

**PROGRAMME
NATIONAL DE RECHERCHE
SUR LES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS**

PNRPE

WORKSHOP
Angers 10 Mars 2008

Synthèse des interventions

Odile Robert

Coordination & Organisation

Pierre Vaiss (MEEDDAT), Myriam Leveugle (CNRS)



SOMMAIRE

Le programme national sur les perturbateurs endocriniens.....	page 2
Comité d'orientation et Conseil scientifique du PNRPE	page 3
Programme du Workshop	
Expositions gestationnelles et postnatales à la génistéine et à la vinclozoline, Jacques Auger	page 5
Impact des expositions au chlordécone sur le développement intra-utérin et postnatal, Luc Multigner	page 11
Évaluation des effets endocrines des oestrogènes mimétiques et des composés à activité dioxine sur l'expression de gènes ciblés et impacts fonctionnels sur la reproduction chez le poisson, François Brion	page 15
Syndrome de dysgénéésie testiculaire, conséquence présumée d'une perturbation endocrinienne, Jorma Toppari	page 21
Évaluation de l'impact des perturbateurs endocriniens sur les milieux aquatiques, Jean-Marc Porcher	page 24
Développement d'un test physiologique "in vivo" rapide sur les embryons amphibiens pour mesurer les effets de perturbations thyroïdiennes, Barbara Demeneix	page 28
Identification de biomarqueurs protéiques de la perturbation endocrinienne aux différents stades de développement du poisson Medaka - Mise au point d'un test de criblage corrélé aux essais réglementaires en voie de développement, Charles Pineau	page 31
Fipronil et retardeurs de flamme polybromés : exposition et altération des fonctions thyroïdienne et corticosurrénaliennne, Catherine Viguié	page 34
Dix années de mélanges de perturbateurs endocriniens – Où en est-on ? Andrea Kortenkamp	page 38
Coordonnées	
Partenaires	page 39
Coordination, Organisation & synthèse	page 40

Le programme national sur les perturbateurs endocriniens

La prise de conscience de la présence dans l'environnement de substances susceptibles de perturber les systèmes endocriniens des animaux et éventuellement des humains s'est imposée depuis le début des années 1990. C'est à cette époque qu'ont été publiées plusieurs études sur le déclin de la qualité du sperme, l'augmentation de la fréquence de certaines anomalies du développement du tractus génital, ainsi que l'augmentation de l'incidence de certaines pathologies hormono-dépendantes chez les humains. Simultanément, des anomalies du système reproducteur de diverses espèces de poissons vivant dans des rivières recevant des eaux résiduaires ont été observées. D'autres études, sur les reptiles et les gastéropodes notamment, confortent l'idée d'effets sur la reproduction. Les substances à l'origine de ces perturbations biologiques sont communément désignées sous le terme de « Perturbateurs Endocriniens » pour lesquels l'Union Européenne a adopté en 1999 la définition suivante: "un perturbateur endocrinien (PE) est une substance ou un mélange exogène altérant les fonctions du système endocrinien et induisant donc des effets nocifs sur la santé d'un organisme intact, de ses descendants ou sous-populations". Si les effets sur la reproduction sont historiquement les premiers à avoir été observés, d'autres l'ont été par exemple sur le fonctionnement thyroïdien.

Le Programme National sur les Perturbateurs Endocriniens (PNRPE) mis en place par le Ministère de l'Ecologie, du Développement Durable et de l'Aménagement du Territoire a lancé en 2005 un appel à propositions de recherche (APR) qui couvre l'ensemble des effets des perturbations endocriniennes au sens large. Le PNRPE vise donc, en appui aux pouvoirs publics, à soutenir des recherches fondamentales et appliquées à caractère pluridisciplinaire selon les axes prioritaires suivants : méthodologies de criblage, mécanismes d'action, recherche de biomarqueurs d'effets, devenir dans l'organisme et dans les milieux des perturbateurs endocriniens, identification des dangers, évaluation des risques, surveillance et processus politiques et sociaux à l'œuvre sur cette thématique

L'objectif de ce programme en appui aux politiques publiques est de favoriser le dialogue tri-

partite entre les pouvoirs publics, les scientifiques et les industriels impliqués dans les recherches sur les perturbateurs endocriniens.

Ce workshop, qui fait le point à mi-parcours des recherches conduites dans le cadre de ce premier APR, a réuni les porteurs de projets et leurs partenaires, les membres du Conseil scientifique et les membres du Conseil d'orientation du programme. Ce séminaire de travail sur les résultats partiels des équipes a permis une rencontre utile aux équipes par les discussions et les interactions avec les membres du Conseil scientifique et du comité d'orientation. Les principaux thèmes abordés au cours de ce séminaire relèvent du criblage, des mécanismes d'action, du devenir dans l'organisme et dans les milieux des perturbateurs, et de l'évaluation des risques, de l'épidémiologie, de l'écotoxicologie et de la surveillance de l'environnement.

Comité d'orientation du PNRPE

Présidé par le Chef du Service de la recherche au Ministère de l'Écologie, de l'Énergie, du Développement Durable et de l'Aménagement du Territoire (MEEDDAT), le Comité d'orientation se compose de représentants des directions concernées du MEEDDAT (DE, DPPR, D4E), de l'Agence de l'Eau Seine-Normandie, des Ministères chargés de la recherche et de la technologie ainsi que de la santé, de l'ADEME, de l'AFSSET, de l'Association ECRIN, de représentants de l'industrie et du Président du Conseil scientifique.

Conseil scientifique du PNRPE

En mars 2008, il se compose de :

JÉGOU Bernard, Président (INSERM Rennes)

APPLANAT Martine (CNRS)

BABUT Marc (CEMAGREF)

BALAGUER Patrick (INSERM)

BENNETAU Catherine (ENITAB Bordeaux)

BOURGUIGNON Jean-Pierre (Liège, Belgique)

CAQUET Thierry (INRA)

CHAGNON Marie-Christine (ENS Biologie Appliquée Nutrition et Alimentation, Dijon)

CRAVEDI Jean-Pierre (INRA)

CORDIER Sylvaine (INSERM)

DEMENEIX Barbara (CNRS, Muséum national d'histoire naturelle)

DEVILLERS James (CTIS)

FASANO Sylvia (Naples, Italie)

FEIGE Jean-Jacques (INSERM, CEA)

JESSUS Catherine (CNRS)

JOUANNET Pierre (Université CHU Cochin, Paris)

LEVI Yves (Université Pharmacie Chatenay-Malabry)

MONOD Gilles (INRA)

OLEA Nicolas (Grenade, Espagne)

PALLARDY Marc (Toxicologie, Université Paris-Sud)

PORCHER Jean-Marc (INERIS)

RAJPERT-DE MEYTS Ewa (Copenhage, Danemark)

SLAMA Rémy (INSERM)

ZENNARO Maria-Christina (INSERM)

Programme du Workshop

Allocution de bienvenue

Catherine Mouneyrac, Université catholique d'Angers

Introduction

Anne Lieutaud représentant Éric Vindimian, chef du service de la recherche, MEEDDAT

Accueil du Président du Comité scientifique du PNRPE

Bernard Jégou, Inserm Rennes

Présentations scientifiques

Jacques Auger, ADV Paris V Sainte Anne - INSERM Paris

Expositions gestationnelles et postnatales à la génistéine et à la vinclozoline, seules et en association, à des doses compatibles avec l'exposition alimentaire humaine chez le rongeur : Effets à différents stades du développement, identification des mécanismes d'action au niveau de plusieurs tissus et organes cible, devenir des substances dans l'organisme

Luc Multigner, Groupe d'étude de la reproduction chez l'homme et les mammifères (GERHM) - Unité 625 - INSERM, Rennes

Impact des expositions au chlordécone sur le développement intra-utérin et postnatal

François Brion, Unité d'Évaluation des Risques Écotoxicologiques - INERIS, Verneuil en Halatte

Évaluation des effets endocrines des oestrogènes mimétiques et des composés à activité dioxine sur l'expression de gènes ciblés et impacts fonctionnels sur la reproduction chez le poisson

Jorma Toppari, University of Turku, Finland

Syndrome de dysgénésie testiculaire, conséquence présumée d'une perturbation endocrinienne

Jean-Marc Porcher, Unité d'Évaluation des Risques Écotoxicologiques - INERIS, Verneuil en Halatte

Évaluation de l'impact des perturbateurs endocriniens sur les milieux aquatiques

Barbara Demeneix, Évolution des régulations endocriniennes - UMR 5166 - CNRS/Museum National d'Histoire Naturelle, Paris

Développement d'un test physiologique "in vivo" rapide sur les embryons amphibiens pour mesurer les effets de perturbations thyroïdiennes

Charles Pineau, UPRES JE 2459, Acteurs moléculaires de la spermatogenèse, Rennes

Identification de biomarqueurs protéiques de la perturbation endocrinienne aux différents stades de développement du poisson Medaka - Mise au point d'un test de criblage corrélé aux essais réglementaires en voie de développement

Catherine Viguié, UMR 181 INRA, École Nationale Vétérinaire, Toulouse

Fipronil et retardeurs de flamme polybromés : exposition et altération des fonctions thyroïdienne et corticosurrénalienne

Andrea Kortenkamp, Centre for Toxicology, The School of Pharmacy, London, UK

Dix années de mélanges de perturbateurs endocriniens – Où en est-on ?

Clôture du Workshop

Anne Lieutaud & Bernard Jégou

Expositions gestationnelles et postnatales à la génistéine et à la vinclozoline, seules et en association, à des doses compatibles avec l'exposition alimentaire humaine chez le rongeur : effets à différents stades du développement, identification des mécanismes d'action au niveau de plusieurs tissus et organes cibles, devenir des substances dans l'organisme

Jacques Auger

Hôpital Cochin, Paris

Pour mieux évaluer le risque et comprendre les mécanismes des perturbateurs endocriniens (PE), notre groupe constitué de six équipes a mis au point un modèle d'exposition animale s'approchant des conditions d'exposition humaine. Ce modèle qui ne saurait refléter parfaitement la situation humaine s'appuie sur le postulat suivant : Tout PE dont la pharmacocinétique et le métabolisme entraînent une distribu-

tion générale dans l'organisme est susceptible de perturber les effets des hormones sur les tissus qu'elles régulent ; l'importance de cette perturbation est probablement fonction de l'association de ces composés notamment au niveau de l'alimentation, et du caractère continu de l'exposition.

Notre groupe a choisi d'étudier deux PE pouvant se trouver associés dans l'alimentation humaine, un phyto-oestrogène présent dans les légumineuses et le soja, la génistéine et un contaminant alimentaire reconnu, la vinclozoline, fongicide anti-androgénique (Tableau 1). Un nombre croissant d'études utilisant des doses et des fenêtres d'exposition souvent éloignées des conditions d'exposition humaine indique que la génistéine et la vinclozoline exercent des effets non seulement sur le développement, l'intégrité et la fonction de certains organes (organes reproducteurs, glande mammaire) mais aussi sur le comportement. Cependant, l'effet de ces molécules sur d'autres organes cibles potentiels et les mécanismes sous-jacents ne sont pas tous élucidés.

Tableau 1 : Principales caractéristiques de la génistéine et de la vinclozoline et effets sur l'axe reproducteur

Génistéine	Vinclozoline
<ul style="list-style-type: none">- phyto-oestrogène majeur du soja- diversité des effets hormonaux:<ul style="list-style-type: none">• oestrogénique• anti-androgénique (<i>in vitro</i>)• antithyroïdien (enfants)- <u>Expérimentation à fortes doses</u> :<ul style="list-style-type: none">• exposition adulte:<ul style="list-style-type: none">- altération de la fertilité mâle et femelle- action sur prolifération tumorale mammaire et colique• exposition foetale et /ou neonatale:<ul style="list-style-type: none">- altération de la reproduction mâle- altération de la morphogenèse mammaire- cancer de l'utérus	<ul style="list-style-type: none">- fongicide (céréales, vergers)- diversité des effets hormonaux:<ul style="list-style-type: none">• anti-androgénique• oestrogénique (métabolites)• autre?- <u>Expérimentation à fortes doses</u> :<ul style="list-style-type: none">• exposition adulte:<ul style="list-style-type: none">- altération de la fertilité mâle et femelle- effets carcinogène?• exposition foetale et/ou neonatale:<ul style="list-style-type: none">- altération de la reproduction mâle- altération de la morphogenèse mammaire ou autre ?

Colloque PNRPE - MEDD 3/10/2006

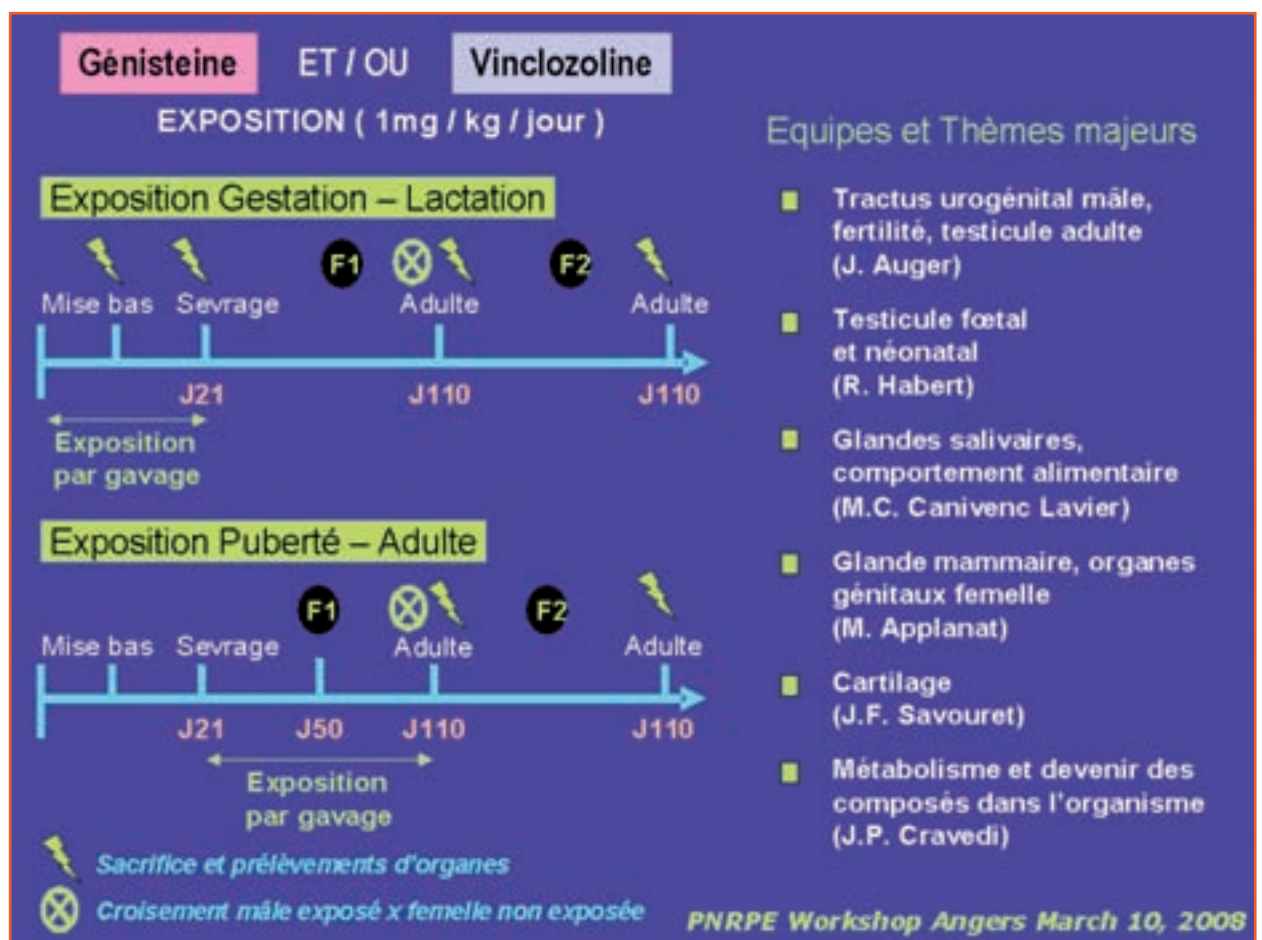
Introduction

Une première étude menée dans le groupe de Jacques Auger chez le rat, dans des conditions proches de l'exposition humaine (de la conception à l'âge adulte, doses réputées sans effet, combinaison des deux molécules) a mis en évidence des altérations variées de la reproduction chez des rats mâles.

L'objectif principal de notre projet multidisciplinaire reprenant des schémas d'exposition similaires est l'étude des mécanismes d'action au niveau des appareils reproducteur mâle et femelle mais aussi d'autres tissus et organes cibles des hormones stéroïdiennes (glande mammaire, glandes salivaires, cartilage) par l'identification de biomarqueurs hormonaux (RA, RE, protéines tumorales,...), apoptotiques (caspase 3, DOX,...), ou morphogénétiques (kallitréines,...) selon que l'exposition concerne la gestation, la lactation ou la période adulte. Le projet s'appuie sur des modèles expérimentaux complémentaires (rat, souris KO, testicule fœtal en culture) et des méthodologies maîtrisées dans chacune des équipes (histologie, immunohistochimie, PCR quantitative, ...).

Concernant l'évaluation du risque, le modèle d'exposition continue chez le rat est reconduit en utilisant des doses encore plus faibles s'approchant des conditions d'alimentation humaine. Les possibles modulations du comportement et de la fertilité sont étudiées, ainsi que le devenir des molécules dans l'organisme.

Figure 1 : Schéma d'ensemble des protocoles d'exposition, équipes et thèmes de recherche



Programmes des six équipes

Equipe 1 Appareil génital mâle adulte & fertilité

J. Auger APHP - Paris

Une exposition permanente à des doses de génistéine compatibles avec certaines habitudes alimentaires humaines ET/OU à des doses de vinclozoline inférieures au NOAEL est susceptible d'affecter le développement de l'appareil génital et la fonction de reproduction du rat mâle. Les effets observés avec la combinaison des molécules à faibles doses sont notablement plus importants que ceux trouvés pour chacun des composés isolément à faible dose et au moins aussi importants qu'avec l'exposition combinée à fortes doses. C'est pour la combinaison des faibles doses que le plus d'anomalies de la reproduction ont été trouvées. Plusieurs travaux récents démontrent l'intérêt d'étudier la F2 (mâles non exposés issus du croisement des mâles F1 traités et non traités avec des femelles témoins).

