBT¹, un biocide utilisé dans les peintures anti-fouling. D'autres études réalisées sur des reptiles d'un lac de Floride accidentellement contaminé par un pesticide organochloré ont montré des perturbations des concentrations en hormones stéroïdiennes circulantes associées à des anomalies du développement de l'appareil reproducteur mâle et un déclin de la population. Chez des populations de poissons vivant dans des rivières recevant des eaux résiduaires ont été observées à cette même époque des féminisations de poissons mâles qui se traduisent, en particulier, par de l'intersexualité, c'est-à-dire par la présence d'ovocytes au sein du tissu testiculaire. L'ensemble de ces études, menées sur des espèces sauvages, a conforté l'idée que des substances chimiques contaminant le milieu aquatique sont capables d'induire des effets sur la reproduction.

DES OUTILS BIOLOGIQUES

Face aux risques qu'exercent ces substances sur la reproduction des organismes et/ou

leur descendance, l'Unité d'Évaluation des risques écotoxicologiques de l'INERIS a initié dès la fin des années 1990, des programmes de recherche visant à développer des outils biologiques *in vitro* et *in vivo* permettant de détecter et de caractériser le potentiel PE des substances chimiques afin d'en évaluer les dangers et les risques. Nos premiers travaux se sont focalisés sur les propriétés œstrogènes mimétiques des polluants et leurs effets sur la reproduction chez le poisson. Ces substances qui sont le plus souvent incriminées dans les désordres de la reproduction observés chez les populations sauvages sont capables de mimer l'action des œstrogènes en se liant comme agonistes aux récepteurs des œstrogènes. À l'aide de modèles cellulaires (e.g. cellules MELN développées par l'Unité Inserm 439) il nous a été possible de caractériser l'affinité des xénobiotiques pour les récepteurs des œstrogènes (RE) et de déterminer le potentiel œstrogénique d'échantillons environnementaux de sédiments [1] et d'eaux de surface [2]. Chez les poissons, l'exposition à des molécules agonistes des RE se traduit par une altération de la synthèse de protéines sous contrôle hormonal. Par exemple, une induction de l'expression de la vitellogénine (Vtg) normalement absente chez les mâles et les juvéniles témoigne de l'exposition présente ou passée de ces poissons à un ou plusieurs polluants œstrogènes mimétiques. Dans ce domaine, nous avons développé plusieurs méthodes immuno-enzymatiques de mesure de la Vtg chez différentes espèces de poisson. [3-5] Ces outils permettent la conduite d'études *in vitro* sur culture primaire

NOTES

1 - TBT: tributylétain

d'hépatocytes de truite ou *in vivo* chez des poissons exposés en conditions contrôlées à des toxiques [6] ou prélevés *in situ* afin de diagnostiquer l'impact environnemental de ces substances sur les populations autochtones [7].

DES MÉCANISMES D'ACTION MULTIPLES

Les mécanismes d'action des PE sont multiples et afin de mieux considérer ces divers modes d'actions, nos travaux se sont orientés plus récemment vers l'étude des effets des PE sur la stéroïdogénèse. La stéroïdogénèse est le processus par lequel les hormones stéroïdiennes sont synthétisées. Parmi les enzymes qui sont impliquées dans la biosynthèse hormonale, le cytochrome P450 aromatase joue un rôle clé puisqu'il est responsable de la conversion irréversible des androgènes en œstrogènes. Il joue un rôle majeur dans la différenciation sexuelle et la reproduction. De plus, son expression dans le système nerveux central jouerait un rôle majeur dans la neurogénèse. Les travaux menés chez le poisson confirment que dans notre modèle d'étude, le poisson-zèbre, espèce préconisée pour la réalisation des tests *in vivo*, il existe deux isoformes de l'aromatase, l'aromatase gonadique (AroA) et l'aromatase cérébrale (AroB). Dans le cerveau des adultes, l'expression du gène, de la protéine AroB ainsi que les activités d'aromatase sont particulièrement élevées comparativement aux ovaires confirmant que le cerveau est le siège d'une synthèse importante de neuro-œstrogènes [8, 9]. Au-delà de ces informations d'ordre physiologique, nos travaux montrent que diverses classes de molécules sont capables de perturber les expressions et les activités d'aromatase cérébrales et gonadiques. Ainsi, à l'aide d'un test *in vitro*, nous avons caractérisé le potentiel inhibiteur des activités d'aromatase de plusieurs pesticides parmi lesquels les pesticides

possédant un noyau imidazole tels que le clotrimazole, le propiconazole ou le fenbuconazole se sont avérés être les plus actifs [10]. *In vivo*, le clotrimazole induit des effets plus complexes qui sont à la fois dépendants du tissu cible étudié et de la concentration d'exposition, les effets sur les gènes ne reflétant pas nécessairement les effets observés au niveau enzymatique. Outre les pesticides imidazolés, les œstrogènes (i.e. œstradiol) et certains œstrogènes mimétiques (i.e. nonylphenol) altèrent les expressions des aromatases.

