



**HAL**  
open science

## Les effets du clotrimazole sur la stéroïdogénèse testiculaire chez le poisson zèbre

Damien Baudiffier, François Brion, Nathalie Hinfray, Jean-Marc Porcher

► **To cite this version:**

Damien Baudiffier, François Brion, Nathalie Hinfray, Jean-Marc Porcher. Les effets du clotrimazole sur la stéroïdogénèse testiculaire chez le poisson zèbre. Rapport Scientifique INERIS, 2012, 2011-2012, pp.36-38. ineris-01869419

**HAL Id: ineris-01869419**

**<https://ineris.hal.science/ineris-01869419>**

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.

## Contributeurs



Damien Baudiffier



François Brion



Nathalie Hinfray



Jean-Marc Porcher

# LES EFFETS DU CLOTRIMAZOLE SUR LA STÉROÏDOGENÈSE TESTICULAIRE CHEZ LE POISSON ZÈBRE

Il est aujourd'hui clairement admis que des composés chimiques, d'origine naturelle ou de synthèse, présents dans les milieux aquatiques sont capables de perturber l'endocrinologie et l'homéostasie des organismes. Ces substances, appelées perturbateurs endocriniens (PE), représentent un large éventail de contaminants de l'environnement, qui interfèrent avec le système endocrinien *via* de multiples modes d'action. Au cours des dernières décennies, de nombreux travaux ont permis de montrer que ces produits chimiques peuvent agir comme des agonistes des récepteurs des hormones stéroïdiennes et induire des effets biologiques similaires à ceux des hormones endogènes. C'est le cas de nombreux produits chimiques comme, par exemple, les alkylphénols ou le bisphénol A, qui miment l'action des œstrogènes et induisent des effets féminisants. Toutefois, d'autres mécanismes peuvent rendre compte de la perturbation endocrinienne chez les organismes aquatiques. En particulier, on sait que les PE peuvent agir sur les cytochromes P450 impliqués dans la stéroïdogénèse. La stéroïdogénèse est le processus responsable de la biosynthèse des hormones stéroïdiennes telles que les œstrogènes et les androgènes, qui jouent un rôle

## Références

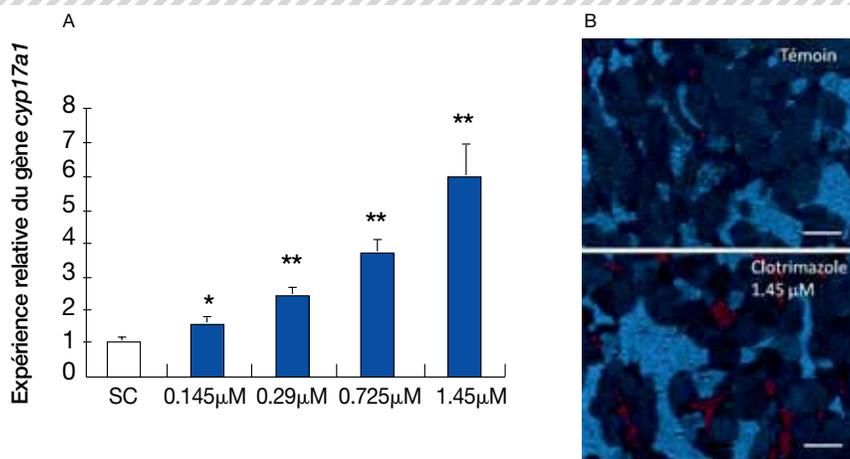
▲ Hinfray N., Porcher J. M., Brion F. *Inhibition of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) P450 aromatase activities in brain and ovarian microsomes by various environmental substances*. Comparative Biochemistry and Physiology C, 2006, 144 (3), pp. 252-262.

● Leal M. C., de Waal P. P., García-López A., Chen S. X., Bogerd J., Schulz R.W. *Zebrafish primary testis tissue culture: an approach to study testis function ex vivo*. General and Comparative Endocrinology, 2009, 162(2), pp. 134-138.

● Schulz R. W., de França L. R., Lareyre J.-J., Le Gac F., Chiarini-García H., Nobrega R. H., Miura T. *Spermatogenesis in fish*. General and Comparative Endocrinology, 2010, 165 (3), pp. 390-411.

Baudiffier D., Hinfray N., Vosges M., Creusot N., Chadili E., Porcher J. M., Schulz R. W., Brion F. *A critical role of follicle-stimulating hormone (Fsh) in mediating the effect of clotrimazole on testicular steroidogenesis in adult zebrafish*. Toxicology, 2012, 298 (1-3), pp. 30-39.

Hinfray N., Baudiffier D., Leal M. C., Porcher J. M., Aït-Aïssa S., Le Gac F., Schulz R. W., Brion F. *Characterization of testicular expression of P450 17 $\alpha$ -hydroxylase, 17,20-lyase in zebrafish and its perturbation by the pharmaceutical fungicide clotrimazole*. General and Comparative Endocrinology, 2011, 174 (3), pp. 309-317.