Les résultats originaux de notre équipe portant sur les anomalies de la reproduction mâle acquis lors d'une exposition chronique à de faibles doses de génistéine et de vinclozoline de la conception à l'âge adulte à l'origine du présent programme multidisciplinaire nous ont incité à proposer une étude plus approfondie des fenêtres d'exposition (gestationnel-lactationnel vs puberté-adulte) et des mélanges à faibles doses :

- des effets observés sur l'appareil reproducteur mâle
- des modes d'action possibles.

En raison de restructuration de notre équipe, nous avons réorienté le programme de la manière suivante :

- maintien de toute l'approche classique de toxicologie de la reproduction et des études fonctionnelles,
- pour la recherche des modes d'action au niveau moléculaire, remplacement des approches morphométriques et immunohistochimiques proposées par des approches « omiques », transcriptomique et protéomique en collaboration notamment avec le groupe de Daniel Vaiman (Institut Cochin).

Résumé des données de toxicologie de la reproduction acquises lors des expérimentations de 2006 et 2007

D'une manière générale, les effets nocifs majeurs sur la production spermatique, les caractéristiques des gamètes ou plusieurs indices de fertilité observés avec une exposition continue aux mêmes doses, de la conception à l'âge adulte ne sont pas observés. Peu d'anomalies sont observées dans la F2. Cependant, en dépit des faibles doses administrées aux pères et de l'absence d'exposition de la F2, on note quelques anomalies du développement du tractus génital, en particulier pour la génistéine, et ce, pour des doses très inférieures à celles rapportées dans la littérature. Dans cette hypothèse, la conservation de fluides biologiques, tissus et organes de la reproduction prendra tout son intérêt pour différentes investigations « omiques ». L'exposition pendant la puberté et à l'âge adulte donne des résultats à l'âge adulte différents de ceux observés pour l'exposition gestation/lactation seule : les effets nocifs sur l'axe reproducteur de l'adulte sont assez frustes. On note cependant un poids relatif abaissé des épидидymes ou de la prostate. Les animaux issus de pères exposés de la puberté à l'âge adulte présentent globalement peu d'anomalies du développement ou d'anomalies de poids des organes. Il faut cependant noter des anomalies de la descente testiculaire pour trois animaux sur 20 dans le groupe GV contre 0 dans les autres groupes, un moindre poids à l'âge adulte pour les trois groupes issus de père traité et des caractéristiques du mouvement augmentées dans les groupes traités en comparaison avec le contrôle.

Afin d'étudier le retentissement des composés isolés ou associés et des fenêtres d'exposition sur le transcriptome testiculaire, une première étape a consisté à étudier les ARNm testiculaires dans les conditions d'exposition continue à partir d'organes conservés des expérimentations de 2002* . Cette approche sera poursuivie dans la seconde partie du programme pour étudier les organes reproducteurs des animaux F1 selon le mode d'exposition et chez les animaux de la F2.

*Collaboration avec D. Vaiman, une publication soumise à Environmental Health Perspectives : Florence Eustache, Françoise Mondon, Marie Chantal Canivenc-Lavier, Corinne Lesaffre, Yvonne Fulla, Raymond Berges, Jean Pierre Cravedi, Daniel Vaiman et Jacques Auger : Chronic Dietary Exposure to a Low-Dose Mixture of Genistein and Vinclozolin Modifies the Reproductive Axis, Testis Transcriptome and Fertility.

Equipe 2 : Testicule fœtal et néonatal

R. Habert INSERM U566/ CEA/ Univ Paris7

Ce programme vise à rechercher l'importance d'une intoxication à la génistéine et/ou à la vinclozoline pendant la vie intra utérine sur le développement du testicule et à analyser les voies d'action des stéroïdes dans ce processus.

Un sous-programme concerne la caractérisation des mécanismes d'action de la vinclozoline et de la génistéine sur le développement du testicule fœtal et néonatal en analysant l'implication des récepteurs des stéroïdes.

Nous avons identifié plusieurs spécificités majeures de l'action des androgènes dans le testicule fœtal en comparaison avec le testicule adulte :

- les androgènes ont un effet négatif sur la prolifération des cellules germinales fœtales alors qu'ils ont un effet positif sur la spermatogenèse adulte,
- le récepteur des androgènes est localisé dans les cellules germinales et est absent des cellules de Sertoli pendant la vie fœtale alors que c'est l'inverse chez l'adulte,
- les fonctions des cellules de Sertoli et de Leydig fœtales sont androgéno-indépendantes chez le fœtus et non chez l'adulte.

Ces spécificités peuvent expliquer pourquoi le testicule est particulièrement sensible pendant la vie fœtale aux anti-androgènes comme la vinclozoline.

Publications

Merlet J, Racine C, Moreau E, Moreno SG & Habert R (2007). Male fetal germ cells are targets for androgens which physiologically inhibit their proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104 : 3615-20

Merlet J, Moreau E, Habert R & Racine C (2007). Development of fetal testicular cells in androgen receptor deficient mice *Cell cycle* 2007 Jul;6(18):2258-62. Epub 2007 Jun 28.

Article de synthèse sur l'effet des perturbateurs endocriniens sur le développement du testicule fœtal :

Habert R, Lambrot R, Lécureuil C, Frydman R, Pairault C, Angenard G, Coffigny H & Rouiller-Fabre V (2007) Le testicule fœtal humain est-il la cible des perturbateurs endocriniens ? *Métabolisme, Hormones, Diabète et Nutrition* 3 : 119-124.

Equipe 3 : Glandes salivaires Comportement Alimentaire/Tractus génital femelle

M.C. Canivenc-Lavier - INRA Dijon

Cette équipe réalise les expositions alimentaires jusqu'au conditionnement et la distribution des échantillons biologiques pour les équipes 1,2, 3, et 4, et procède à des observations comportementales au cours de ces expositions. Elle participe à l'étude du développement de la glande mammaire et de reprotoxicité chez la femelle en collaboration avec l'équipe 4 et conduit des études de perceptions sensorielles et de comportement alimentaire propres à son axe de recherche.

Les premiers résultats obtenus tendent à montrer que :

- l'exposition à la génistéine et à la vinclozoline à des doses faibles n'a pas d'effets hautement significatifs sur les paramètres physiologiques régulés par les hormones sexuelles, en particulier sur les organes reproducteurs chez la femelle, mais des effets sont obtenus sur le développement de la glande mammaire (cf équipe 4)
- à ces mêmes doses considérées faibles, les deux molécules peuvent entraîner, administrées seules ou en mélange, une féminisation des comportements alimentaires des animaux mâles ; les effets se traduisent en particulier par une modification du comportement vis-à-vis des solutions sucrées et salées. Cet effet s'accompagne d'une action sur les glandes salivaires (morphologie) dont les produits de sécrétions sont impliqués dans les perceptions sensorielles et sont régulés par les hormones stéroïdiennes.

La deuxième phase de ce projet sera consacrée d'une part, à l'analyse moléculaire des glandes salivaires et, dans la mesure du possible, des organes associés à la perception sensorielle (cerveau, bourgeons gustatifs) et d'autre part, à l'analyse des facteurs impliqués dans la régulation endocrinienne du comportement alimentaire par le tissu adipeux (leptine, orexine).

Travaux en cours de publication et faisant l'objet de communications à des congrès internationaux :

Pascal Phrakhonkam, 2007, Actions différentielles de xeno-hormones alimentaires sur les organes reproducteurs, le foie et le tissu adipeux chez le rat femelle : aspects endocriniens, métaboliques et morphogénétiques. Thèse de Doctorat de l'Université de Dijon, France.

Raymond Bergès, Sylvie Issanchou and Marie-Chantal Canivenc-Lavier (2008). Xeno-hormone exposure during pregnancy and lactation modifies sweet preference of male but not of female offspring. (16th Annual Meeting of the Society for the Study of Ingestive Behavior, July 15-19, 2008 Paris, France).

Wided Khouidi, Raymond Bergès, Catherine Desmetz, Michele EL May, Jacques Auger and Marie-Chantal Canivenc-Lavier Genistein and/or vinclozolin neonatal exposures modify the submandibular nipple properties of male and female offsprings. (5th International Meeting on "Advances in antioxidants (trace elements, vitamins and polyphenols): Molecular mechanisms, nutritional and clinical aspects" 11-15 octobre 2008 Monastir-Sousse (Tunisie))

Equipe 4 : Glande mammaire / Tractus génital femelle

M. Applanat - INSERM U553/ Hôpital St Louis

L'équipe 4 a pour mission d'étudier, en collaboration avec l'équipe 3, les effets d'une exposition sur le développement, la différenciation et la vascularisation de la glande mammaire. Les deux premières années du projet ont eu pour objectif : 1) d'identifier l'action de la génistéine, la vinclozoline, et du mélange de ces composés administrés à faible doses *in utero* sur le développement de la glande mammaire à la puberté et 2) d'analyser la vascularisation.

Les principaux résultats ont été les suivants :

L'administration de vinclozoline et/ou du mélange vinclozoline-génistéine *in utero* induit des altérations du développement de la glande mammaire à la puberté. Deux types de techniques ont été utilisés (glande étalée, coupes histologiques de tissu). Des altérations de la morphogenèse sont visibles au niveau des structures épithéliales. Les altérations histologiques déjà visibles à J35 sont amplifiées à J50 avec le mélange des deux substances. Ces altérations sont associées, dans certains cas, avec un changement de réceptivité hormonale.

Les altérations observées peuvent être considérées comme la conséquence de la sensibilité de la glande mammaire au stade fœtal/neonatal.

Activation du facteur angiogénique VEGF par l'oestradiol et la génistéine *in vitro* :

En utilisant des approches pharmacologiques et moléculaires, nous avons montré la régulation transcriptionnelle du VEGF par l'oestradiol dans les cellules tumorales mammaires exprimant les récepteurs aux oestrogènes α et/ou β (Buteau-Lozano et al., Cancer Res. 2002). Dans une étude publiée récemment, nous montrons que certaines

substances, parmi lesquelles la génistéine, augmentent significativement l'expression du VEGF dans une lignée de tumeur mammaire humaine (Buteau-Lozano et al., 2008). La vinclozoline est inactive dans ces cellules.

La suite du projet sera consacrée à l'analyse d'autres marqueurs dans la glande mammaire.

Publications

H Buteau-Lozano, G Velasco, M Cristofari, P Balaguer and Perrot-Applanat M. Xenoestrogens modulate VEGF secretion in breast cancer cells through an ER-dependent mechanism. *J Endocrinol*, 2008, 196 :399-412

Equipe 5 : Cartilage

J.F. Savouret- INSERM UMR S-530 Univ Paris5

Des observations préliminaires suggèrent des effets des xénoestrogènes sur la morphogenèse du rachis de rat (Canivenc et Auger; données non publiées). Ces effets sont à rapprocher d'anomalies du rachis observées chez des souris transgéniques surexprimant PPAR β dans le cartilage. Dans le protocole présent, les rattes ont été traitées (1 mg/kg/jour) pendant toute la gestation et la lactation par la vinclozoline, la génistéine et le mélange des molécules (G, V, GV). Seules les portées exposées via la mère au cours de ces périodes ont été analysées. Les résultats préliminaires semblent confirmer un effet délétère de la vinclozoline sur le cartilage.

Equipe 6 : Métabolisme et devenir des molécules dans l'organisme

J.P. Cravedi Laboratoire des xénobiotiques INRA Toulouse

L'objectif de cette équipe est de déterminer avec précision la nature et la quantité des résidus de vinclozoline et de génistéine présents dans le lait dans le but d'établir un lien entre les doses d'exposition et les effets biologiques observés.

Les métabolites de la vinclozoline, M1 et M2, et la génistéine sont retrouvés dans le lait et dans le plasma de la mère exposée, suggérant que ces composés puissent être retrouvés chez le nourrisson lors d'une exposition à faibles doses de la mère allaitante. Les taux retrouvés sont différents selon que la molécule est administrée seule ou en mélange.

Conclusions à mi-parcours

Parmi les nombreux résultats intéressants obtenus par chacune des équipes, on notera particulièrement :

- La mise en évidence que des expositions à faibles doses à la génistéine (niveaux de l'alimentation) et/ou à la vinclozoline (à des doses inférieures au NOAEL) peuvent conduire à des anomalies dans plusieurs tissus et organes étudiés (anomalies parfois inattendues comme celles observées dans le cartilage),
- Des effets sur l'appareil génital et la fertilité mâle généralement plus prononcés lors d'une exposition pendant la période gestation/lactation que pendant la période puberté/adulte mais nettement moins marqués que lors d'une exposition continue de la conception à l'âge adulte,
- A la dose de 1mg/kg/j, des anomalies du développement sur l'appareil génital mâle observées à la génération F2 non exposée même lorsque l'exposition des pères a pris place pendant la période puberté/adulte, ce qui suggère l'implication de mécanismes épigénétiques,
- Le caractère synergique de la co-administration de génistéine et de vinclozoline,
- De faibles niveaux des métabolites de la vinclozoline, M1 et M2, et de génistéine retrouvés chez le nourrisson lors d'une exposition à faibles doses de la mère allaitante.

Pour la deuxième phase du programme, les équipes se concentrent désormais sur l'étude des mécanismes susceptibles de produire les effets observés en recourant à diverses approches moléculaires et cellulaires.

Nous espérons parvenir, à partir des travaux des six équipes, à une vision intégrée des effets sur la santé et des mécanismes sous-jacents d'une exposition chronique (seule ou combinée) et à des doses non pharmacologiques, à ces deux perturbateurs endocriniens.

Partenaires du projet

Jacques Auger

APHP Paris, Coordonnateur

Martine Applanat

INSERM U553/ Hôpital St Louis

Marie-Chantal Canivenc-Lavier

NRA Dijon

Jean-Pierre Cravedi

Laboratoire des xénobiotiques INRA Toulouse

René Habert

INSERM U566/ CEA/ Univ Paris7

Jean-François Savouret

INSERM UMR S-530 Univ Paris5

Impact des expositions au chlordécone sur le développement intra-utérin et postnatal

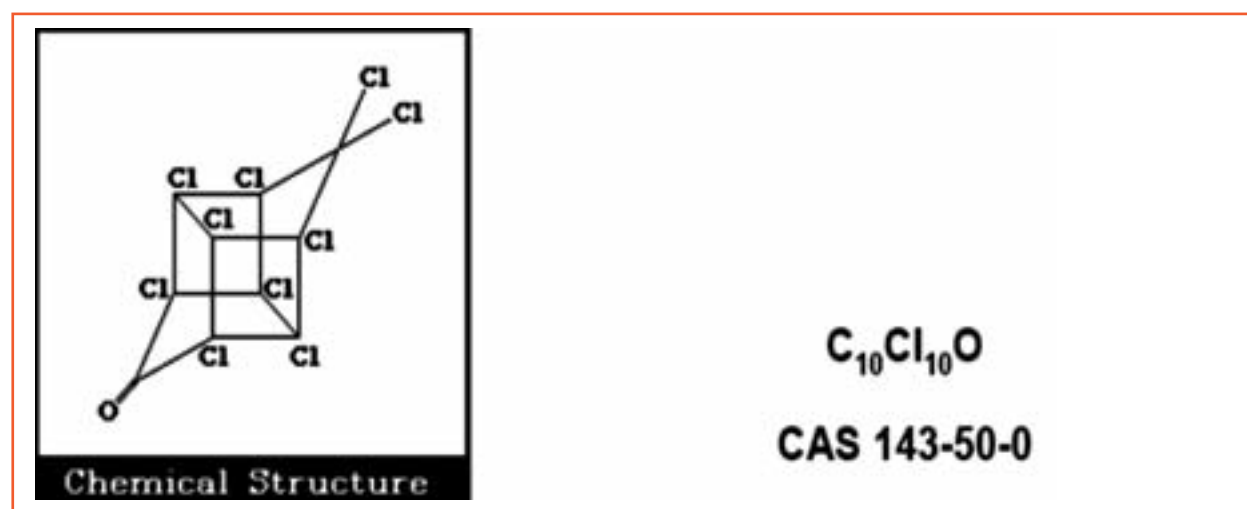
Luc Multigner

INSERM, Rennes

Les Antilles françaises, La Martinique et les îles principales de la Guadeloupe, Grande Terre et Basse Terre, subissent une pollution persistante des sols et des rivières par le chlordécone, un insecticide organochloré employé jusqu'en 1993 pour lutter contre le charançon du bananier. Cette pollution est à l'origine d'une contamination de la chaîne trophique, y compris de certaines denrées alimentaires végétales et animales. Elle suscite des interrogations concernant les conséquences qu'elle pourrait avoir sur la santé des populations et en particulier sur les femmes enceintes, le déroulement de la grossesse et le développement prénatal et postnatal. Dans un premier temps, nous avons étudié la prévalence des expositions aux polluants organochlorés à l'aide d'indicateurs biologiques d'exposition chez 115 femmes et leurs nouveaux-

nés en Guadeloupe. Dans un deuxième temps, nous avons mis en place une étude épidémiologique longitudinale de type cohorte prospective destinée à d'étudier l'impact des expositions prénatales aux polluants organochlorés, dont le chlordécone, et leur impact sur le déroulement de la grossesse, le développement prénatal et le développement neurologique postnatal.

Le chlordécone est un insecticide organochloré reconnu comme un polluant organique persistant. Produit et commercialisé aux USA, depuis 1958 jusqu'en 1976, il a été utilisé principalement à l'exportation pour un usage dans des cultures tropicales aux Caraïbes et en Amérique Centrale. La molécule est interdite aux USA (1976), en raison d'une intoxication par exposition en milieu industriel. La licence de production a été rachetée par une compagnie française au début des années 1980. A partir de cette date, le chlordécone formulé sous le nom de Curlone a été exporté vers les Antilles françaises et employé pour lutter contre le charançon du bananier. L'emploi du chlordécone a été autorisé aux Antilles jusqu'en 1993.



1. Structure en cage avec 10 atomes de chlore et une fonction cétone
2. Koc élevé (Log Koc ~3.4) >>> Forte rétention aux sols organiques
3. Kow élevé (Log Kow ~ 4.5) >>> Forte affinité composés hydrophobes
4. Faible solubilité dans l'eau >>> Transport par fixation aux particules
5. Très faible dégradation abiotique >>> Forte rémanence dans l'environnement
6. Très faible dégradation biotique >>> Forte rémanence dans l'environnement

L'utilisation du chlordécone aux Antilles a entraîné une pollution environnementale persistante. Déjà mise en évidence en 1980, la pollution n'a été prise sérieusement en considération qu'à partir de 1999. Cette pollution se traduit actuellement par une contamination significative

- des milieux naturels : eaux de surface, eaux profondes, eaux de consommations, sols, sédiments côtiers, faune et flore.

