

INERIS



EVALUATION DES EFFETS ENDOCRINES DES  
OESTROGENES MIMETIQUES ET DES COMPOSES A  
ACTIVITE DIOXINE SUR L'EXPRESSION DE GENES CIBLES  
ET IMPACTS FONCTIONNELS SUR LA REPRODUCTION CHEZ  
LE POISSON

ASSESSMENT OF ENDOCRINE EFFECTS OF XENO-  
ESTROGENS AND DIOXINE-LIKE COMPOUNDS ON THE  
EXPRESSION OF TARGET GENES AND FUNCTIONAL  
IMPACTS ON FISH REPRODUCTION

Programme National de Recherche sur  
les Perturbateurs Endocriniens  
Rapport Final

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

Date : 20/09/2009

N° de contrat : CV N°05000194  
Date du contrat : 27/01/2006

## **Organismes partenaires du programme**

**Farzad Pakdel, Olivier Kah:** Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), UMR CNRS 6026 - Université de Rennes 1, Laboratoire d'Endocrinologie Moléculaire de la Reproduction, Rennes, France

**Gilles Monod.** Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Station Commune de Recherches en Ichtyophysiologie Biodiversité et Environnement (SCRIBE), Rennes, France

**François Brion, Nathalie Hinfrey, J-M. Porcher.** Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS), Direction des Risques Chroniques, Unité d'écotoxicologie, Verneuil-en-Halatte, France.

## RESUME

L'objectif de ce programme était d'étudier au niveau moléculaire, cellulaire et organismal, les interactions et les effets sur la reproduction du poisson de deux familles de molécules environnementales très ubiquistes, les ligands du récepteur aux hydrocarbures aromatiques (AhR), tels que les dioxines et les HAPs, et les ligands des récepteurs des œstrogènes (ER) comme l'œstradiol ou l'éthinylœstradiol. A l'aide de bio-essais *in vitro* et *in vivo*, les expressions des gènes aromatasés *cyp19a* et *cyp19b* de *Danio rerio* ont été étudiées, en présence d'agonistes AhR, seuls ou en mélanges, avec des œstrogènes. Nous montrons que les œstrogènes, mais pas les AhR agonistes, induisent l'expression du gène et de la protéine aromatasé B dans les cellules gliales de poisson zèbre. Oestrogènes et dioxines sont sans effet sur l'expression du gène *cyp19a*. En co-exposant les organismes à des œstrogènes et à des AhR agonistes (TCDD, B[a]P, bNF), nous montrons que les inductions E2-dépendantes du *cyp19b* sont inhibées démontrant l'anti-œstrogénicité de ces molécules. Ce mécanisme d'anti-œstrogénicité implique des AhR fonctionnels mais n'implique pas les sites DRE dont nous démontrons qu'ils ne sont pas fonctionnels dans les régions promotrices des gènes *cyp19* de poisson zèbre. Par ailleurs, nous montrons qu'au cours de l'embryogenèse le cross-talk ER/AhR est unidirectionnel, l'œstradiol et l'éthinylœstradiol ne modulant pas l'activité 7-ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) du cytochrome P4501A. Des expositions de poissons zèbres durant leurs développements précoces à de faibles concentrations en éthinylœstradiol et en dioxine, ont permis de montrer que l'EE2, seul ou associées à la TCDD, durant les stades précoces de développement altéraient l'expression de gènes impliqués dans la signalisation œstrogénique dans le cerveau, i.e. l'ER $\alpha$  et l'aromatasé cérébrale. Notamment, nous montrons l'induction de l'aromatasé cérébrale pour des concentrations environnementales d'EE2 et la capacité de faibles doses de TCDD à inhiber ces inductions. De manière intéressante, les réponses biochimiques et histologiques mesurées étaient de natures différentes puisque la dioxine potentialise l'effet de l'EE2 sur l'expression d'un gène ER-dépendant dans le foie, la vitellogénine, et n'est pas capable de moduler l'effet de l'EE2 sur le développement gonadique. Enfin, chez la gambusie, un protocole expérimental original basé sur la manipulation photopériodique permettant de stopper et d'enclencher l'activité ovarienne de la gambusie a été utilisé pour étudier les effets de la bNF sur la vitellogenèse et la qualité de la descendance. Des premiers résultats obtenus supportaient l'hypothèse d'un effet négatif de cette molécule sur la vitellogenèse. Cependant ces résultats n'ont pu être reproduits dans le cadre de ce programme. L'ensemble de ce travail démontre des interactions croisées entre les ligands ER et AhR qui sont de natures complexes et l'intérêt des modèles biologiques *in vitro* et *in vivo* utilisés pour étudier ces interactions chez le poisson. La forte sensibilité de la signalisation œstrogénique (ER $\alpha$ , *cyp19b*) dans le système nerveux central aux ligands ER et AhR soulève le besoin d'évaluer plus précisément leurs effets sur les fonctions neuro-endocrines impliquées dans la reproduction.