DES EFFETS INDUCTEURS

Dans le cerveau, ils sont capables d'induire l'expression du gène et de la protéine AroB (figure 1) par un mécanisme qui implique des récepteurs des œstrogènes fonctionnels [9, 11, 12]. Ces effets inducteurs sont particulièrement forts chez les larves chez qui la mesure de l'induction de l'aromatase B constitue un marqueur biologique d'exposition des composés œstrogéniques mimétiques. Chez les adultes exposés à ces mêmes substances, les effets inducteurs de l'AroB sont moins marqués et l'on observe des inhibitions de l'aromatase ovarienne démontrant des effets tissu spécifiques de ces molécules et, par là même, la complémentarité

des mesures des aromatases dans ces deux tissus. L'ensemble des informations acquises permet de conclure que les P450 aromatases sont des cibles moléculaires et biochimiques des PE. Les mesures d'expression et d'activité enzymatiques dans le cerveau et les gonades permettent de mieux appréhender les multiples mécanismes d'action des PE. Toutefois, il reste nécessaire, d'une part, de mieux cerner les mécanismes de régulation de l'aromatase (en particulier dans les ovaires) et, d'autre part, de déterminer les conséquences de ces perturbations sur la physiologie et la reproduction des individus. Par ailleurs, la stéroïdogénèse étant supportée par une cascade d'enzymes et les PE pouvant potentiellement agir sur chacune d'elles, ces travaux doivent être complétés par l'étude des interactions des PE avec d'autres enzymes impliquées dans la stéroïdogénèse. Nous avons récemment initié des travaux dans ce sens, travaux montrant que les œstrogènes perturbent l'expression testiculaire du gène qui code pour le cytochrome P450c17 dont le rôle est de synthétiser un précurseur essentiel à la biosynthèse des androgènes et des œstrogènes. Nos travaux ouvrent donc de nombreuses perspectives de recherche et trouvent également leurs applications dans



2

Échantillonnage des poissons dans les rivières artificielles (mésocosme) de l'INERIS.

RÉFÉRENCES

- [1] Michallet-Ferrier P, Ait-Aïssa S., Dominik J., Haffner G.D., Balaguer P. and Pardos M. (2004). "Assessment of estrogen (ER) and aryl hydrocarbon receptor (AhR) mediated activities in organic sediment extracts of the Detroit River, using MELN and PLHC-1 *in vitro* assays". *Journal of Great Lakes Research*, 30(1): 82-92.
- [2] Ait-Aïssa S., Flammarion P., Balaguer P., Siret C., Noury P., Brion F. and Porcher J.M. (2002). "In vitro estrogenic and dioxin-like activities in French river waters: correlation with *in vivo* biomarkers induction in inhabiting fishes". SETAC-EUROPE, Vienne, May 2002.
- [3] Brion F., Rogerieux F., Noury P., Migeon B., Flammarion P., Thybaud E., Porcher J.M. (2000). "Two step purification of vitellogenin from three teleost fish species: rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), gudgeon (*Gobio gobio*) and chub (*Leuciscus cephalus*)". *Journal of Chromatography B*, 737, 3-12.
- [4] Nilsen B.M., Berg K., Eidem J.K., Kristiansen S.I., Brion F., Porcher J.M., Goksøyr, A. (2004). "Development of Quantitative Vitellogenin ELISAs for fish test species used in endocrine disruptor screening". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378: 621-633.
- [5] Brion F., Nilsen B.M., Eidem J.K., Goksøyr A., Porcher J.M. (2002). "Development and validation of an ELISA to measure vitellogenin in the zebrafish (*Danio rerio*)". *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21, 1699-1708.
- [6] Brion F., Porcher J.M., Bazzon M., Gondelle F., Cornu L., Gillet C., Garric J., Flammarion P., Thybaud E. (1999). "Vitellogenin induction in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after long term water exposure to 4-Nonylphenol and 17 β -estradiol". Conférence internationale sur les perturbateurs endocriniens, 7-8 octobre 1999, Nantes, France.
- [7] Flammarion P., Brion F., Palazzi X., Babut M., Garric J., Migeon B., Noury P., Thybaud E., Tyler C. R. (2000). "Estrogenic effects on chub (*Leuciscus cephalus*): induction of vitellogenin and effects on the testicular structure". *Ecotoxicology*, 9, 127-135.
- [8] Hinfray N. (2006). « Étude de l'expression des cytochromes P450 aromatasés comme marqueur biologiques d'une perturbation endocrinienne chez le poisson. » Thèse de doctorat, 135 p. + annexes.
- [9] Hinfray N., Palluel O., Turies C., Cousin C., Porcher J.M., Brion F. (2006b). "Brain and gonadal aromatase as potential targets of endocrine disrupting chemicals in a model species, the zebrafish (*Danio rerio*)". *Environmental Toxicology*, 21(4): 332-337.
- [10] Hinfray N., Porcher J.M., Brion F. (2006c). "Inhibition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) P450 aromatase activities in brain and ovarian microsomes by various environmental substances". *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 144 (3): 252-262.
- [11] Menuet A., Pellegrini E., Brion F., Gueguen M.M., Dujardin T., Anglade I., Marmignon M.H., Pakdel F. and Kah O. (2005). "Expression and estrogen-dependent regulation of the zebrafish brain aromatase gene". *Journal of Comparative Neurology* 485(4): 304-320.
- [12] Hinfray N., Palluel O., Porcher J.M., Kah O., Pakdel F., Brion F. (2006a). "The xeno-estrogen nonylphenol affects brain and ovarian aromatase expression in the zebrafish (*Danio rerio*)". 2nd International conference on Molecular Research in Environmental Medicine, Paris, 7-8 September 2006.
- [13] Sanchez W., Ait-Aïssa S., Palluel O., Ditche J.M., Porcher J.M. (2007). "Preliminary investigation of multi-biomarker responses in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) sampled in contaminated streams". *Ecotoxicology* 16: 279-287.