- des denrées alimentaires locales : légumes racines, viandes, poissons, crustacés

Des études récentes effectuées chez des hommes adultes, des femmes enceintes et des nouveau-nés montrent que le chlordécone est le produit organochloré le plus souvent observé dans les échantillons sanguins et de surcroît à la concentration la plus élevée. Il est détectable dans le sang chez 90 % des hommes et femmes adultes (jusqu'à 100 ng/ml, valeur maximale observée chez un ouvrier agricole de la banane).

Métabolisme et mécanismes de la toxicité

Après ingestion, le chlordécone est bien absorbé, largement distribué avec une rétention préférentielle au niveau du foie, métabolisé en chlordécone-alcool et éliminé dans les selles par excrétion biliaire.

Les effets toxiques du chlordécone, sur le plan neurologique et reproductif, semblent être en partie expliqués par l'inhibition de diverses ATPases et par les propriétés hormonales de la molécule. Le chlordécone modifie les niveaux d'expression de divers neurotransmetteurs (encéphalines, β -endorphines, etc...) de manière similaire à l'oestradiol. De plus, il se fixe aux récepteurs nucléaires aux oestrogènes (α , β) *in vivo* et *in vitro*. Il induit des effets de type oestrogénique chez l'animal de laboratoire, par exemple, chez la femelle immature, une augmentation de poids de l'utérus et stimule la synthèse de progestérone et chez la femelle ovariectomisée, la persistance de l'oestrus vaginal

Les données toxicologiques

• Exposition chez l'homme

En 1975, la contamination des ouvriers fabriquant le chlordécone dans une usine à Hopewell (Virginie, Etats-Unis) a été à l'origine d'un ensemble de signes et de symptômes toxiques regroupés sous le nom de « syndrome Kepone » associant

- des troubles de la fertilité, une oligospermie : diminution du nombre et de la mobilité des spermatozoïdes

- des troubles neurologiques: irritabilité, anxiété, altération de la mémoire récente, tremblements des membres, hallucinations, auditives et visuelles.

Certaines sous-populations comme les femmes enceintes et les enfants n'ont pas été exposées au chlordécone et on ne dispose pas de ce fait de données.

Certains des effets toxiques du chlordécone semblent s'expliquer par ses propriétés hormonales (oestrogéniques / anti oestrogéniques). Le chlordécone est l'une des rares substances chimiques dont les effets délétères sur la santé constatés chez l'homme sont expliqués par ses propriétés hormonales.

• Exposition chez l'animal adulte

- Atteintes neurologiques (*tremblements, hyperexcitabilité, anomalies comportementales*) et tumeurs hépatiques observées chez les mâles et les femelles

- Atteintes de la reproduction

Diminution du nombre de spermatozoïdes

Persistance de l'oestrus vaginal et diminution de l'ovulation

- Exposition chez la femelle gestante (pas de données chez la femme)

Mortalité accrue

Diminution du poids de naissance,

Et chez la portée :

Malformations : bassin rénal élargi, testicule non descendu

Atteintes neurocomportementales

Ouverture vaginale précoce

Troubles de la différenciation sexuelle

Troubles de l'apprentissage

Mise en place de l'étude « Ti moun »

Objectif

Evaluer l'importance des expositions prénatales aux polluants organochlorés (chlordécone principalement) dans la population de la Guadeloupe et analyser leur impact sur le déroulement de la grossesse, le développement intra-utérin et le développement neuropsychologique post-natal.

Protocole

Il s'agit d'une étude épidémiologique longitudinale de type cohorte prospective permettant le suivi à partir du 6ème mois de la grossesse de 1200 femmes enceintes et de 200 nouveaux-nés.

1. Inclusions des femmes enceintes entre 26 et 32 semaines d'aménorrhée

- Consentement de participation
- Questionnaire d'inclusion
 - Antécédents obstétricaux*
 - Antécédents médicaux*
 - Lieux de naissance et de résidence*
 - Métiers*
 - Expositions aux pesticides*
 - Tabac et alcool*

2. A la naissance

- Prélèvement de sang maternel et Prélèvement de sang de cordon
 - Chlordécone*
 - Autres OCs*
 - Acides gras PU*
 - Métaux lourds*
- Dossier néo-natal
 - Issue de grossesse*
 - État de santé du bébé*
 - Mesures anthropométriques*

3. Un à trois jours après la naissance

- Questionnaire sur l'alimentation pendant la grossesse
- Prélèvement lait maternel (colostrum)
- Examen pédiatrique
 - Examen neurologique*
 - Examen génital détaillé*
 - Distance ano-génitale*
 - Taille du pénis*

4. Suivi des bébés et leurs mères

	Bébés	Mamans
A 3 mois	<i>Examen des « mouvements généraux »</i> <i>Mesures anthropométriques</i> <i>Prélèvement de sang et d'urines</i>	<i>Test cognitif de Raven</i> <i>Prélèvement de lait maternel</i>
A 7 mois	<i>Tests d'acuité visuelle (Teller)</i> <i>Test d'intelligence infantile (Fagan)</i> <i>Mesures anthropométriques</i>	<i>Questionnaire sur la santé et l'alimentation bébé</i>
à 18 mois	<i>Mesures anthropométriques</i> <i>Evaluation cognitive, motrice, comportementale</i>	<i>Questionnaire sur la santé et l'alimentation bébé</i>

Etat d'avancement 'Décembre 2007

Femmes enceintes incluses	1160/ 1200
<i>Données recueillies</i>	
Résultats grossesse et accouchement	850
Santé du bébé	820
Prélèvements sanguins	930
Questionnaire alimentaire	800
Bébés inclus à la naissance pour suivi	
Bébés examinés à 3 mois	202
Bébés examinés à 6 mois	131
Bébés examinés à 18 mois	76

Les analyses de chlordécone dans le plasma maternel et dans le sang de cordon constituent la priorité des analyses biologiques prévues. Une première analyse confirme les résultats obtenus précédemment dans l'étude préliminaire Hibiscus qui montre une concentration dans le sang de cordon trois fois plus faible que celle observée dans le sang maternel. Les analyses de PCB (Polychlorobiphényles) et autres polluants persistants sont en cours. L'analyse des acides gras polyinsaturés et des oligo-éléments devrait être entreprise prochainement.

Évaluation des effets endocrines des oestrogènes mimétiques et des composés à activité dioxine sur l'expression de gènes ciblés et impacts fonctionnels sur la reproduction chez le poisson

François Brion

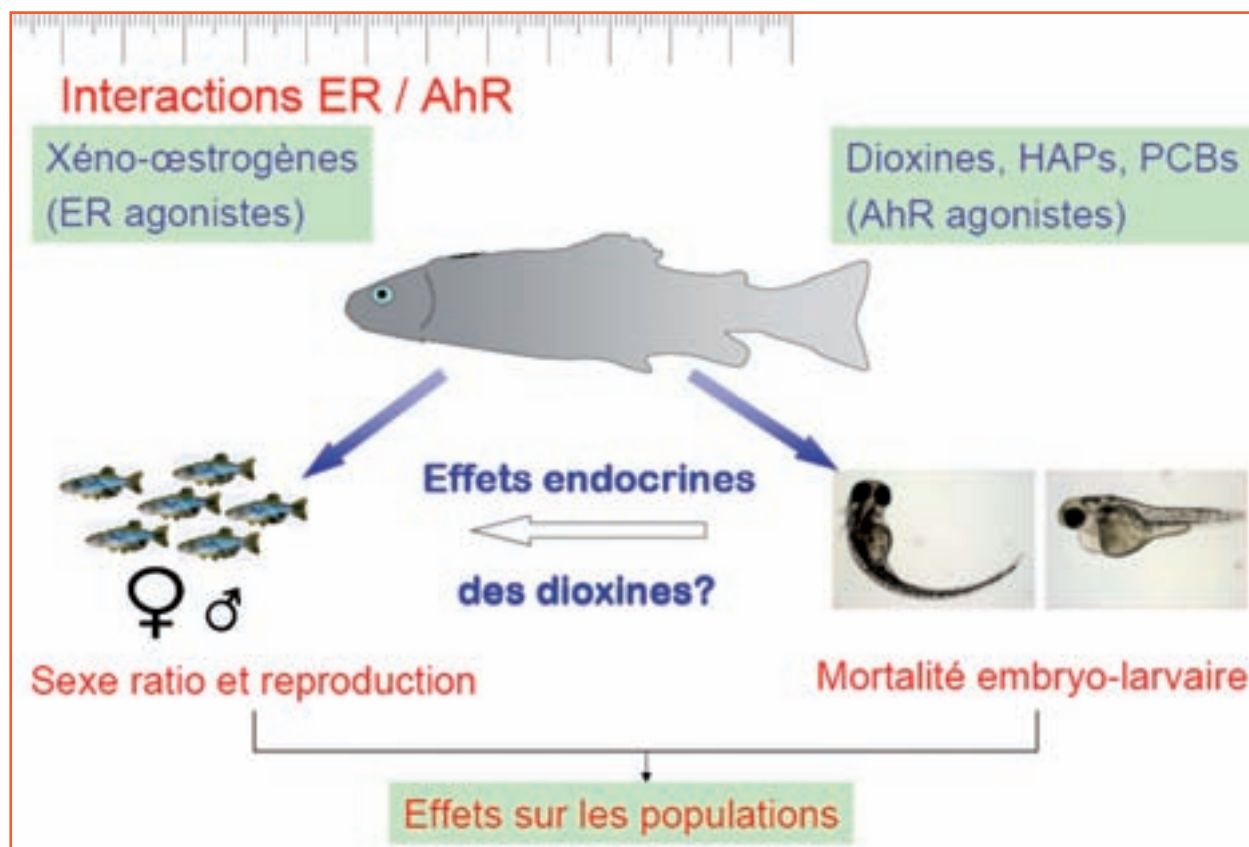
INERIS, Verneuil en Halatte

L'objectif de ce programme est d'étudier au niveau moléculaire, cellulaire et de l'organisme, les interactions et les effets sur la reproduction du poisson de deux familles de molécules très ubiquistes de l'environnement, les ligands du récepteur aux hydrocarbures aromatiques (AhR), tels que les dioxines et les HAPs, et les ligands des récepteurs nucléaires des oestrogènes (ER) comme l'oestradiol (E2) ou l'éthynylœstradiol (EE2). A l'aide de bio-essais *in vitro* et *in vivo*, l'expression des gènes aromatasés *cyp19a* et *cyp19b* de *Danio rerio* a été étudiée, en présence d'agonistes AhR, seuls ou en mélanges, avec des oestrogènes. Nous avons entrepris d'évaluer l'impact fonctionnel de l'anti-oestrogénicité des agonistes AhR sur la reproduction

des poissons en nous focalisant sur deux processus physiologiques : la vitellogenèse et la différenciation gonadique chez la gambusie et le poisson zèbre respectivement..

Les mécanismes d'actions des perturbateurs endocriniens sont multiples puisqu'ils peuvent potentiellement agir sur l'ensemble des étapes de la régulation endocrine, depuis la synthèse des hormones jusqu'à la réponse de cellules cibles. A ce jour, les mécanismes d'action les mieux décrits sont ceux médiés par les récepteurs nucléaires des stéroïdes et en particulier les récepteurs des œstrogènes (ERs). Depuis une dizaine d'années, il a été clairement montré que certaines molécules, largement répandues dans l'environnement, ont, chez le poisson, des activités œstrogéno-mimétiques capables de moduler par divers mécanismes la transcription de certains gènes œstrogéno-dépendants (Flouriot et al., 1995, Petit et al., 1997 ; Le Guevel & Pakdel, 2001) et d'affecter la reproduction des individus (Brion *et al.*, 2004, Nash *et al.*, 2004).

S'il est à présent établi qu'un grand nombre de produits se lient et activent les récepteurs d'œstrogènes, dans l'environnement, les organismes sont le plus souvent exposés à des mélanges complexes de substances dont les interactions avec la signalisation œstrogénique sont plus délicates à appréhender. Parmi les substances largement présentes dans l'environnement figurent



des composés à activité « dioxine-like » capables d'activer des récepteurs cytoplasmiques, les récepteurs hydrocarbures aromatiques (aryl hydrocarbon receptor ou AhR) qui, en présence d'un cofacteur Arnt (AhR nuclear translocator), forment un complexe AhR/Arnt qui se fixe sur des séquences régulatrices de certains gènes dont ils modifient l'activité transcriptionnelle. Ces complexes AhR/Arnt sont en outre capables d'interférer avec la signalisation œstrogénique selon divers mécanismes qui ne sont pas complètement compris chez les mammifères et très peu connus chez le poisson. Les molécules « dioxine-like » (ligands, comme la dioxine, du récepteur Ah ou AhR) peuvent présenter des activités œstrogéniques ou anti-œstrogéniques sans se fixer aux ERs (Safe *et al.*, 1998, Ohtake *et al.*, 2003). A l'heure actuelle, il existe peu de données permettant de relier les mécanismes d'action de ces molécules AhR agonistes aux effets biologiques et aux risques qu'elles peuvent représenter *in vivo* sur la fonction de reproduction.

La prise en compte de l'exposition des organismes à des composés ayant des mécanismes d'action multiples est indispensable dans une perspective d'évaluation du risque.

L'objectif de ce programme est d'étudier aux niveaux cellulaire, tissulaire et de l'organisme, les interactions entre ces deux classes de composés ubiquistes, les œstrogènes mimétiques et les composés à activité dioxine-like, sur des modèles poissons. La stratégie mise en œuvre combine plusieurs modèles biologiques. **(conf encadré)**

De manière plus spécifique, les objectifs sont :

- d'étudier *in vitro* et *in vivo* les mécanismes d'(anti-) œstrogénicité des molécules agonistes AhR sur la régulation de gènes cibles hormono-régulés chez le poisson zèbre (*Danio rerio*) et à déterminer les interconnexions entre le complexe AhR/Arnt et les ERs et les conséquences sur la signalisation œstrogénique (Schéma).
- d'évaluer l'impact fonctionnel des interactions moléculaires entre les voies AhR et ER dépendantes sur la reproduction du poisson en se focalisant sur deux processus fondamentaux du cycle de vie des poissons qui sont sous dépendance hormonale : la différenciation sexuelle et la vitellogenèse.

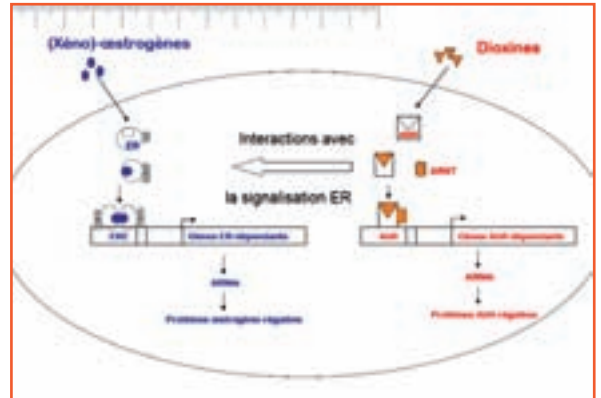


Schéma : Voies de signalisation cellulaire de l'action des œstrogènes et des dioxines. L'objet de notre programme vise à étudier les interactions de la voie AhR sur la voie ER chez le poisson en étudiant l'expression de gène œstrogéno-dépendant et à évaluer les effets au niveau de l'individu sur la fonction de la reproduction lors d'une co-exposition.

Approche expérimentale

Afin d'étudier les effets et les interactions entre les œstrogènes mimétiques et les molécules à activité dioxine sur la reproduction des poissons, notre stratégie combine des modèles biologiques de complexité variable permettant d'appréhender les effets à des niveaux variés d'organisation biologique :

- Au niveau moléculaire :

Il s'agit d'étudier *in vitro* les interconnexions entre le complexe AhR/Arnt et les ERs et d'évaluer l'impact des dioxines, seules et en mélange, sur la signalisation œstrogénique à l'aide de modèles cellulaires. L'expression des gènes hormono-régulés, i.e. gènes de l'aromatase cérébrale (gène *cyp19b*) et ovarienne (gène *cyp19a*), a été étudiée dans des lignées cellulaires spécifiques, les cellules gliales radiaires (U251-MG) et les cellules ovariennes de hamster chinois (CHO), co-transfectées avec différents récepteurs ERs ou complexe AhR/Arnt de poisson zèbre.

- Au niveau de l'organisme.

Il s'agit de replacer ces mécanismes et effets dans un contexte physiologique par la conduite d'expérimentations *in vivo* chez le poisson zèbre (*Danio rerio*) exposé aux stades embryon-larvaires et juvéniles à des (xéno)-œstrogènes et à des composés à activité dioxine, seuls ou en mélange et d'étudier les impacts sur la régulation de gènes cibles hormonorégulés impliqués dans la reproduction (gène de l'aromatase cérébrale, *cyp19b* et gène de l'aromatase ovarienne, *cyp19a*). Par ailleurs, des expérimentations sur le poisson zèbre et la gambusie (*Gambusia holbrooki*) sont menées afin d'étudier l'impact fonctionnel des interactions AhR/ER sur la reproduction du poisson en se focalisant sur la différenciation sexuelle (poisson zèbre) et la vitellogenèse (gambusie).

1. Etude des effets *in vitro* et *in vivo* des ligands des récepteurs ER et des récepteurs Ah sur l'expression des aromatasés de poisson zèbre.