*Mots clés* : poisson zèbre, gambusie, aromatasé, *in vitro*, *in vivo*, œstrogènes, dioxines, reproduction.

## ABSTRACT

The aim of this program was to study at molecular, cellular and organism level, the interactions and the effects of aryl hydrocarbon receptor (AhR) ligands such as dioxins and PAHs and estrogen receptor (ER) ligands such as estradiol (E2) and ethynylestradiol, on fish reproduction. By using *in vitro* and *in vivo* assays, zebrafish *cyp19a* and *cyp19b* aromatase genes were studied, in the presence of AhR agonist compounds, alone or in combination with estrogens. We show that estrogens, but not dioxin-like substances, induced the expression of brain aromatase in radial glial cells in zebrafish larvae. Estrogens and dioxins had not effect *in vivo* on the *cyp19a* gene expression. The estrogen-induced brain aromatase expressions were inhibited in zebrafish larvae co-exposed to estrogens and dioxins (TCDD, B[a]P, bNF), demonstrating the anti-estrogenicity of AhR agonist compounds. The *in vivo* and *in vitro* anti-estrogenicity of dioxin require functional AhR, ERE site but not DRE sequence in the promoter region that are not functional. Furthermore, by measuring the 7-ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in zebrafish embryos exposed to TCDD, with or without E2 or EE2, we showed that the ER/AhR cross-talk is unidirectional since both ER agonist compounds were not able to modulate the TCDD-induced EROD activity during embryogenesis. We further showed that fish early life stage exposure to low concentrations of EE2 and TCDD, alone or in combination, led to alterations of key target genes involved in the estrogen signaling pathway in the CNS of fish i.e. ER $\alpha$  and brain aromatase. Notably, we showed the estrogenic effect of EE2 at an environmentally relevant concentration by its ability to induce brain aromatase and an anti-estrogenic effect of TCDD by its ability to inhibit these EE2-dependant inductions. Interestingly, this anti-estrogenic effect was not observed for the other biochemical and histological endpoints measured, as shown by the ability of TCDD to potentiate the effect of EE2 on Vtg induction and the inability of TCDD to counteract the arrest/retardation of gonad development caused by EE2. Finally, in the mosquitofish, an original experimental protocol was established to assess the effect of beta-naphthoflavone on vitellogenesis and the quality of the F1 generation. The resultants from a first experiment supported the hypothesis that bNF elicit a negative effect on vitellogenesis. However, we were not able to reproduce these data within the framework of this program. Overall, we demonstrate complex interaction of ER/AhR ligand on fish reproduction and the usefulness of the *in vitro* and *in vivo* model employed in our works to further study the interaction and effects of ER/AhR cross-talk in fish. Our data also highlight the pronounced effect of ER and AhR ligands on the estrogenic signalling pathways within the central nervous system of fish raising the need to further investigate their effect on neuroendocrine circuits controlling fish reproduction.

*Key words* : zebrafish, mosquitofish, aromatase, *in vitro*, *in vivo*, estrogens, dioxins, vitellogenesis, sex differentiation.

## CONTEXTE ET OBJECTIFS

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'année il a été clairement montré que certaines molécules, largement répandues dans l'environnement, ont des activités œstrogéno-mimétiques chez le poisson 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 ERs, il convient de prendre en compte que, 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 renseignés 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 apparaît comme nécessaire dans une perspective d'évaluation du risque.

L'objectif de ce programme est d'étudier aux niveaux cellulaires, tissulaires et organismal, les interactions entre ces deux classes de composés ubiquistes, les œstrogènes mimétiques et les composés à activité dioxine-like, sur des modèles poissons. Plus spécifiquement, nos objectifs sont :

1. 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 et à déterminer les interconnexions entre le complexe AhR/Arnt et les ERs et les conséquences sur la signalisation œstrogénique
2. 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 hormonales : la différenciation sexuelle et la vitellogenèse.