l'élaboration de la stratégie d'évaluation des risques des PE. Ces applications sont rendues nécessaires par le règlement REACH qui introduit la notion d'autorisation pour les substances possédant ce type de propriété perturbatrice du système endocrinien. Sous l'égide de l'OCDE, des tests *in vitro* et *in vivo* sont en cours de développement afin de caractériser les propriétés PE des substances chimiques. Chez les poissons, les tests actuellement en cours de validation, préconisent la mesure de l'induction de la Vtg chez le mâle afin de déterminer le potentiel œstrogène mimétique des substances. Dans ce cadre, l'INERIS a pris en charge un exercice d'inter-calibration international de la mesure de la vitellogénine chez le poisson-zèbre. Par ailleurs, nos travaux sur les mesures des aromatasés chez le poisson-zèbre espèce préconisée pour la réalisation des tests *in vivo*, pourraient avantageusement venir compléter les mesures de vitellogénine afin de prendre en compte d'autres modes d'action des substances sur le système endocrinien.

MESURER UN ENSEMBLE DE VARIABLES BIOCHIMIQUES

Par ailleurs, la transposition des mesures des activités aromatasés chez des espèces autochtones des rivières françaises (chevaine, gardon, épinoche) est actuellement en cours et vise à déterminer dans quelle mesure ces activités peuvent constituer des marqueurs biologiques d'une perturbation endocrinienne. Elle participe à une démarche qui consiste à mesurer chez le poisson un ensemble de variables biochimiques (biomarqueurs) apte à fonder un diagnostic sur la qualité des milieux aquatiques^[13]. Ces mesures utilisables dans une perspective de biosurveillance sont en cours d'évaluation en partenariat avec le Conseil Supérieur de la Pêche. Ces études permettent de confronter les mesures de biomarqueurs chez le poisson aux indices écologiques (indice poisson en rivière, IPR réalisé par le Conseil Supérieur de la Pêche et indice biologique global normalisé, IBGN) et ainsi d'envisager leur utilisation en routine dans le cadre de la directive-cadre sur l'eau qui impose un bon état chimique et écologique des milieux aquatiques.



SUMMARY

ECOTOXICOLOGY: EFFECTS OF ENDOCRINE DISRUPTORS ON REPRODUCTION IN FISH

In recent years, it has been shown that man-made chemicals and natural substances are able to disrupt the normal physiology and endocrinology of organisms. The presence of these compounds, termed endocrine-disrupting chemicals (EDCs), has been a major concern for more than 10 years. Given the risk posed by EDCs on the reproductive function of organisms, the ecotoxicological risk assessment unit of INERIS initiated at the end of the 1990s research programmes aimed at developing in vitro and in vivo biological tools to detect and to characterise the endocrine disrupting potency of chemicals in fish with a view to assessing the hazards and the risks of EDCs. Our work initially focused on an important class of EDCs, i.e. those acting as estrogens (xeno-estrogens). However, EDCs can affect the endocrine system through various pathways and action mechanisms. Therefore, with the aim of broadening our knowledge on the effects of EDCs on fish development and reproduction, more recently we have conducted research that aims to investigate the effect of several classes of chemical compounds, on P450 aromatase, an essential sex-related enzyme involved in the final rate-limiting conversion of androgens into estrogens. By conducting in vitro and in vivo experiments in our model fish species, the zebrafish, we demonstrated that a wide range of compounds such as xeno-estrogens, dioxins or pesticides were able to perturb aromatase expression and/or activities by acting at the transcriptional level or by modulating aromatase activities. While the biological significance of these molecular and biochemical effects on fish development and reproduction need to be determined, aromatase could be integrated in new or existing in vitro/ in vivo fish assays to assess potential aquatic organism endocrine activity in a testing strategy that is required particularly within REACH.