Les gènes *cyp19a* et *cyp19b* de poisson zèbre codent les cytochrome P450 aromatasés, des enzymes clé de la stéroïdogénèse. Différents agonistes des récepteurs Ah et ER ont été sélectionnés (Tableau). L'analyse des mécanismes et effets a eu recours à différents essais biologiques *in vitro* (lignées cellulaires) et *in vivo* (larves de poisson)

Tableau . Ligands des récepteurs Ah et ER étudiés *in vitro* et *in vivo*

Récepteurs	Ligands agonistes de référence	Ligands antagonistes
Hydrocarbure aromatique (AhR)	2,3,7,8 TCDD (TCDD), Benzo[a]Pyrène (B[a]P), β-naphtoflavone (bNF)	α-naphtoflavone (ANF)
œstrogène (ER)	17β-œstradiol (E2), 17α ethynylœstradiol (EE2)	ICI 182 780 (ICI)

En collaboration avec Olivier Kah et Farzad Pakdel, nous avons mis en évidence en 2005 que l'aromatase B (AroB) cérébrale est exprimée chez les poissons exclusivement dans les cellules gliales radiaires, cellules fortement impliquées dans la neurogenèse adulte. Cette situation est spécifique aux poissons puisque chez les mammifères et les oiseaux, l'expression est neuronale. Nous avons décrit les mécanismes moléculaires de l'induction œstrogénique du gène *cyp19b* qui code l'aromatase cérébrale, en particulier l'implication dans cette régulation, de l'élément ERE (Estrogen-Responsive Element) présent dans la région promotrice, (**Fig 1**)

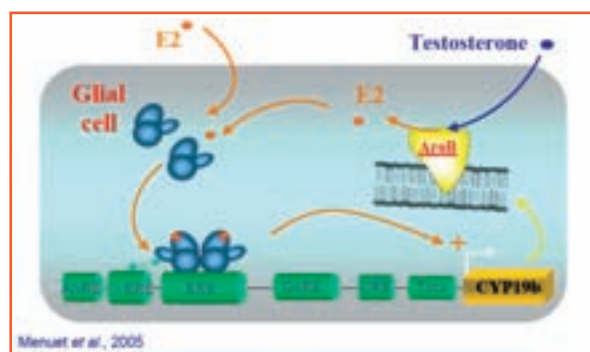


Fig 1 : Régulation œstrogénique de l'aromatase cérébrale (AroB) codée par le gène *cyp19b* dans le contexte glial radiaire (E2 = 17 β-œstradiol). Cette régulation implique des récepteurs Ers fonctionnels et des séquences ERE dans la région promotrice du gène *cyp19b*.

- Effet de l'œstradiol seul sur l'expression des gènes des aromatasés ovarienne et cérébrale

Nous avons montré que les œstrogènes exogènes induisent l'expression du gène *cyp19b* et la synthèse de la protéine AroB dans les cellules gliales radiaires de larves de poisson zèbre après 20 heures d'exposition (**Fig.2**). Nous avons confirmé cet effet *in vitro*. En effet, en présence du facteur de transcription zfERα, on observe l'induction du gène *cyp19b* dans le contexte glial radiaire (induction de l'activité transcriptionnelle du gène rapporteur *zfcyp19b-luc* dans la lignée U251-MG). En revanche, les œstrogènes n'affectent pas l'expression du gène *cyp19a*.

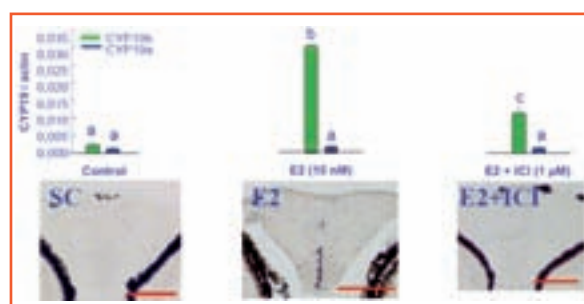


Fig 2 : Effet de l'œstradiol sur l'expression des gènes *cyp19* codant les cytochromes p450 aromatasés.

Cette expérience *in vivo* sur des larves de poisson zèbre démontre (au centre) que l'œstradiol (E2) régule positivement l'expression de la P450 aromatase B cérébrale au niveau transcriptionnel (induction du gène *cyp19b* en vert) et traductionnel (induction de la protéine aromatase B). En revanche, l'E2 ne régule pas l'expression de l'aromatase A ovarienne codée par le gène *cyp19a* (en bleu). Cette induction est dépendante de la présence de récepteurs aux œstrogènes (ER) fonctionnels puisque la présence d'un ligand antagoniste des ERs (ICI) abolit l'expression du gène de l'aromatase (à droite). Les photos correspondent à des sections transversales de cerveau de larves. SC = contrôle.

- Effet de l'exposition à différents agonistes du récepteur Ah, seuls ou en mélange avec des œstrogènes, sur l'expression des aromatasés ovarienne et cérébrale

Nous avons mesuré l'expression de l'aromatase cérébrale et ovarienne chez des larves de poisson zèbre exposés soit à de l'œstradiol seul (E2), soit à de la dioxine seule (TCDD) soit à un mélange des deux molécules avec ou sans un ligand antagoniste du récepteur Ah (ANF pour α-naphtoflavone) (**Fig.3**). On observe conformément aux résultats de la Fig. 2, que l'œstradiol seul n'a pas d'effet sur l'aromatase ovarienne (*cyp19a*) mais in-

duit fortement l'expression de l'aromatase cérébrale (cyp19b). La dioxine seule n'a pas d'effet. La co-exposition au mélange oestradiol + dioxine n'a pas d'effet sur l'expression du gène cyp19a que ce soit en présence ou en absence d'ANF. En revanche, l'addition de dioxine à l'oestradiol conduit à une répression de l'expression du gène cyp19b et de l'aromatase cérébrale induite par l'oestradiol seul. L'addition de l'antagoniste du récepteur Ah (ANF) contrecarre partiellement *in vivo* (mais totalement *in vitro*) l'effet observé en levant l'inhibition du gène de l'aromatase cérébrale. Ces résultats démontrent que la dioxine a une action anti-oestrogénique sur un gène régulé par l'oestradiol et que cet effet implique le récepteur Ah qui doit être fonctionnel. Des résultats similaires ont été obtenus avec d'autres molécules agonistes des AhR comme le B[a]P et le bNF. Par ailleurs, les expérimentations *in vitro* mettent en évidence que l'anti-oestrogénicité des AhR est indépendante de la présence de sites DRE (Dioxin-Responsive Elements) mais nécessite des sites ERE (Estrogen-Responsive Element) dans la région promotrice du gène *cyp19b*.

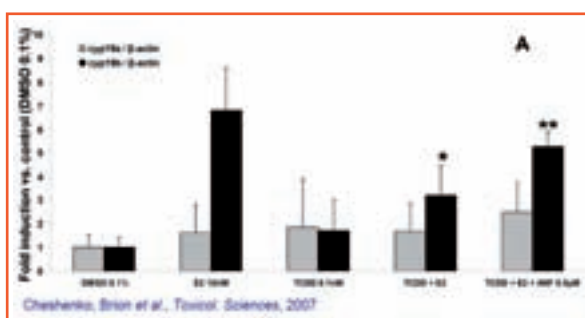


Fig 3 : Mise en évidence de l'effet anti-oestrogénique de la dioxine (TCDD) sur l'expression du gène codant l'aromatase cérébrale chez des larves de poisson zèbre.

En conclusion, les résultats obtenus à ce jour sont significatifs :

- Ils démontrent l'absence de fonctionnalité des sites putatifs DRE des régions promotrices des gènes de l'aromatase de poisson zèbre et la faible sensibilité des gènes *cyp19* aux dioxines.
- Ils permettent de confirmer l'inductibilité du gène de l'aromatase B par les œstrogènes et l'intérêt de ce gène comme marqueur d'exposition aux (xéno)-hormones au cours de l'embryogénèse.
- Ils mettent en évidence que les composés à activité dioxine-like exercent des effets anti-oestrogéniques sur l'expression d'un gène œstro-

géo-régulé, l'aromatase B, dans le contexte gliale radiaire *in vitro* et *in vivo*. En raison du rôle des cellules gliales dans la neurogenèse chez le poisson (Pellegrini *et al.*, 2007) et le rôle suspecté que joue l'œstradiol dans ce processus (Menuet *et al.*, 2005, Pellegrini *et al.*, 2005), les effets observés soulèvent la question des effets des molécules agonistes du récepteur Ah sur la neurogenèse. L'aromatase s'exprimant dans des structures cérébrales impliquées dans la reproduction, il est possible qu'une altération de l'expression de l'aromatase puisse se répercuter au niveau gonadique. D'une manière plus globale, ces données soulèvent la question des effets neuro-endocrines des molécules à activité dioxine.

Des travaux complémentaires viseront à évaluer les effets de la TCDD sur l'émergence de la sensibilité œstrogénique chez le poisson zèbre.

Référence : Cheshenko K.*, Brion F.*, Le Page Y., Hinfray N., Pakdel F., Kah O., Segner H., Eggen R.I.L. Expression of zebrafish aromatase *cyp19a* and *cyp19b* genes in response to the ligands of estrogen receptor and aryl hydrocarbon receptor. *Toxicological Sciences*, 2007, vol. 96, n° 2, pp. 255-267. * considérés comme 1er auteurs.

2. Etude des conséquences fonctionnelles sur la reproduction chez le poisson.

Différentes expériences ont été menées ou sont en cours de réalisation afin d'étudier les effets de l'exposition à des ligands du récepteur Ah sur la reproduction des poissons. Les travaux ont eu pour objectifs premiers d'apporter des bases méthodologiques essentielles à la poursuite de ce travail. Il s'agit donc de travaux et de résultats préliminaires qui devront être approfondis et confirmés d'ici la fin du programme.

- Etude des conséquences d'une exposition à un ligand du récepteur Ah, la bêta-naphtoflavone (bNF) sur la vitellogenèse chez la gambusie (*Gambusia holbrooki*).

Chez le poisson femelle, les œstrogènes déclenchent la vitellogenèse, processus qui se déroule au niveau du foie et qui, après transfert des produits de synthèse (vitellogénine) aux gonades, conduit à la constitution des réserves de l'œuf. Des travaux récents ont montré que la vitellogenèse pouvait être induite chez des gambusies mâles exposés à une hormone œstrogène et que ce phénomène était inhibé si l'exposition à l'hormone se déroulait en présence d'un ligand du récepteur Ah, la bêta-naphtoflavone (Aubry *et al.*, 2005).

Dans le cadre du présent projet, l'objectif est de déterminer si l'exposition à ce type de micropolluant inhibe la vitellogenèse de la gambusie femelle, et si cette inhibition a des répercussions sur le développement de la descendance. Les expérimentations ont visé à définir dans un premier temps, les bases expérimentales pour étudier les effets de ces molécules agonistes du récepteur Ah sur la vitellogenèse de la gambusie femelle et dans un second temps, à apporter les premiers résultats concernant les effets de la bêta-naphthoflavone.

Chez la gambusie, le cycle reproducteur est très dépendant de facteurs environnementaux tels que la température et la photopériode. En jouant sur ces paramètres, il est possible de bloquer ou de relancer expérimentalement l'ovogenèse. Sur la base des expériences préliminaires que nous avons effectuées, nous pouvons conclure que lorsque des femelles maintenues à 25°C sous conditions de photopériodes hivernales sont transférées en condition photopériodique estivale (passage de 10 à 16h de jour), celles-ci reprennent leur vitellogenèse et leur cycle reproducteur rapidement (en 7 jours). La reprise de la vitellogenèse se traduit aussi par une augmentation significative de l'indice gonado-somatique net (IGS net). Cet indice correspond à la masse totale des ovocytes dont le stade est supérieur à 2 divisée par la masse totale du poisson. Dans l'IGS net, ne sont donc considérés que les ovocytes ayant commencé à accumuler du vitellus au cours de l'expérience.

Des femelles ont été exposées à la bNF (1µg/L, 4µg/L, 16µg/L) pendant une période de 14 jours au cours de laquelle elles passent d'une photopériode hivernale à une photopériode estivale, ce qui déclenche la reprise de la vitellogenèse. Nous avons constaté aux plus faibles concentrations une diminution significative de la masse (indice IGS) et du nombre évalué par l'indice de fécondité normalisée = $[\ln(\text{nombre d'ovocytes ou œufs}/\text{taille})] \times 100$. (Fig.4).

Ces premières expériences menées avec la bêta-naphthoflavone semblent étayer l'hypothèse d'un effet négatif des polluants agonistes du récepteur Ah sur la reproduction des poissons, effet qui reste à confirmer.

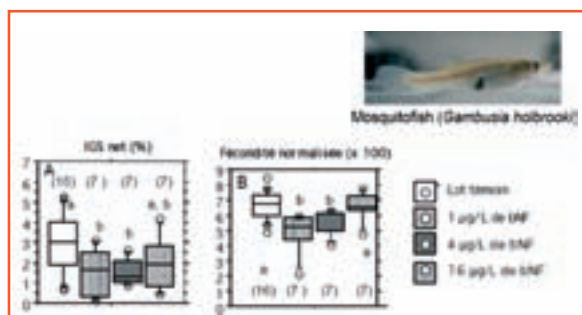


Fig. 4 : Effet sur la vitellogenèse de femelles gambusie exposées à différentes concentrations de bNF. L'effet est évalué par la mesure de l'indice gonado-somatique (IGS) et de la fécondité normalisée qui donnent respectivement une estimation de la masse et du nombre d'ovocytes entrés en vitellogenèse. On constate aux faibles concentrations un effet négatif sur la reproduction des poissons.

- Etude des conséquences d'une exposition à un ligand du récepteur Ah, la TCDD, seule ou en mélange avec un œstrogène de synthèse, l'EE2, sur la différenciation sexuelle chez le poisson zèbre (*Danio rerio*).

Chez les poissons, la différenciation sexuelle est un processus sous le contrôle des hormones stéroïdiennes androgènes (masculinisation) et œstrogènes (féminisation) dans lequel l'expression des enzymes à cytochrome P450 aromatasase joue en rôle critique notamment chez le poisson zèbre (Fenske et Segner, 2004, Rodríguez-Marí et al., 2005.). Il s'agit dans ce projet :

- d'étudier l'effet d'un agoniste du récepteur Ah, la TCDD ou dioxine, sur ce processus de différenciation
- de déterminer si cette exposition se traduit par une féminisation (hypothèse testée : effet œstrogénique) ou une masculinisation (hypothèse testée : effet anti-œstrogénique) de la population.

Les expérimentations en cours visent donc en priorité à acquérir des informations préliminaires sur la potentialité de cette molécule à perturber la différenciation gonadique chez le poisson zèbre. Nous avons choisi dans cette phase préliminaire de tester les effets d'une co-exposition entre un ligand du récepteur Ah et un ligand ER, soit la combinaison TCDD-EE2. Le schéma expérimental est présenté dans la **figure 5** .

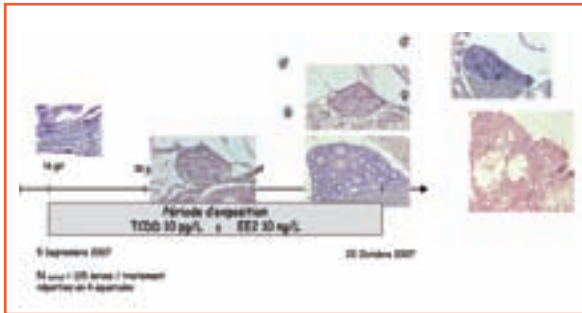


Fig. 5. *Protocole d'exposition des poissons zèbres à un ligand agoniste AhR, la TCDD, seul ou en mélange avec l'ethynyl-oestradiol(EE2). Des analyses histologiques chez des poissons zèbres issus de notre élevage ont été réalisées afin de caractériser la période d'exposition des poissons. A 14 et 30 jours après fertilisation (jpf), les gonades sont indifférenciées ; à 40 jpf, les gonades se différencient pour atteindre leur maturité à 60 jours.*

Selon nos observations préliminaires sur les coupes histologiques, l'œstrogène de synthèse, l'EE2 seul ou en combinaison avec le TCDD provoque l'arrêt du développement des gonades chez le poisson zèbre. Elles permettront d'apporter des informations importantes sur les effets des molécules à activité dioxine en interactions avec des œstrogènes, sur la différenciation sexuelle chez le poisson.

L'évaluation de la perturbation de la signalisation œstrogénique sur la fonction de la reproduction constitue un des aspects les plus originaux de ce programme.

Partenaires du projet

François Brion,
(coordonnateur),

Nathalie Hinfray,
Jean-Marc Porcher,
INERIS, Verneuil en Halatte

Olivier Kah, Farzad Pakdel,
UMR CNRS-Université de Rennes 1, Rennes

Gilles Monod,
INRA-SCRIBE, Rennes

Le syndrome de dysgénésie testiculaire, conséquence présumée d'une perturbation endocrinienne

Conférencier invité : Jorma Toppari

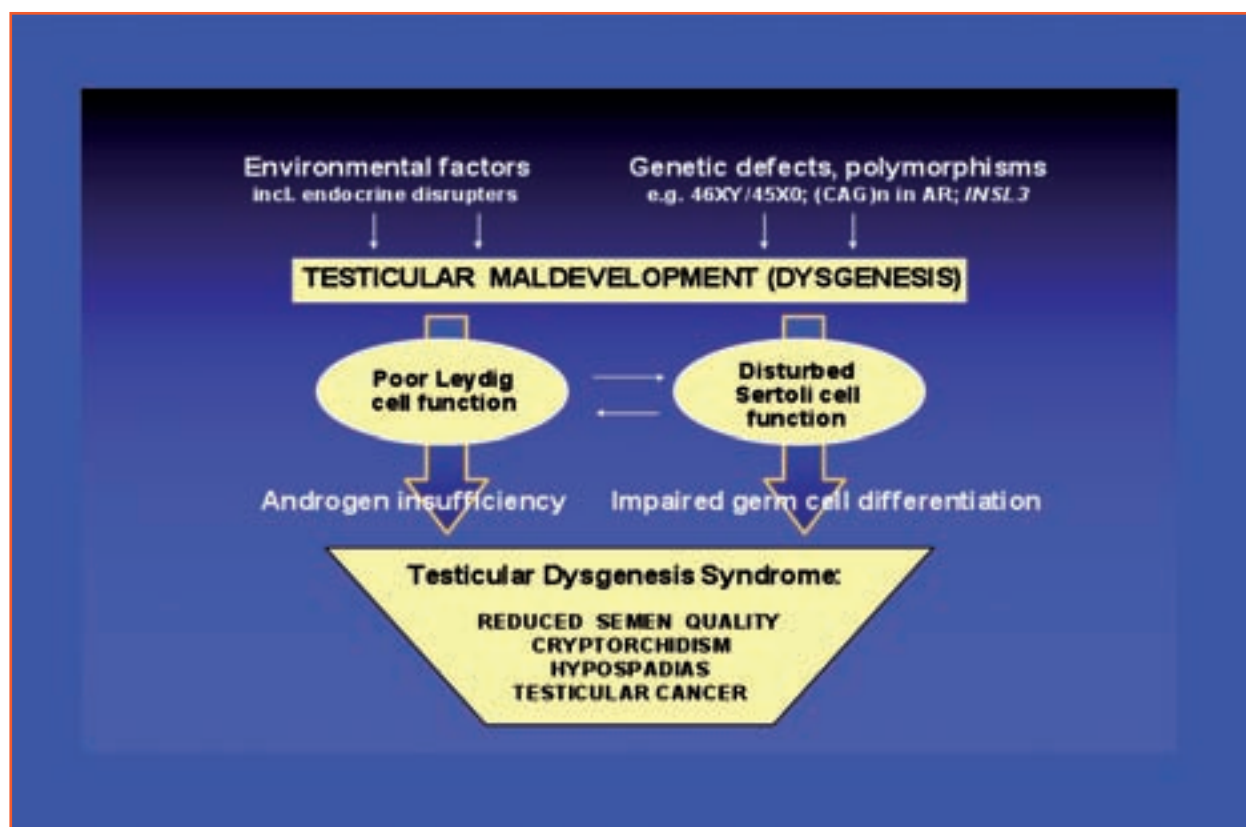
Université de Turku, Finlande

Depuis plusieurs décennies, il est constaté dans de nombreux pays une détérioration globale de la reproduction masculine. Dans les années 1990, plusieurs facteurs contribuant à la diminution des capacités de reproduction ont été observés : une baisse de la qualité du sperme a été constatée en Belgique, au Danemark, en France et en Grande-Bretagne ; parallèlement, l'incidence du cancer des testicules a augmenté tout comme celles de l'hypospadias et de la cryptorchidie. L'hypospadias désigne l'ouverture congénitale anormale de l'urètre à la face inférieure de la verge. La cryptorchidie correspond à l'arrêt de la migration du testicule en un point quelconque de son trajet normal entre la région lombaire où il se forme et le scrotum où il doit se trouver à la naissance.