## DEMARCHE EXPERIMENTALE.

Pour traiter de la problématique des effets et des interactions entre les œstrogènes mimétiques et les molécules à activité dioxine sur la reproduction des poissons, notre stratégie combine des **modèles biologiques de complexités variables** afin d'appréhender les effets à des **niveaux d'organisation biologiques variées** :

- *Au niveau moléculaire :*

Il s'agit d'étudier *in vitro* les interconnexions entre le complexe AhR/Arnt et les ERs et 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 ovarienne 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*) exposés aux stades embryo-larvaires et juvéniles à des (xéno)- œstrogènes et à des composés à activités dioxines, seuls ou en mélange et d'étudier les impacts sur la régulation de **gènes cibles hormono-régulés** 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 menés 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).

## Résultats et Discussions

### 1. ETUDE DES INTERACTIONS CROISEES ENTRE LES LIGANDS ER ET AHR SUR L'EXPRESSION DE GENES ER- ET AHR-DEPENDANTS CHEZ LE POISSON ZEBRE.

#### 1. 1. Etude des effets in vitro et in vivo de molécules agonistes du récepteur Ah, seuls ou en mélange avec des œstrogènes, sur l'expression des Gènes de l'aromatase

Les travaux réalisés dans cette partie ont eu pour objectifs d'analyser au niveau moléculaire, cellulaire et organismal les mécanismes et effets de molécules agonistes du récepteur Ah (AhR) seul ou en mélange avec des œstrogènes, sur l'expression des gènes de l'aromatase qui codent pour les cytochromes P450 aromatase, enzyme clé de la stéroïdogenèse, responsable de la conversion irréversible des androgènes en œstrogènes. Comme de nombreux poissons téléostéens, le poisson zèbre possède deux gènes de l'aromatase, l'un, *cyp19a*, principalement exprimé dans les gonades, l'autre, *cyp19b*, majoritairement exprimé dans le cerveau. Ces deux gènes jouent un rôle primordial dans les mécanismes de développement et de reproduction des poissons. En particulier, l'aromatase cérébrale (*cyp19b*) est soupçonnée d'être impliquée dans la régulation des fonctions neuroendocriniennes des oestrogènes intervenant notamment dans le développement du cerveau et la programmation du comportement sexuel mâle. L'aromatase ovarienne est quant à elle impliquée dans la différenciation sexuelle du poisson (Fenske et Segner, 2007, Rodriguez-Mari et al., 2005). Par comparaison de séquences avec d'autres promoteurs, trois éléments susceptibles de lier les complexes activés des récepteurs des oestrogènes ou des dioxines et pouvant donc intervenir dans la régulation de l'expression génique ont pu être identifiés dans le promoteur de l'aromatase (Figure 1). Il a été récemment démontré que les sites ERE étaient fonctionnels (Menuet et al., 2005). Par contre, la fonctionnalité des éléments de réponse potentiels aux dioxines n'a pas encore été prouvée mais suggérée (Kazeto et al., 2004).

Différents agonistes des récepteurs Ah et ER ont été sélectionnés (Tableau 1).

Tableau 1. 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), $\beta$ -naphtoflavone (bNF)	$\alpha$ -naphtoflavone (ANF)
œstrogène (ER)	17 $\beta$ -œstradiol (E2), 17 $\alpha$ ethynylœstradiol (EE2)	ICI 182 780 (ICI)

L'analyse des mécanismes et effets ont été étudiés à l'aide de différents essais biologiques *in vitro* et *in vivo* (Tableau 2).

Tableau 2. Modèles biologiques utilisés pour l'étude des effets des agonistes Ah et ER, seul et en mélange.

	Modèles biologiques	Activité mesurés	facteurs de transcription étudiés
<i>In vitro</i>	Cellule gliale (U251-MG)	gène rapporteur ZfCyp19b-luc	ZfER $\alpha$ ± zfAhR2/ARNT2b
	Cellule ovarienne de hamster chinois (CHO)	gène rapporteur ZfCyp19a-luc	ZfER $\alpha$ ± zfAhR2/ARNT2b
<i>In vivo</i>	Larves de poisson zèbre	-ARNm <i>cyp19b</i> et <i>cyp19a</i> - protéine AroB	ERs et AhRs endogènes

Les résultats de ces expérimentations seront ici volontairement synthétisés pour ne dégager que les résultats significatifs. Nous invitons les lecteurs à se référer à la publication de l'annexe 1<sup>1</sup> qui présente de manière exhaustive l'ensemble des données acquises dans cette partie du programme. Des données complémentaires à celles présentées dans l'article 1 viendront illustrer en partie nos propos.