**Figure 1**

Induction concentration-dépendante de l'expression testiculaire du gène *cyp17a1* (A) et de la protéine P450c17 dans les cellules de Leydig (B) de poisson zèbre après sept jours d'exposition au clotrimazole.

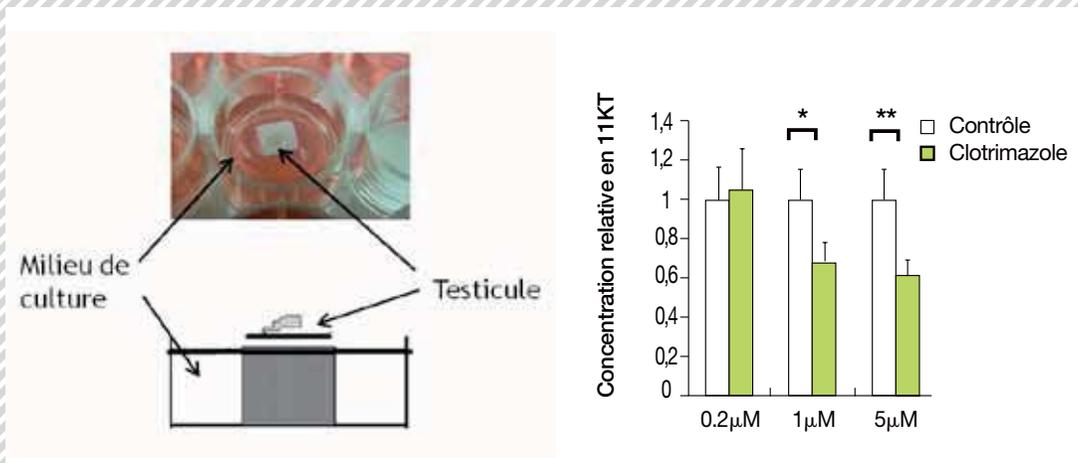
prépondérant dans le développement et la reproduction. Parmi les substances chimiques connues pour agir sur les cytochromes P450, impliqués dans la biosynthèse hormonale, figurent les azoles [A]. Cette famille de molécules regroupe des composés qui sont utilisés dans diverses applications comme agents antifongiques en agriculture, en médecine humaine et vétérinaire. Bien que l'occurrence environnementale de ces composés soit peu renseignée, des études récentes montrent que des azoles tels que le propiconazole, le tebuconazole, le prochloraz ou encore le clotrimazole sont présents dans les effluents de station d'épuration ainsi que dans les eaux de surface. Cependant, les mécanismes et effets *in vivo* de ces composés sur le système endocrinien et la reproduction des poissons sont peu renseignés. Dans ce contexte, nous nous sommes spécifiquement intéressés aux effets du clotrimazole, une substance pharmaceutique utilisée dans le traitement des mycoses vaginales, sur la stéroïdogénèse testiculaire et la biosynthèse d'androgènes. Pour ce faire, une série d'expérimentations combinant des modèles *in vivo* et *in vitro* a été menée chez une espèce modèle largement utilisée en toxicologie et en écotoxicologie, le poisson zèbre (*Danio rerio*).

*In vivo*, l'exposition de poissons mâles au clotrimazole induit une augmentation concentration-dépendante de l'expression de gènes et de protéines de la stéroïdogénèse testiculaire **figure 1**. Il s'agit des gènes *cyp17a1* et *cyp11c1*, codant respectivement pour le cytochrome P450c17  $\alpha$ -hydroxylase 17,20 lyase et le P450 11  $\beta$ -hydroxylase qui sont directement impliqués dans la synthèse de 11 kéto-testostérone (11KT), un puissant androgène 11-oxygéné chez les poissons. Au niveau cellulaire, l'induction de ces P450 est localisée dans les cellules de Leydig, des cellules interstitielles qui supportent la synthèse hormonale dans les testicules. Afin de déterminer si le clotrimazole agit directement sur la gonade pour réguler la stéroïdogénèse, nous avons utilisé un modèle d'explants de testicules de poissons zèbres. Il s'agit d'un modèle développé par Rüdiger Schulz à l'université d'Utrecht (Pays-Bas), qui consiste à cultiver *in vitro* des testicules pour étudier la stéroïdogénèse et la spermatogénèse en dehors de toutes régulations extragonadiques **[B]**. Dans notre étude, ce modèle a été utilisé pour exposer *in vitro*

les testicules à des concentrations croissantes de clotrimazole. Après une semaine de culture, nous avons montré que, contrairement aux expositions *in vivo*, le clotrimazole n'affecte pas l'expression des gènes de la stéroïdogénèse. Par contre, il inhibe la synthèse d'androgène **figure 2**. Cette faculté de perturber la synthèse d'androgène *in vitro* n'est pas restreinte au clotrimazole, mais s'observe aussi pour d'autres composés azolés comme le propiconazole, le fenbuconazole ou le kétoconazole.