Il existe des différences géographiques marquées pour la prévalence des troubles de la reproduc-

tion masculine. Bien que la raison de ces différences ne soit pas encore clairement établie, les travaux de recherche clinique et de laboratoire suggèrent que ces changements sont en interrelation et auraient une origine commune dans la vie fœtale ou dans l'enfance. L'exposition de fœtus mâles à des niveaux supranormaux d'oestrogènes tel que le diéthylstilbestrol (DES), peut conduire aux troubles de la reproduction décrits ci-dessus. Un nombre croissant d'études ont démontré que des contaminants courants présents dans l'environnement et que des facteurs naturels possèdent des activités oestrogéniques. Dès lors, ces constatations ont induit l'hypothèse selon laquelle les tendances négatives de la reproduction masculine pourraient être en partie associées à une exposition durant la vie fœtale et l'enfance à des substances de l'environnement ayant une activité oestrogénique ou qui sont actives sur le plan hormonal (antiandrogènes) (Sharpe and Skakkebaek, 1993 ; Toppari *et al.*, 1996).

Ces quatre facteurs, cryptorchidie, hypospadias, cancer testiculaire et baisse de la qualité du sperme sont typiques du syndrome de dysgénésie testiculaire (SDT) d'origine fœtale. Des études sur animaux de laboratoire ont montré qu'une exposition à des substances oestrogéniques ou antiandrogéniques produisent des effets de type SDT à l'exception des cancers des cellules germinales.



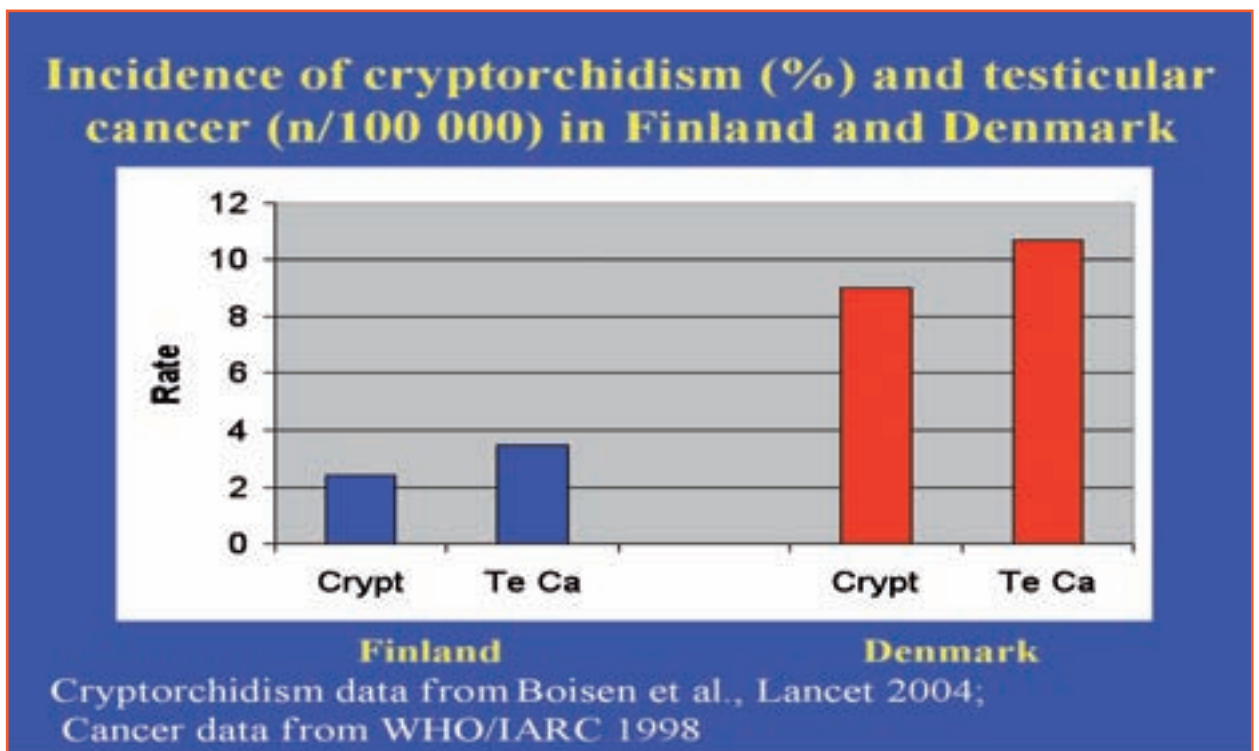
L'exposition intrautérine au tabac au cours de la grossesse a un impact chez l'adulte. L'étude qui a porté sur 2069 jeunes hommes révèlent que le tabagisme chez la mère au cours de la grossesse induit une baisse de la concentration spermatique, de la production de sperme et une réduction de la taille des testicules (Jensen et al., 2003).

De nombreuses études ont porté sur l'évolution de l'indice synthétique de fécondité (Total fertility rate). Cet indice correspond au nombre moyen d'enfants qu'aurait mis au monde une femme durant sa vie si, au cours de sa période de reproduction, elle avait eu un taux de fécondité conforme aux taux de fécondité par âge pour cette période. La plupart des pays européens et les Etats-Unis ont connu entre 1970 et 2002 une baisse de cet indice qui depuis les années 1990 est en dessous du niveau de remplacement de la population. Le syndrome de dysgénésie testiculaire pourrait en partie rendre compte de la baisse de cet indice.

Il existe d'importantes différences géographiques en termes de qualité de la reproduction masculine entre deux pays du nord, le Danemark et la Finlande, le Danemark ayant des scores bien inférieurs à ceux de la Finlande. Ainsi des différences notables ont été observées dans l'incidence du cancer testiculaire et de la cryptorchidie dans ces deux pays. La cryptorchidie est la malformation congénitale la plus fréquente chez les nouveaux-nés mâles.

Au Danemark, l'incidence du cancer des testicules est trois fois plus élevée et celle de la cryptorchidie quatre fois plus élevée qu'en Finlande. La prévalence de l'hypospadias est près de trois fois plus élevée au Danemark qu'en Finlande selon Boisen et al 2005.

De plus, la qualité du sperme des hommes danois est significativement inférieure à celle des hommes finlandais. Afin d'analyser si le SDT pourrait rendre compte en partie de ces différences notables, nous avons effectué à Copenhague et à Turku en Finlande une étude conjointe de 1677 nouveaux-nés mâles des deux pays et évalué de manière systématique le volume testiculaire à la naissance et au cours des 18 mois et analysé les hormones de l'axe hypophyse-gonade à partir de prélèvements sanguins à 3 mois. Cette étude a révélé une taille et une croissance post-natale inférieures des testicules et des taux plus faibles d'inhibine B chez les nouveaux-nés danois, ce qui reflète un volume plus faible des tubules séminifères. Ces observations sont à mettre en relation avec une prévalence élevée à la naissance d'anomalies génitales, avec une incidence parmi les plus élevées au monde de cancer des testicules et avec une faible qualité du sperme couramment constatée chez les hommes jeunes au Danemark. Ces résultats peuvent être dus à des différences génétiques entre les hommes danois et finlandais mais ils peuvent aussi refléter l'impact de facteurs de l'environnement sur le développement périnatal des testicules.

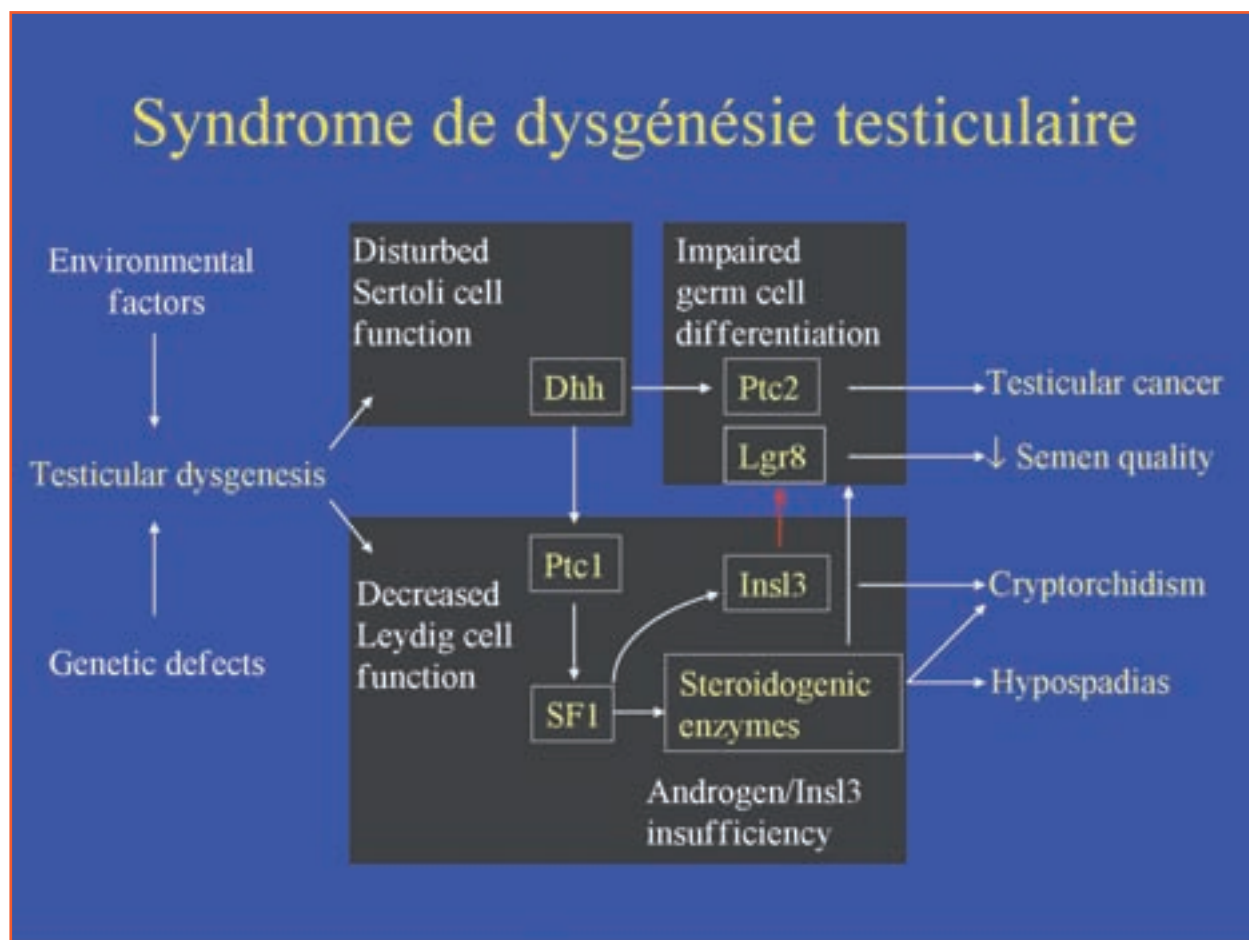


Quelques études ont étayé l'hypothèse d'une association entre la cryptorchidie et l'exposition à des substances chimiques de l'environnement (Main et al, 2007 entre autres) en particulier à des pesticides, à des phthalates et des retardateurs de flamme polybromés (PBDE). Des effets négatifs de produits chimiques sur la descente testiculaire et la fonction hormonale sont détectables pendant la courte période d'activation physiologique de l'axe hypophyse-gonade à environ trois mois d'âge.

Ces travaux ont conduit à une compréhension plus fine du syndrome de dysgénésie testiculaire.

En conclusion,

- Chez les enfants, les différences dans le statut hormonal et gonadique sont le reflet des différences chez les hommes adultes.
- Le cancer des testicules, la baisse de qualité du sperme, le cryptorchidie et l'hypospadias peuvent être des signes révélateurs d'un syndrome de dysgénésie testiculaire (SDT)
- Les périodes de développement fœtal et post-natal sont des phases critiques de la qualité de la reproduction chez l'adulte.
- Les perturbateurs endocriniens pourraient être impliqués dans le syndrome de dysgénésie testiculaire (SDT)



Evaluation de l'impact des perturbateurs endocriniens sur les milieux aquatiques (survaqua)

Jean-Marc Porcher

INERIS, Verneuil-en-Halatte

Introduction

De nombreuses substances polluantes d'origine et de nature chimique très diverses sont décrites comme perturbateurs endocriniens (PE). *In situ*, l'occurrence dans le milieu aquatique d'effets PE a été principalement associée aux rejets de stations d'épuration, les substances incriminées étant les hormones stéroïdiennes issues des activités domestiques. Il existe en revanche beaucoup moins d'informations sur les effets PE des autres types de pollutions, comme les pollutions d'origine industrielle ou agricole, très largement représentées sur le territoire français. Ce manque d'information est d'autant plus dommageable que différentes études récentes montrent les effets PE de nombreuses substances non hormonales, telles que les pesticides, les hydrocarbures aromatiques polycycliques ou encore les métaux. Enfin, l'état de contamination et de perturbation des cours d'eau français reste très mal connu.

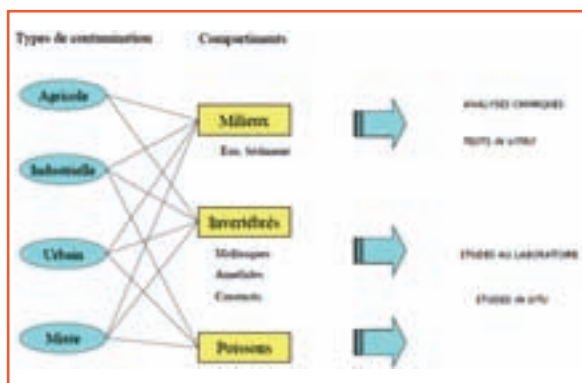
Les objectifs

- Définir et appliquer une démarche expérimentale permettant l'évaluation de l'impact de PE provenant de sources variées de contaminations sur les milieux aquatiques
- La démarche consiste à évaluer, de façon combinée, la contamination des milieux (eau, édiements) et les effets biologiques induits *in situ* sur la faune aquatique (poissons, mollusques, annélides, crustacés).

Nous posons trois questions principales :

- Quels composés sont présents dans l'environnement ?
- Sont-ils biodisponibles ?
- Sont-ils responsables des effets observés sur la faune aquatique ?

Ce programme qui concerne un réseau de six laboratoires permettra de mettre en place puis de valider des outils de biosurveillance et constituera une base d'expertise dans un contexte de surveillance et d'évaluation des écosystèmes.



Synthèse des principaux résultats

Une douzaine de sites d'étude ont été sélectionnés par les différents partenaires du projet, soit parce qu'ils y ont déjà réalisé des suivis dans le cadre d'autres programmes (PNETOX, INTERREG, Seine-Aval, ...), soit parce qu'ils présentent un intérêt particulier en raison de leur contamination. Les sites retenus dans l'étude reflètent la diversité des sources potentielles de contamination (stéroïdes, pesticides, contaminants organiques, métaux, ...) et concernent aussi bien les eaux continentales que les estuaires et le milieu côtier.

(Conf Tableau ci-dessous).

Equipe	Sites	Code Echantillon	Mois d'échantillonnages de sédiment
Milieu eau douce			
Cemagref	Rhône (Givors - 69)	CA	juin, septembre
Cemagref	Orne (Saillans - 69)	CB	juin, septembre
Cemagref/LPTC	La Jaille d'Eysine (33)	CC	juin, septembre
Hydrosciences	Le Lez (Castelnau - 34)	ED	mars, juin, octobre
Hydrosciences	Le Lez Aval (Lattes - 34)	EE	mars, juin, novembre
Hydrosciences	Sources du Lez (34)	EF	mars, juin
INERIS	Nonette (Chantilly - 60)	AG	avril, juillet, octobre
Univ Le Havre	Vilaine (Sainte Marie - 35)	BI	juin
Univ Le Havre	Deule (Don - 59)	BI	juin
Univ Le Havre	Gouessant (Coulémieux-35)	BIK	juin
Milieu estuarien			
UCO	Seine	FN	mars, juin, sept.
UCO	Loire	FO	mars, juin, sept.
UCO	Port du Bec	FP	mars, juin, sept.
Lagune			
Hydrosciences	Étang de Migeon	EL	mars, juin, octobre
Hydrosciences	Étang d'Arnel	EM	mars, juin, octobre
Hydrosciences	Étang de Thau	EQ	juin

Analyse des sédiments

Un ensemble de tests *in vitro* a été utilisé dans le but de détecter dans les sédiments la présence de substances capables d'interférer avec différentes cibles endocrines. L'approche a consisté en une recherche systématique (approche screening), sur

tous les sites, des activités œstrogène-like (ER), androgène-like (AR) et dioxin-like (AhR) dans des extraits organiques globaux de sédiment. Ces tests sont effectués sur deux types de modèles, cellules et levures.

Des premiers ciblage, il ressort que des activités œstrogéniques significatives évaluées en équivalents œstradiol (EEq) sont détectées sur plusieurs sites (**Fig.1**). Les activités détectées sont de l'ordre du ng E2-ég/g de sédiment, pour les sites les plus actifs. La présence de ligands de AhR est détectée sur l'ensemble des sites analysés.



Fig.1

Effets chez les invertébrés

En ce qui concerne les **invertébrés**, différents tests sont en cours de mise en place et de validation au laboratoire :

- mesure de l'expression du gène codant pour la Vtg et quantification des protéines de réserve (vitellines) par méthodes analytiques (LC/MS/MS) et biologique (anticorps) chez *G. pullex*.
- Mise en place de biomarqueurs chez des mollusques gastéropodes (Vtg, CYP19, CYP17, ...) et dosages des hormones stéroïdiennes (œstradiol, progestérone, testostérone).

Une fois validé, l'ensemble de ces biomarqueurs sera testé en présence de composés de type PE, tels que xéno-œstrogènes ou xéno-androgènes.

Une étude sur le terrain en milieu estuarien a également été réalisée sur *Scrobicularia plana*, un mollusque bivalve fouisseur et *Nereis diversicolor*, un ver intra-sédimentaire.

D'un point de vue général :

- Le développement des gonades est perturbé chez *S plana* prélevé dans l'estuaire de la Seine (en comparaison de l'estuaire de la Loire)

- La gamétogenèse est perturbée chez *N. diversicolor* prélevé dans l'estuaire de la Seine (en comparaison de l'estuaire de la Loire)

Essais in vivo chez le poisson

Nous avons choisi plusieurs marqueurs de perturbation endocrinienne. Il s'agit principalement :

- Des mono-oxygénases à cytochrome P450 qui sont devenues des biomarqueurs incontournables lorsqu'il s'agit de révéler l'exposition des organismes à des polluants organiques. Leur utilisation se justifie pleinement dans le cadre de ce projet puisqu'elles sont impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques et des hormones contrôlant la reproduction et le développement.

- Des aromatases qui contrôlent la biotransformation des androgènes en œstrogènes et ont un rôle important dans la différenciation sexuelle des poissons, une inhibition se traduisant par une masculinisation complète ou partielle de populations de poissons génétiquement femelles. Différentes études ont pu mettre en évidence chez le poisson une action inhibitrice des HAPs, des PCBs et de certains herbicides sur l'activité de cette enzyme provoquant une diminution de la production d'œstradiol par les ovaires.

- La vitellogénine (Vtg) est une protéine importante de la physiologie de la reproduction. Synthétisée en réponse à la stimulation hormonale (œstradiol, E2), elle est ensuite accumulée dans les œufs en tant que réserve destinée au développement embryonnaire. Sa présence dans le plasma de poissons mâles est ainsi anormale et sa détection constitue une bonne indication de l'exposition à des perturbateurs du système endocrinien à activité œstrogénique. Les techniques de dosages pour le cheveine et le gardon sont en place dans les différents laboratoires partenaires (INERIS, Cemagref, Université du Havre) et feront l'objet d'une intercomparaison.

Mesures in situ sur les chevaines

Deux campagnes de pêche électrique ont permis de capturer 15 chevaines mâles et 15 chevaines femelles de taille la plus homogène possible, d'effectuer sur le terrain les mesures biométriques d'usage et de prélever un échantillon sanguin et des tissus biologiques (foie, cerveau, gonades).

Dosage de la vitellogénine circulante

La vitellogénine est dosée par ELISA compétitif dans le plasma. Le dosage qui s'est avéré très spécifique et sensible a été automatisé, permettant d'analyser jusqu'à 70 échantillons simultanément.

Les dosages de vitellogénine ont été réalisés sur l'ensemble des chevaines mâles en vue de détecter une exposition à des composés œstrogènes mimétiques. Des mesures ont également été réalisées chez des poissons femelles issus des stations de Chantilly et Castelnau (juin et septembre) ainsi que sur Eysines (juin). Ces mesures permettent d'appréhender les effets d'une contamination potentielle sur la vitellogenèse et de fournir des niveaux physiologiques de Vtg qui permettront de mieux interpréter les inductions observées chez les mâles.

D'un point de vue global sans distinction des stations on observe que 45 % des mâles présentent des teneurs en Vtg détectables contre 73 % chez les femelles. La comparaison des stations sur la base des niveaux de vitellogénine mesurés chez les mâles fait apparaître qu'en juin seule la Jalle à Eysines présente des niveaux relativement élevés (2120 ± 3187 ng/ml) comparativement à ceux mesurés chez les mâles du site de référence (Drôme à Saillans). A la différence des autres stations, l'ensemble des individus présente des niveaux quantifiables, ce qui renforce l'idée d'une exposition à des composés œstrogéniques. Les poissons issus des autres rivières ont des teneurs proches de la limite de quantification (25 à 60 % des individus présentent des niveaux détectables de vitellogénine). En septembre, les mesures de Vtg confirment les inductions observées en juin sur le site d'Eysines. De plus, les stations de Castelnau et de Chantilly se caractérisent par des inductions de Vtg qui sont à Castelnau, comparables à celles du site d'Eysines. Les niveaux mesurés sont d'un point de vue biologique significatifs car bien supérieurs aux concentrations de Vtg des mâles du site de référence et pour certains individus à des niveaux comparables à ceux observés chez les femelles (Fig.2).



Fig.2

Mesure des activités aromatasés dans les cerveaux de chevaines

A l'issue de l'optimisation de la méthode de dosage, des mesures de l'Activité Aromatase (AA) ont été réalisées chez des chevaines originaires de 5 sites de niveaux de contamination différents et à deux saisons de pêche. Les premiers résultats obtenus montrent que les AA cérébrales chez les chevaines mâles prélevées en juin-juillet varient en fonction des sites, avec des AA plus faibles chez les poissons en provenance du Rhône et de la Jalle que chez les poissons provenant de la Drôme, de la Nonette et du Lez (Fig.3). Les sites de prélèvement sur le Rhône (à Givors) et sur la Jalle d'Eysine sont connus pour être impactés par des substances chimiques qui pourraient potentiellement être responsables des faibles niveaux d'AA observés. En revanche, les différences semblent atténuées pour la seconde saison de pêche (septembre-octobre).

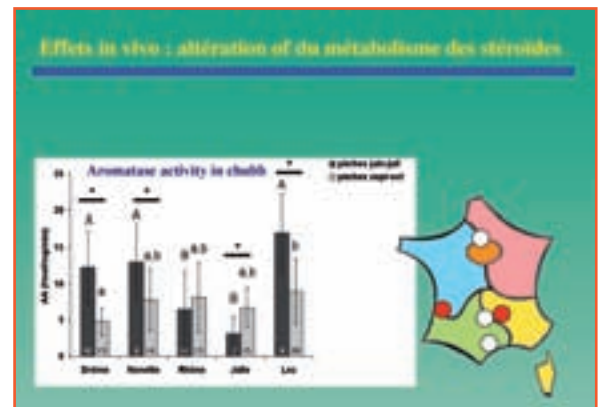


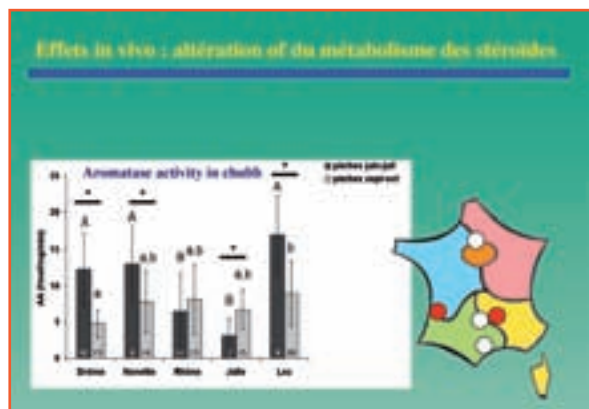
Figure 3 : Activités aromatasés mesurées dans les cerveaux de chevaines mâles prélevés in situ dans différents sites.

Les effectifs sont indiqués dans chaque barre de l'histogramme. Les différentes lettres représentent des différences statistiquement significatives au sein d'une même saison de pêche (ANOVA puis test de Tuckey, $p < 0.05$). Les étoiles représentent des différences statistiquement significatives entre les deux saisons de pêche pour des poissons d'un même site (Test t de Student, $p < 0.05$).

Une analyse histologique des tissus reproducteurs est en cours afin de mieux interpréter certains marqueurs en relation avec le cycle reproducteur et le développement gonadique et de détecter une éventuelle présence d'anomalies (intersexualité, ovocytes multinucléés, fibrose, etc.)

L'analyse histopathologique qui en est à ses débuts a révélé la présence d'ovocytes dans des tissus mâles, présence qui est attribuée à une exposition à des substances oestrogéniques.

L'indice gonado-somatique net (IGS net) correspond à la masse totale des ovocytes dont le stade est supérieur à 2 divisée par la masse totale du poisson. Les taux élevés d'IGS dans la station de Saillans sont révélateurs d'une importante activité de reproduction chez les chevaines (Juin 2006), activité qui s'achèvera trois mois plus tard (**Fig. 4**).



En conclusion, ce programme de recherche a permis :

- La standardisation de plusieurs procédures (prélèvement, extraction)
- La comparaison de différentes techniques (YES, MELN, EROD)
- Le développement de nouvelles approches (métabolisme des stéroïdes)
- La production de connaissances, en particulier sur la physiologie des invertébrés.

Au stade d'avancement de nos travaux, plusieurs constatations peuvent être faites :

- Les environnements aquatiques (eau douce et estuaire) sont contaminés par des xéno-oestrogènes
- Les composés perturbateurs endocriniens (PE) sont biodisponibles et s'accumulent chez les animaux vivants.
- Ces composés PE induisent des effets chez les poissons et les invertébrés.

Partenaires impliqués

Jean-Marc Porcher,
INERIS, Unité d'Évaluation des Risques Ecotoxicologiques, Verneuil en Halatte.

Jeanne Garric,
Cemagref, Laboratoire d'écotoxicologie, Lyon.

Hélène Budzinski,
ISM/LPTC, UMR 5255, Université de Bordeaux 1.

Catherine Mouneyrac,
UCO - Centre d'Étude et de Recherche sur les Écosystèmes Aquatiques, Angers.

Claude Casellas,
Université de Montpellier 1, UMR 5569 « Hydrosciences ».

Christophe Minier,
Université du Havre, Laboratoire d'Ecotoxicologie - Milieux Aquatiques (LEMA).

Développement d'un test physiologique rapide *in vivo* pour mesurer les effets de perturbations thyroïdiennes

Barbara Demeneix

Museum d'Histoire Naturelle, Paris

Introduction

La mise au point de méthodes d'essais à haut débit pour détecter les effets potentiels des perturbateurs endocriniens est devenue un enjeu majeur de la protection de l'Homme et de l'environnement, enjeu devenu pressant avec l'entrée en vigueur en juillet 2007 de la réglementation REACH. Il est possible d'identifier de tels effets *in vitro* mais seule, l'analyse *in vivo* permet d'appréhender dans sa globalité l'impact physiologique d'une substance chimique.

Le développement et la validation de méthodes d'essai s'effectuent dans le cadre de l'OCDE. Le test actuel de référence, XEMA (*Xenopus Metamorphosis Assay*) est fondé sur l'évaluation de l'influence des substances chimiques sur la métamorphose des amphibiens. Les paramètres observés sont morphologiques et biochimiques (dosage des hormones T₃/T₄). Ce test nécessite trois semaines d'expérimentation, est coûteux et nécessite l'utilisation de têtards de Xénopes à un stade (NF 51 c'est à dire 21 jours post-fertilisation), où ils répondent à la définition européenne de l'animal de laboratoire (Dir 86/609/CEE) avec toutes les contraintes liées à ce statut.

De ce fait, la validation d'un test avec une sensibilité analogue au XEMA, mais moins onéreux et compatible avec du criblage à moyen – haut débit, constituait une priorité et un défi à relever avec l'idée de trouver un système physiologique compatible avec une lecture automatisée sur plaque. Nous avons choisi de tester la capacité de têtards de *Xenopus laevis* à des stades embryonnaires précoces à détecter l'effet d'un perturbateur endocrinien au niveau de la thyroïde. A ce dessein notre laboratoire a créé des animaux transgéniques (**conf encadré**).

Modèles amphibiens et transgénèse

L'amphibien est un modèle de choix pour comprendre la mécanistique thyroïdienne. En effet, il présente l'avantage d'une métamorphose d'un têtard aquatique en grenouille terrestre. Cette métamorphose est dépendante d'un pic de l'hormone thyroïdienne active, la T₃ identique à celle présente chez l'Homme. Si on bloque artificiellement ce pic d'hormone la métamorphose n'a pas lieu.

Nous avons développé des modèles amphibiens qui répondent par émission de fluorescence à toute altération de l'axe thyroïdien. L'ingénierie du laboratoire a permis de créer récemment des Xénopes transgéniques qui émettent une protéine fluorescente verte si on place dans l'eau de l'hormone thyroïdienne (T₃). Plus il y a d'hormone dans le milieu, et plus il y a d'activation et transcription des gènes cibles (rapporteurs) et de production de protéines fluorescentes dans les organes ou tissus cibles de la T₃. L'activité du gène peut se quantifier selon le degré de fluorescence observée : la protéine est un marqueur fluorescent visible à travers un têtard transparent à ce stade. L'un des avantages de ce système biologique est que l'activité du gène cible est l'étape finale de la chaîne de réactions qui vont de l'hormone jusqu'à son action dans le noyau. Ainsi, si une perturbation a lieu en amont, on peut observer une baisse de la production d'hormones si la molécule interfère avec la production de l'hormone ou encore une hausse si la molécule ajoute son effet à celui de l'hormone.

Les stades précoces de têtards (stades 42 et 45, 4 et 5 jours post fertilisation) sont capables de répondre à l'hormone (réagir physiologiquement) avant même d'atteindre un stade où il y a production endogène d'hormones. Des têtards à un stade très précoce sont des larves et non pas des animaux de laboratoire, ce qui est bien moins contraignant vis-à-vis de la Directive européenne sur l'expérimentation animale.

La technologie que nous avons développée pour le test est innovante. Elle fait appel à la lecture automatisée de la fluorescence sur plaque, montre peu de variabilité (5%) et permet de détecter *in vivo* des modifications subtiles de l'activation ou de l'inhibition de la signalisation des hormones thyroïdiennes par les perturbateurs. Ce test rapide et sensible a été validé pour détecter des substances agonistes, ou antagonistes des hormones thyroïdiennes et déceler l'action de perturbateurs endocriniens connus. Ces résultats ont fait l'objet d'une publication (Fini *et al.*, 2007). Notre approche est compatible avec le criblage de moyen à haut débit et se compare favorablement avec le test de référence XEMA.

Résultats préliminaires

• Validation du test avec des agonistes [Fig. 1]

Un agoniste peut être une hormone activante naturelle ou une molécule qui mime l'hormone et permet l'activation de la transcription, son effet peut être additif à celui de l'hormone naturelle.

Nous avons effectué une série de tests afin de déterminer l'effet sur l'expression du transgène de doses croissantes de T₃, l'hormone naturelle active, de T₄, l'hormone naturelle moins active (1000x) que la T₃ et de TRIAC, un agoniste naturel de T₃. Après traitement avec trois molécules, l'expression du transgène est dose-dépendante. La technique a aussi été validée avec un agoniste de synthèse de la T₃, le GC-1 (10⁻⁷M), spécifique d'un isotype du récepteur aux hormones thyroïdiennes (le TRβ). Ce test a permis de confirmer la présence de cet isotype à de très jeunes stades de développement du Xénope. Le traitement avec ces quatre molécules agonistes a provoqué une induction très significative de la fluorescence chez les têtards transgéniques, ce dont témoigne la Fig. 1.

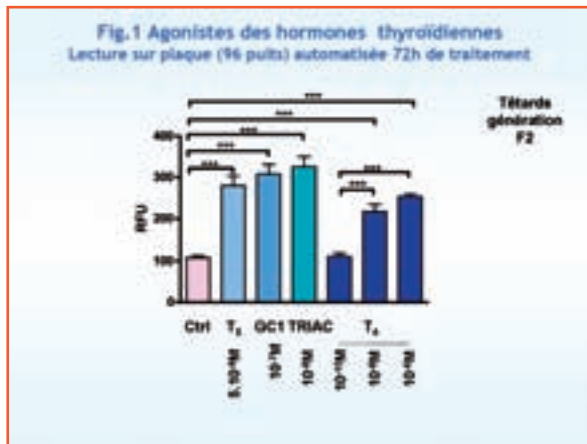


Fig.1

• Validation du test avec des antagonistes [Fig. 2 & 3]

Un antagoniste est une molécule qui bloque une voie de signalisation donnée. Nous avons testé l'effet de doses croissantes de deux antagonistes, le méthimazole et le perchlorate de sodium, inhibiteurs de la synthèse d'hormone au niveau de la glande thyroïde elle-même.

Le méthimazole (Fig2) est un inhibiteur thyroïdien car il empêche l'organification de l'hormone, c'est-à-dire sa synthèse, en empêchant l'action de la thyroïde peroxydase, enzyme qui permet l'ad-

jonction d'une ou plusieurs molécules d'iode sur la thyroglobuline. Ce médicament est utilisé dans des cas d'hyper thyroïdie.

Le perchlorate de sodium (Fig.2) est un inhibiteur de la synthèse d'hormone car il empêche l'iode de pénétrer dans les cellules de thyroïdes, les thyrocytes. Ceci se fait en bloquant le symport Sodium /Iode présent sur la face basale de ces thyrocytes. Le perchlorate peut être retrouvé dans notre environnement après le lancement de fusées ou de rockets.



Fig.2

Aucune inhibition n'est observée avec ces deux molécules utilisées seules. De façon surprenante, les effets antithyroïdiens de ces deux antagonistes ne sont révélés que lorsqu'il y a co-traitement avec l'hormone T₃ (Fig3)

D'autres antagonistes ont été étudiés, un inhibiteur connu des désiodases, l'acide iopanoïque (IOP), et un véritable antagoniste de la T₃, le NH-3. L'action de ces substances est révélée en 72h en co-traitement avec les hormones T₃ et T₄. (Fig 3).