Les différences observées entre les expériences *in vivo* et *in vitro* suggèrent que le clotrimazole n'agit pas directement sur les testicules pour réguler la transcription et la synthèse des gènes et protéines de la stéroïdogénèse. Toutefois, il agit directement sur les testicules pour perturber la synthèse d'androgène.

*In vivo*, l'induction des gènes de la stéroïdogénèse est interprétée comme une réponse compensatoire aux inhibitions de la synthèse d'androgènes et impliquerait des régulations au niveau hypophysaire. Chez les vertébrés, la stéroïdogénèse gonadique est sous le contrôle de l'axe hypothalamo-hypophysaire. Les hormones pituitaires LH (hormone lutéinisante) et FSH (hormone folliculo-stimulante) régulent la stéroïdogénèse et la gamétogénèse en interagissant avec leur récepteur gonadique. Pour étudier les effets du clotrimazole sur l'axe hypophyse-gonade, les expressions d'un ensemble de gènes cibles ont été mesurées suite à des expositions *in vivo*. Au niveau hypophysaire, le clotrimazole induit l'expression du gène codant pour la sous-unité bêta de FSH, qui est connu pour réguler positivement la stéroïdogénèse chez les poissons **[C]**. Au niveau testiculaire, l'expression du récepteur de la FSH (FSHR) est induite et est significativement corrélée à l'expression des gènes de la stéroïdogénèse. De même, le gène *igf3* codant pour un facteur de croissance, qui s'exprime spécifiquement dans les cellules de Sertoli et qui est régulé par la FSH, est induit. L'ensemble de ces données montrent que la voie de signalisation FSH/FSHR est impliquée dans les altérations testiculaires induites par le clotrimazole. Outre ces modifications moléculaires et cellulaires, l'exposition au clotrimazole induit également des modifications tissulaires. En effet, ➡



**Figure 2**

Culture d'explant de testicule de poisson zèbre et effet du clotrimazole sur les concentrations en androgène (11 KT) mesurées dans le milieu de culture après six jours.

➔ une prolifération des cellules de Leydig dans l'espace interstitiel du testicule, s'accompagnant d'une augmentation du rapport gonado-somatique, a été observée. Cette typologie de réponse histologique et tissulaire n'est pas restreinte au clotrimazole, mais a été observée avec d'autres composés azolés à usage pharmaceutique.

En conclusion, nos travaux ont permis de montrer que le clotrimazole était capable d'agir sur le système endocrinien en altérant la stéroïdogénèse gonadique et la biosynthèse hormonale, selon un mécanisme original faisant intervenir des perturbations au niveau hypophysaire. Nous montrons l'intérêt d'une démarche expérimentale combinant des modèles *in vitro* sur culture d'explants de testicules, et *in vivo* sur des organismes entiers et la mesure d'un ensemble de gènes fonctionnels de l'axe hypophyse-gonade, pour caractériser le mode d'action et les effets perturbateurs endocriniens du clotrimazole. Cette approche pourrait être étendue à d'autres composés azolés qui contaminent le milieu aquatique ainsi qu'à d'autres substances chimiques, en vue de caractériser leur potentiel PE. ●

#### Remerciements

Programme PI90NEMO du ministère de l'Écologie, du Développement durable et de l'Énergie.

#### Collaborations

Rüdiger Schulz, université d'Utrecht, Pays-Bas; Alexis Fostier, INRA-LPGP, Rennes.

## Abstract

Clotrimazole (CLO) is a pharmaceutical fungicide that has been recently detected in aquatic environment but little is known about its endocrine disrupting potency in fish. *In vivo* exposures of male zebrafish to CLO led to inductions of steroidogenic gene and protein expressions. Using zebrafish testicular explant culture, no effect of CLO was observed on transcript levels of steroidogenic enzymes but it inhibited

11 ketotestosterone (11-KT) release in the medium. It suggests that CLO does not act directly on testis. Induction of these genes could be interpreted as a compensatory biological response to inhibition of cytochrome P-450 dependent steroidogenic enzymes. To support this hypothesis, a network of functional genes of the pituitary-gonad axis was used. We showed that CLO induce a cascade of molecular events in pituitary and testes. Transcript levels of genes encoding for folliculo-stimulating hormone (FSH),

testicular FSH receptor and steroidogenic enzymes were induced. These molecular events are consistent with the involvement of FSH in inducing steroidogenic gene expressions to compensate the inhibitory action of CLO on 11-KT synthesis. Our study highlights the relevance of studying a network of genes of the pituitary-gonad axis to investigate the mode of action of compounds acting as inhibitor of P450-steroidogenic enzymes.