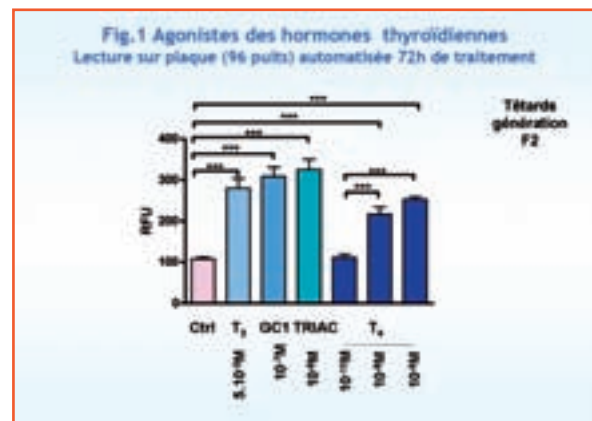


Fig.3

- Validation du test avec des perturbateurs endocriniens (**Fig 4**)

Le Bisphénol-A ou BPA est le monomère des plastiques alimentaires, des résines Epoxy, des ciments dentaires etc...Il a un effet anti-thyroïdien supposé.

Le Tetrabromobisphénol-A ou TBBPA est un retardateur de flammes utilisé dans les circuits imprimés des ordinateurs, sur les habits, les moquettes et autres tentures murales. C'est le retardateur de flamme bromé le plus produit. Il aussi a un effet anti-thyroïdien supposé.

Utilisant notre test en co-traitement, nous avons pu déceler des effets à des concentrations de l'ordre du micromolaire pour chacune des deux substances (**Fig 4**).

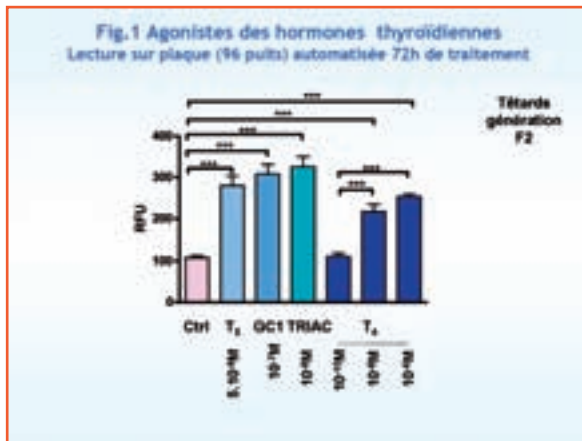


Fig.4

Conclusions

Nos recherches mettent en valeur une approche novatrice pour cribler les perturbateurs endocriniens. Les résultats préliminaires démontrent clairement l'applicabilité du système transgénique avec un système de lecture automatisée de moyen à haut débit. Ce système de têtards transgéniques constitue un modèle pertinent et puissant pour l'étude de la perturbation thyroïdienne par :

- des agonistes,
- des antagonistes agissant au niveau de la glande thyroïde
- des antagonistes agissant au niveau des des-iodases
- des antagonistes agissant au niveau du récepteur

- des perturbateurs endocriniens ayant des interactions potentielles avec des transporteurs
- des mélanges.

Enfin, sur un plan plus fondamental, ce modèle pourrait être d'un grand intérêt pour étudier la physiologie des stades précoces chez le têtard, qui est encore mal connue.

Partenaires du projet

Responsables du programme :

Barbara Demeneix, coordonnatrice
Muséum National d'Histoire Naturelle (MNHN) - Paris 5ème

Equipes associées au projet :

Patrick Balaguer
INSERM U540 Montpellier

Marc Léonard
L'Oréal Recherche Avancée
Direction des Sciences du Vivant

Identification de biomarqueurs protéiques de la perturbation endocrinienne, aux différents stades de développement du poisson Médaka – Mise au point d'un test de criblage corrélé aux essais réglementaires en voie de développement

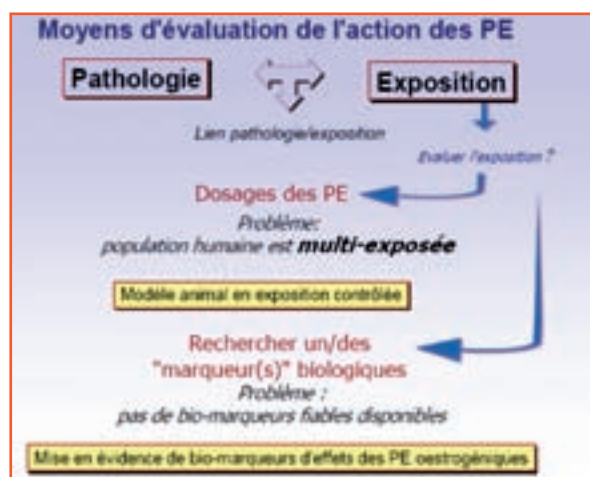
Charles Pineau,

Université de Rennes

Le contexte scientifique



Quels sont les moyens d'évaluer l'action de perturbateurs endocriniens ?



Les contraintes en écotoxicologie

Les industriels de la cosmétique sont face à des contraintes majeures en Ecotoxicologie :

- les Directives sur l'expérimentation animale sont très strictes

- les normes OCDE sont également très strictes
- Les essais in vivo sur les modèles animaux sont longs et fastidieux

Ces contraintes amènent la nécessité de tests de dépistage qui fassent appel aux stades précoces de développement des poissons

Les objectifs du projet :

- Mettre au point une méthode de criblage d'activité endocrinienne chez les stades précoces de développement du poisson
- Contribuer à la validation du test réglementaire en développement "extended OECD N° 210" en identifiant quels biomarqueurs protéiques apparaissent en corrélation avec les modifications histologiques des gonades

Identifier les stades précoces de développement (embryonnaires, larvaires ou juvéniles) exprimant ces biomarqueurs

L'objectif est de prédire l'apparition d'effets à plus long terme



Les difficultés rencontrées avec l'élevage de Médakas flfii ont retardé considérablement le calendrier des travaux

Le projet était initialement envisagé avec des Médakas FLFII dont la littérature scientifique témoigne de la facilité à identifier le sexe génotypique dès les 3 à 5 premiers jours du développement embryonnaire. En raison du retard pris pour la livraison des souches par l'université de Nagoya, nous avons proposé avec accord des partenaires du projet de nous rabattre sur la souche Médaka DrR. Celle-ci, disponible à l'INRA, était également décrite comme permettant le diagnostic du sexe génotypique par une différence de couleur observable après une vingtaine de jours de développement.

En fait, l'élevage de l'INRA de Jouy-en-Josas possédait cette souche mais cela nécessitait de relancer l'élevage pour obtenir suffisamment d'œufs pour lancer le test, ce qui a pris plusieurs mois. Entre temps, la station INRA de Jouy-en-Josas a décidé de rénover les locaux de l'élevage de Médaka. Le test a alors été lancé d'urgence juste avant la fermeture prévue de l'élevage en janvier 2007, le 20 décembre 2006 précisément.

Or la souche s'est avérée très fragile et nous avons dû arrêter le test à cause d'une mortalité supérieure à 75% dans l'ensemble des groupes (exposés et non exposés). De plus, il s'est avéré extrêmement difficile de les sexer même au stade juvénile.

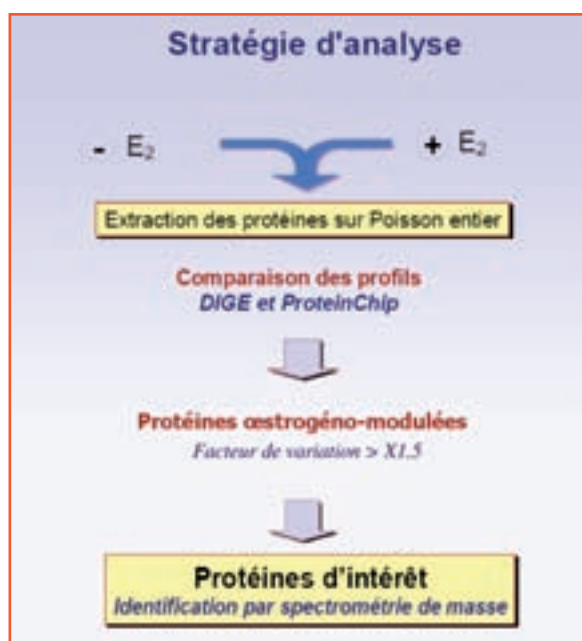
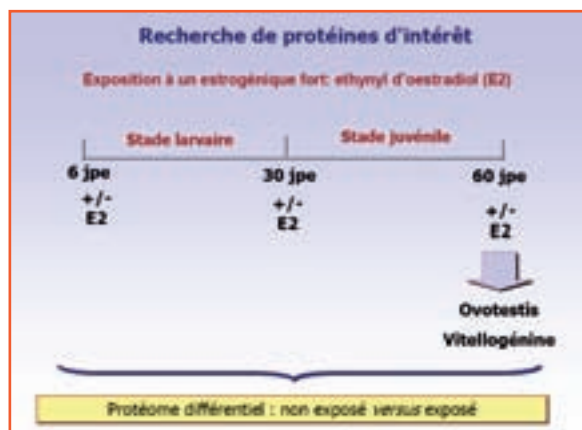
Fin janvier 2007, après réception du *Material Transfer Agreement (MTA)* signé par tous les partenaires, l'Université de Nagoya a accepté l'envoi des Médakas FLFII au sous-traitant de la société L'Oréal à qui a été confié le maintien de l'élevage: WATCHFROG. 100 œufs FLF II embryonnés ont été réceptionnés début août 2007. Fin août, nous avons observé un fort taux de mortalité de l'ordre de 80%. Nous en avons fait part à l'Université de Nagoya, qui n'a pas paru surprise de cette fragilité. Nous avons alors demandé un second envoi de matériel que nous avons reçu début octobre 2007. Fin octobre, nous avons observé encore une fois une forte mortalité. L'élevage n'est pas à remettre en cause dans la mesure où tous les paramètres de cet élevage ont été vérifiés.

La souche FLFII n'est pas très robuste (néanmoins plus que la souche DrR que nous avons reçue de l'INRA). De plus, les Médakas FLFII, tout comme les DrR, ont un développement deux fois plus lent que celui de la souche sauvage de Médaka (red-orange). Devant ces difficultés à répétition, nous avons décidé de poursuivre le projet avec la souche Medaka (Red-Orange) et de modifier nos modalités de travail et le calendrier (conf. Encadré)

Pour la recherche de biomarqueurs précoces, les poissons Medaka Red –Orange sont exposés à des stades précoces de leur développement à deux agonistes oestrogéniques:

- l'Éthynyl oestradiol (E2)
- le 4-t-pentylphénol

L'essai réglementaire en développement "*Extended OECD 210 - early life stage test*" concerne le stade blastula jusqu'à 60 jours après éclosion.



Nouveau plan de réalisation du projet et agenda

Nous proposons de poursuivre le projet selon des modalités différentes visant à contourner les difficultés rencontrées avec l'élevage. La réalisation du projet dans sa nouvelle version repose sur quatre modifications :

1. **Substituer l'utilisation de souches de Médakas** DrR ou FLF II pour l'identification du sexe génotypique par l'utilisation de la souche sauvage red-orange de Médaka. L'intérêt de passer à la souche sauvage est que l'on s'affranchit de la fragilité des souches mutantes. Ceci implique que le nombre initial de Médakas nécessaire sera beaucoup moins important (400 au lieu de 900 environ) soit l'équivalent d'une ponte classique de Médaka. La première phase du projet relative à l'exposition à l'éthynyl estradiol a débuté le Mardi 18 décembre 2007 avec un premier prélèvement le 28 décembre (JPE2), un second les 25 janvier et 24 février 2008. A ce jour la seconde phase du projet relative à l'exposition au 4-t-pentylphenol (4tPP) n'a pas encore été définie avec Watchfrog.

2. Caractériser les biomarqueurs protéiques d'exposition

selon les modalités initialement prévues dans la première phase de l'étude (exposition à l'éthynyl estradiol). Nous proposons cependant de changer le temps d'exposition 6 JPE par 2 JPE. En effet, nous sommes sûrs que l'on est à cet âge dans un stade de développement auquel le Médaka n'est pas encore considéré comme animal de laboratoire ; ce qui est important si l'on doit se rapporter à l'*Extended OECD n° 210*.

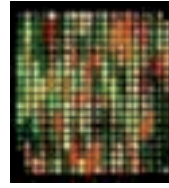
3. Identifier le sexe génotypique des animaux par RT-PCR.

Au moment des prélèvements, dans la mesure où nous avons choisi de travailler sur une population sauvage, chaque Médaka sera isolé et une nageoire (ou les deux en fonction de la taille de l'alevin) sera prélevée afin d'extraire les ARN totaux et de réaliser une RT-PCR avec l'aide d'une amorce spécifique du gène *Dmy* se trouvant sur le chromosome Y (Matsuda *et al.*, 2002*). Cette étape sera réalisée par Watchfrog et ceci vient d'être défini dans sa mission de sous-traitance pour L'Oréal. Les Médakas seront congelés individuellement dans l'azote liquide juste après le prélèvement de nageoire(s). Une fois les résultats de la RT-PCR obtenus, seuls les mâles seront envoyés à Innova Proteomics.

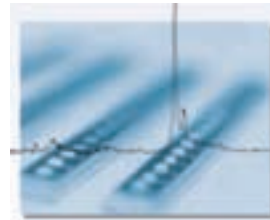
4. **Rechercher et valider par Q-PCR les biomarqueurs protéiques** identifiés lors du premier essai (exposition à l'EE2) au cours du second essai avec l'agoniste faible (4-t-pentylphenol). Les études par Q-PCR pouvant être menées très rapidement, permettront de clore les travaux avant la date de fin du projet programmée le 28 mai 2008.

* M. Matsuda, Y. Nagahama, A. Shinomiya, T. Sato, C. Matsuda, T. Kobayashi, C. E. Morrey, N. Shibata, S. Asakawa, N. Shimizu, H. Hori, S. Hamaguchi, M. Sakaizumi. Nature 2002; 417, 559-563.

- L'imagerie de spectrométrie de masse sur le poisson entier



- Les puces dédiées protéines/anticorps



- Le Profiling différentiel sur ProteinChip

Etat d'avancement des travaux :

Réalisés :

- Mise en place de l'élevage
- Stabulation des poissons
- Contrôle des conditions d'exposition
- Extraction des protéines totales à partir du poisson entier
- Fractionnement des échantillons sur gel
- Conditions du Profiling sur ProteinChip®

En cours

- Les analyses des expériences d'électrophorèse différentielle sur gel (DIGE) et de puces à protéine
- Le dosage de la vitellogénine
- Les analyses histologiques des gonades

Perspectives

Notre objectif est de développer des tests peu coûteux, rapides, fiables pour le criblage de substances à haut-débit à l'aide de trois techniques très performantes :

Partenaires impliqués

Pineau Charles,
Coordonnateur INSERM

Sylvie BIAGIANTI-RISBOURG
Université de Reims Champagne Ardenne

Frédéric BOURGEON
Innova PROTEOMICS ,Rennes

Marc LEONARD,
L'Oréal, Aulnay sous bois

Sylvia GIMENO,
Procter & Gamble, Belgique

Fipronil et retardateurs de flamme polybromés : exposition et altération des fonctions thyroïdienne et corticosurrénalienn

Catherine Viguié

INRA ENVT-Toulouse

Ce projet propose d'évaluer le potentiel toxique de deux perturbateurs endocriniens potentiels pouvant du fait de leur usage - fipronil comme insecticide et Polybromodiphényl ethers (PBDE) comme adjuvant de plasturgie - constituer des polluants environnementaux importants, sur les fonctions thyroïdienne et corticosurrénalienn. Il s'agit d'un projet collaboratif basé sur une approche globale intégrant tous les niveaux du vivant.

Il a pour objectif l'étude de tous les aspects pharmacocinétiques et pharmacodynamiques de l'exposition de l'organisme et des mécanismes d'actions de ces molécules sur ces deux fonctions. Il se développe selon 3 axes de recherche :

Axe 1 : Evaluation de l'exposition

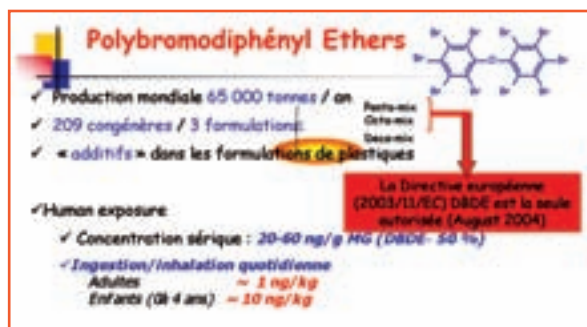
Axe 2 : Mécanismes impliqués dans l'exposition :

- passage de la barrière digestive, transport et pénétration cellulaire
- Devenir métabolique dans l'organisme

Axe 3 : Mécanismes d'action

- Marqueurs d'exposition / marqueurs d'effets: criblage génomique
- Effets physiopathologiques sur les systèmes endocriniens d'intérêt.

Impact socio-économique des Perturbateurs thyroïdiens & Corticosurréaliens



- Augmentation carcinogénese thyroïdienne (incidence chez la femme: 1980 2.7/100000 en 2000 7.5/100000)

- Absence quasi-totale d'information sur la fonction corticosurrénalienn (*gestion du stress - inflammation ...*)

- Développement foetal et néonatal = périodes à risque / perturbation thyroïdienne corticosurrénalienn:

maturation SNC => conséquences à long terme (Zoeller et al., *Environ Health Perspect*; 2002)

Caractérisation de l'exposition

Deux types d'exposition sont étudiés :

- Exposition de source alimentaire : Evaluation du taux de contamination de produits dérivés de l'apiculture (pollen et miel au travers d'une enquête prospective multifactorielle sur 25 ruchers en France).

- Exposition professionnelle (Hopitaux de Toulouse Service des Maladies Professionnelles et Environnementales) : étude prospective ergotoxicologique dans une usine qui conditionne le Fipronil à usage vétérinaire ayant pour buts 1) de déterminer les niveaux d'exposition du personnel, 2) si possible d'établir un lien entre cette exposition et des pratiques de travail et 3) d'évaluer l'existence d'un lien entre exposition et profils thyroïdiens.

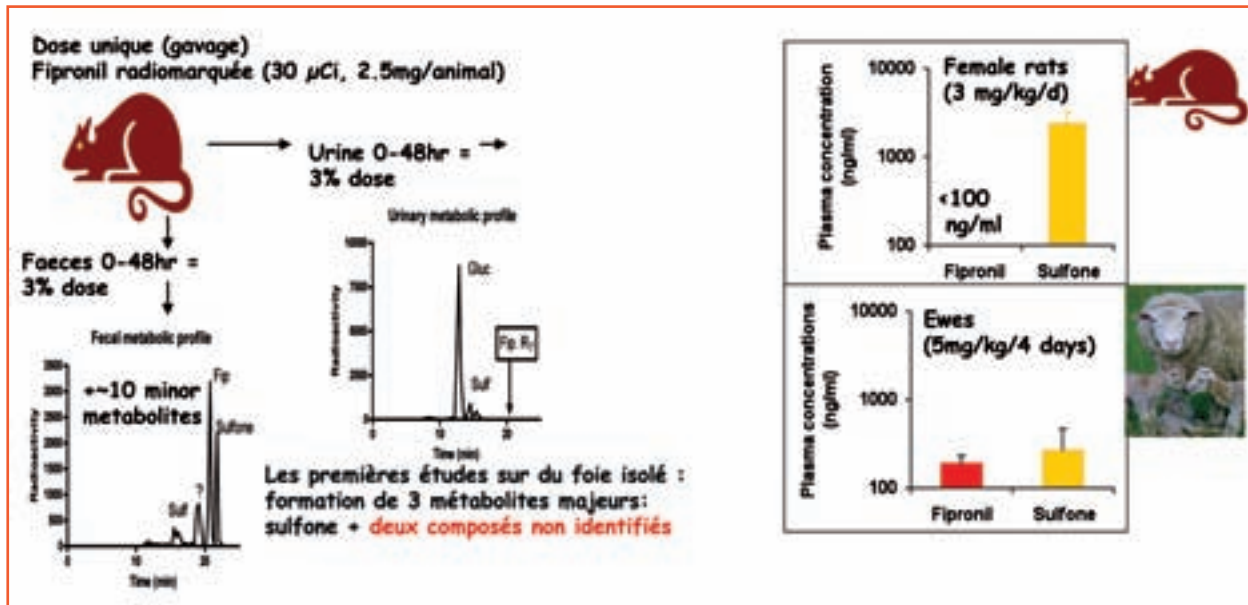
La collecte des données pour ces deux études est achevée et l'analyse des données est en cours. Nous ne disposons pas encore de résultats.

Le transport au travers des barrières physiologiques

Le passage des barrières physiologiques qui conditionne l'exposition de l'organisme aux toxiques est envisagé à travers deux mécanismes fondamentaux: 1) le passage de la barrière digestive et, 2) les interactions avec les systèmes protéiques gérant l'efflux des xénobiotiques hors des cellules. Sont étudiés d'une part, le transport transépithélial du Fipronil sur des cellules CaCo II d'origine humaine, mimant le passage de l'épithélium digestif et, d'autre part, les interactions du Fipronil avec les pompes à efflux de détoxification sur des cellules épithéliales sur-exprimant deux systèmes de pompes à efflux, P-gp et MRP. Les études réalisées sur CaCoII indiquent que le passage du fipronil procède à la fois de mécanismes actifs et passifs. Les études sur les cellules transfectées indiquent clairement que le fipronil interagit peu ou pas avec ces deux types de pompes à efflux.

Modulation de l'exposition, métabolisme du fipronil:

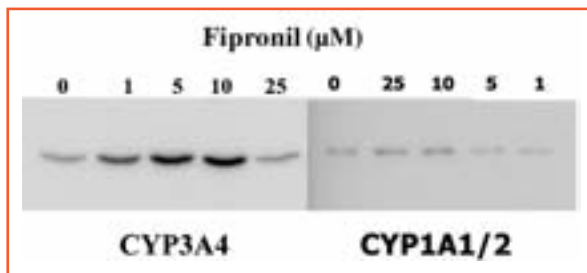
Fig. 1: Exemples de profils métaboliques fécaux et urinaires obtenus chez un rat ayant reçu une administration unique par voie orale de fipronil (graphe de gauche). Concentrations plasmatiques en fipronil et son principal métabolite sulfone chez le rat et le mouton (graphes de droite) lors d'administrations orales répétées de fipronil. Le rapport sulfone/ fipronil est supérieur à 20 chez le rat alors qu'il n'est que de 1 à 2 chez le mouton indiquant que le rat est beaucoup plus exposé au métabolite sulfone qu'au fipronil lui-même lors d'ingestion de fipronil.



La caractérisation des voies métaboliques du fipronil a été entreprise chez le rat. La détermination des principaux métabolites dans le plasma suite à des administrations répétées chez le rat (modèle "réglementaire" d'évaluation toxicologique) et chez l'ovine (modèle d'étude pour la fonction thyroïdienne) fait apparaître des différences quantitatives interspécifiques importantes. Cette constatation soulève la question de la pertinence des modèles animaux pour les études de toxicologie chez l'homme. Cette question sera abordée *in vivo* à partir du métabolisme du fipronil sur cultures d'hépatocytes des trois espèces (homme, ovine, rat).

Mécanismes d'action du Fipronil sur la fonction thyroïdienne : sites d'action hépatiques

(Fig.2): Effets du fipronil sur l'expression des cytochromes des familles CYP3A4 et CYP1A1/2 sur hépatocytes humains en culture.



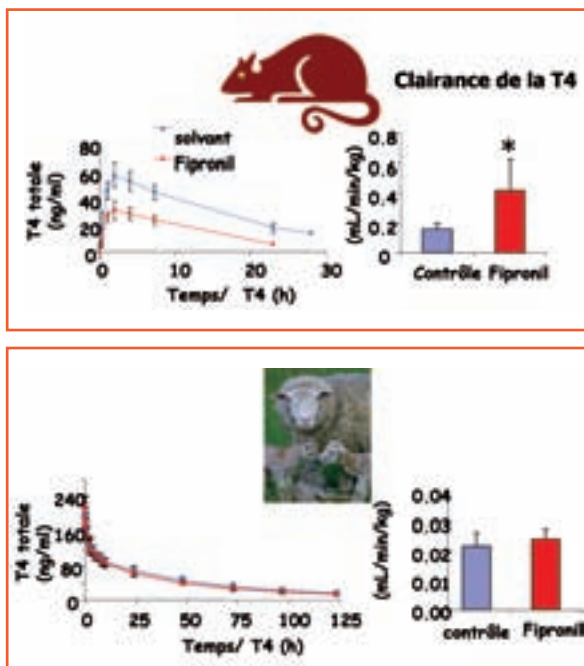
Le fipronil modifie l'expression de CYP3A4 d'hépatocytes humains de façon dose dépendante de 1 à 10 µM.

Mécanismes d'action du Fipronil sur la fonction thyroïdienne : modulation du métabolisme et de l'élimination des hormones thyroïdiennes (Fig.3)

La plupart des évaluations toxicologiques portant sur la perturbation thyroïdienne sont réalisées chez le rat. Or, le rat adulte, contrairement à l'homme, n'exprime pas la Thyroxine Binding Globulin (TBG), protéine de liaison plasmatique hautement spécifique des hormones thyroïdiennes (HT). Cette protéine jouerait un rôle important dans le maintien de l'homéostasie de la fonction thyroïdienne en protégeant les HT du catabolisme, un des phénomènes contrôlant leur clairance. De ce point de vue, le rat pourrait donc être une espèce "hypersensible" à des perturbations de l'homéostasie thyroïdienne et ne serait pas un modèle optimal pour évaluer un potentiel pertur-

bateur thyroïdien pour l'homme. C'est d'ailleurs un argument communément avancé par les industriels pour réfuter les résultats de perturbation thyroïdienne observés chez le rat dans le cadre d'évaluation toxicologique réglementaire. Les effets du fipronil sur la fonction thyroïdienne et plus particulièrement la capacité d'élimination des hormones thyroïdiennes (caractérisée par le paramètre de clairance) ont été évalués conjointement chez le rat (espèce "réglementaire" en toxicologie) et le mouton (espèce modèle par rapport à l'homme pour la régulation de la fonction thyroïdienne).

Fig. 3 : Comparaison des cinétiques d'élimination (décroissance des concentrations plasmatiques) d'hormone thyroïdienne, T4, exogène chez des rats et des moutons exposés ou non au fipronil : rôle protecteur de la TBG?



Le fipronil multiplie par 2 la clairance de la thyroxine (T4) chez le rat mais ne la modifie pas chez le mouton ce qui serait cohérent avec un rôle protecteur de la TBG. Toutefois, nos études ultérieures ont montré que certains effets d'un traitement au fipronil liés à une induction des systèmes enzymatiques hépatiques qui se produisent chez le rat ne se produisent pas chez le mouton. Ces derniers résultats suggèrent que le mouton serait beaucoup moins sensible aux effets inducteurs d'un traitement au fipronil sur les enzymes hépatiques. Il reste à déterminer si cette divergence de sensibilité entre les deux espèces pourrait être due aux différences dans le métabolisme du fipronil décrites précédemment.

Conclusion des études sur le Fipronil et perspectives :

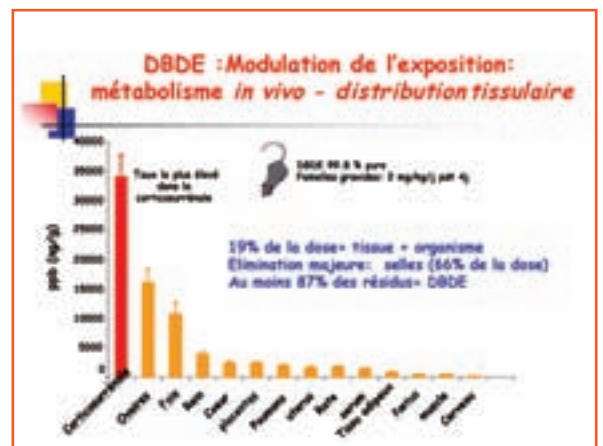
L'ensemble des travaux réalisés à ce jour souligne l'existence d'importantes différences interspécifiques dans le métabolisme du fipronil et dans ses effets sur la fonction thyroïdienne. Cela souligne toute l'importance qui devrait être accordée dans les évaluations toxicologiques à la caractérisation de la pertinence des modèles animaux par rapport à l'homme en ce qui concerne 1) la fonction physiologique ciblée par le toxique et 2) les voies métaboliques de ce composé.

C'est donc une des perspectives immédiates de ce travail que de réaliser une caractérisation détaillée du métabolisme du fipronil par des hépatocytes des trois espèces d'intérêt pour ce projet.

Modulation de l'exposition : distribution tissulaire (Fig 4)

L'exposition au DBDE conduit à une distribution tissulaire ubiquitaire avec un taux élevé dans la cortico-surrénale et à un moindre niveau dans les ovaires et le rein.

Fig. 4.

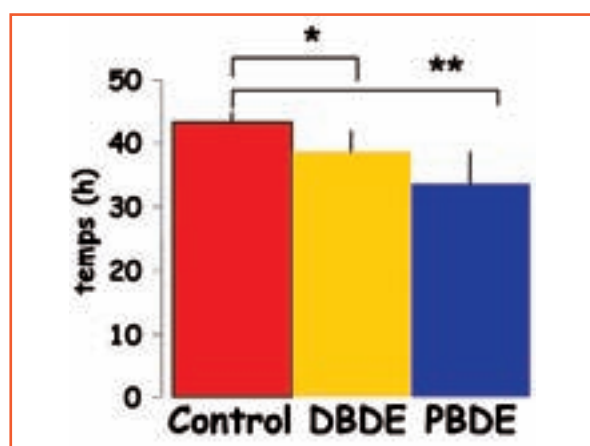


Modulation de l'exposition : transport plasmatique

Nos premiers résultats indiquent que le DBDE est très largement pris en charge dans la circulation sanguine par les lipoprotéines HDL chez le rat. Ceci suggère que les expositions à ce toxique pourraient être liées à la teneur plasmatique en lipoprotéines du cholestérol.

Mécanisme d'action sur la fonction thyroïdienne

Fig. 5 : Effet d'un traitement au pentamix (mélange de différents congénères de PBDE contenant majoritairement du composé à 5 atomes de brome, en bleu) et du decabromodiphényl éther (10 atomes de brome, seul autorisé au sein de l'Union Européenne, en jaune) sur la demi-vie plasmatique de l'hormone thyroïdienne T4 chez le mouton



Les deux composés diminuent de façon significative le temps de demi-vie de la T4. Cependant, cet effet est plus marqué avec le composé enrichi en pentabromodiphényl éther qu'avec le DBDE. Des études métaboliques approfondies sont nécessaires pour déterminer si ce léger effet du PBDE peut être lié à la formation de métabolites actifs tels que des congénères plus faiblement bromés, semblables à ceux contenus dans le pentamix et/ou des composés hydroxylés structurellement proches des hormones thyroïdiennes.

Conclusions et perspectives

Les résultats obtenus portent essentiellement sur le fipronil. Du point de vue de la caractérisation de l'exposition humaine professionnelle ou alimentaire, le projet en est à une étape de collecte des données.

Sur le rôle du métabolisme en tant que modulateur de l'exposition, des développements méthodologiques importants ont été nécessaires. Les premiers résultats obtenus en matière de transport du fipronil suggèrent que le passage de la barrière digestive puisse se faire de façon importante par des mécanismes actifs et passifs. Les ré-

sultats sur hépatocytes humains et par approche transcriptomique sur le rongeur indiquent un certain potentiel pour cet insecticide à moduler des fonctions enzymatiques hépatiques.

Enfin, les études pharmacotoxicologiques in vivo soulignent les divergences importantes d'effet sur la fonction thyroïdienne entre espèces animales modèles. Une des perspectives de ce projet est de caractériser l'origine de ces divergences afin de déterminer quelle est l'espèce animale la plus pertinente par rapport à l'Homme pour l'évaluation de la toxicité thyroïdienne de ce composé.

Les premiers résultats obtenus sur les PBDE indiquent un certain potentiel à modifier la fonction thyroïdienne, y compris chez l'ovine.

Partenaires impliqués

Catherine Viguié
Coordinatrice- INRA-ENVT

E. Boutet - JM Soulat
Hôpitaux de Toulouse - INSERM U558

AC Martel - M Aubert
AFSSA

T Pineau - A Lespine
UR INRA

D Zalko , R Rahmani
INRA/ENVT

L Belzunces
INRA/UAPV

V. Gayraud
UMR 181

JP Antignac, B. Lebizec, E. Bichon
LABERCA-ENVN

Dix années de mélanges de perturbateurs endocriniens – Où en est-on ?

Conférencier invité

Andréas Kortenkamp,

The School of Pharmacy, Londres,

Au cours des récentes années, ont été publiées une série d'études sur les combinaisons de substances à activité oestrogénique, de perturbateur thyroïdien et anti-androgénique présentes à faibles doses. Les études expérimentales font apparaître que les effets combinés pourraient résulter des perturbateurs endocriniens avec pour chacun un impact très faible s'ils sont présents en nombre suffisant. Nous avons étudié l'implication de ces travaux en termes d'évaluation du risque chimique et d'épidémiologie. L'évaluation du risque pour l'homme exige une bonne connaissance des scénarios d'exposition dans l'environnement, ce qui n'est pas actuellement le cas. En termes épidémiologiques, il est indispensable de prendre en compte la réalité d'une multi-exposition à des perturbateurs endocriniens. Il devient alors indispensable de découvrir des biomarqueurs pertinents, c'est-à-dire qui reflètent une exposition cumulée à ces substances de l'environnement.

Coordonnées

Porteurs de projets

Jacques Auger

Service d'Histologie-Embryologie, Biologie de la Reproduction / CECOS,
Pavillon Cassini, Hôpital Cochin, 123, Bd de Port Royal 75014 Paris - France
Tel: 33 (1) 58 41 15 67
Fax: 33 (1) 58 41 15 65
email: jacques.auger@cch.aphp.fr

François Brion

Institut National de l'environnement industriel et des risques
Direction des Risques Chroniques,
Unité d'évaluation des Risques écotoxicologiques
BP 2
60550 Verneuil-en-Halatte
Tel : 03 44 55 65 12
Email : francois.brion@ineris.fr

Barbara Demeneix

Muséum National d'Histoire Naturelle
USM 501 - CNRS UMR 5166
Evolution des Régulations Endocriniennes
CP n°32 - 7 Rue Cuvier –
75231 Paris CEDEX 5 - France
Tel : 01 40 79 36 07

Luc Multigner

INSERM U625, Campus de Beaulieu, Université Rennes 1
35042 Rennes Cedex
Tel : 02 23 23 59 28
Luc.multigner@rennes.inserm.fr

Charles Pineau

UPRES JE2459
"Acteurs Moléculaires de la Spermatogenèse"
Campus de Beaulieu
Université de Rennes I
35042 Rennes cedex – France

Jean-Marc Porcher

INERIS
Verneuil en Halatte
Tel : 03 44 55 65 84
Jean-marc.porcher@ineris.fr

Catherine Vigué

INRA ENVT-Toulouse
UMR 181
31076 Toulouse cedex 3
tèl: 05 61 19 39 13
E-mail: c.viguie@envt.fr

Coordination, Organisation & synthèse

Pierre Vaiss

MEEDDAT

20 Avenue de Ségur

75007 Paris

Pierre.VAISS@developpement-durable.gouv.fr

Myriam Leveugle

leveugle.ecrin@gmail.com

Odile Robert

5 Rue de la Clef

75005 Paris

Tel : 01 43 36 63 12

odirobert@gmail.com

La prise de conscience de la présence dans l'environnement de substances susceptibles de perturber les systèmes endocriniens des animaux et éventuellement des humains s'est imposée depuis le début des années 1990. C'est à cette époque qu'ont été publiées plusieurs études sur le déclin de la qualité du sperme, l'augmentation de la fréquence de certaines anomalies du développement du tractus génital, ainsi que l'augmentation de l'incidence de certaines pathologies hormono-dépendantes chez les humains.

Le Programme National sur les Perturbateurs Endocriniens (PNRPE) mis en place par le Ministère de l'Ecologie, du Développement Durable et de l'Aménagement du Territoire a lancé en 2005 un appel à propositions de recherches (APR) qui couvre l'ensemble des effets des perturbations endocriniennes au sens large.

Ce document de synthèse reprends les résultats de recherche exposés lors du Workshop organisé le 10 mars 2008 à Angers.

Ce workshop, qui fait le point à mi-parcours des recherches conduites dans le cadre de ce premier APR, a réuni les porteurs de projets et leurs partenaires, les membres du Conseil scientifique et les membres du Conseil d'orientation du programme. Ce séminaire de travail sur les résultats partiels des équipes a permis une rencontre utile aux équipes par les discussions et les interactions avec les membres du Conseil scientifique et du comité d'orientation. Les principaux thèmes abordés au cours de ce séminaire relèvent du criblage, des mécanismes d'action, du devenir dans l'organisme et dans les milieux des perturbateurs, et de l'évaluation des risques, de épidémiologie, de l'écotoxicologie et de la surveillance de l'environnement.