*In vivo*, les œstrogènes induisent l'expression du gène *cyp19b* et la synthèse de la protéine AroB dans les cellules gliales radiaires de larves de poisson zèbre après 72 heures d'exposition (figure 1B). Nous avons confirmé cet effet *in vitro*. En présence de zfER $\alpha$ , l'induction du gène *cyp19b* est confirmée dans le contexte gliale radiaire (induction de l'activité transcriptionnelle du gène rapporteur zfcyp19b-luc dans la lignée U251-MG). Chez les larves, les œstrogènes n'affectent pas l'expression du gène *cyp19a*. Au contraire, dans les cellules CHO co-transfectées avec le promoteur zfcyp19a-luc et le zfER $\alpha$ , l'activité luciférase est induite et dépendante du ER $\alpha$ . L'étude de l'expression tissu- ou cellule- spécifique du gène *cyp19a* ou de la protéine AroA dans les larves de poisson zèbre aurait permis d'aller plus loin afin de comparer les réponses entre les modèles biologiques.

<sup>1</sup> Cheshenko K.\*, Brion F.\*, Le Page Y., Hinfrey 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 1<sup>er</sup> auteurs.

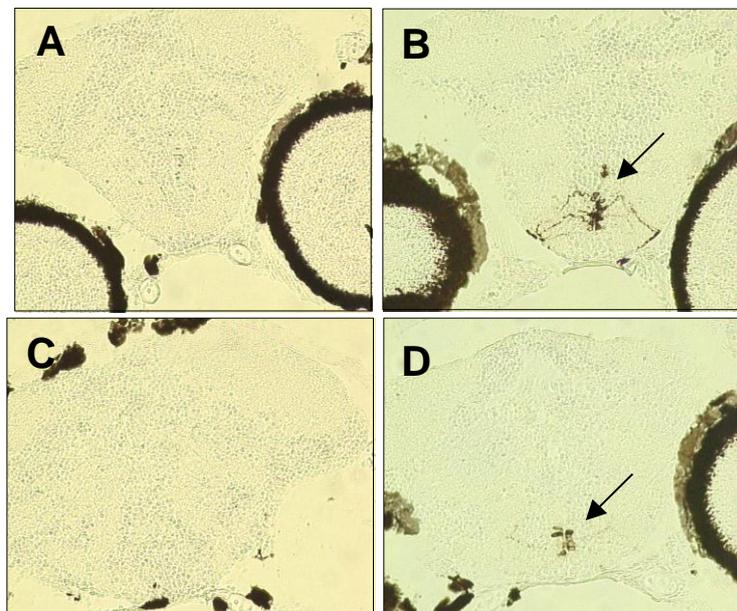


Figure 1. Effet de la TCDD (0.1 nM)  $\pm$  EE2 (10 nM) sur l'expression du protéine AroB chez les larves de poisson zèbre âgées de 14 jours post-fertilisation. (A) témoin solvant (B) EE2 10 nM (C) TCDD 0.1 nM (D) TCDD +EE2. Coupes transversales de cerveaux de larves de poissons zèbres et immunomarquages réalisés avec un AC anti-zfAROB. Aucun marquage n'est observé dans les cellules gliales radiaires des individus témoins solvant (n=3), TCDD (n=3). Chez les individus co-exposés TCDD +EE2 (n=3), un seul individu présentait des marquages de faibles intensités comparativement aux poissons exposés à l'EE2.

Les molécules agonistes des AhR (TCDD, du B[a]P et bNF) ne modifient pas l'expression des gènes de l'aromatase *in vivo* chez les larves de poisson zèbre (figure 1C pour l'arob). De la même manière, les expérimentations *in vitro* démontrent l'absence de réponse des gènes *cyp19a* et *cyp19b* dans les cellules CHO et U251-MG en présence des hétérodimères zfAhR2/zfARNT2b. L'incapacité des agonistes des AhR à réguler l'expression des gènes de l'aromatase illustre le fait que les complexes zfAhR2/zfARNT2b ne se lient pas aux séquences DRE (Dioxine Response Element) comme montré par des expériences en gel retard. Cependant, en présence des hétérodimères zfAhR2/zfARNT2b et du zfER $\alpha$ , la TCDD induit l'expression du *zfcyp19b* dans les cellules gliales. Cette induction est dépendante de la présence du récepteur des œstrogènes  $\alpha$  et des complexes zfAhR2/zfARNT2b mais indépendante de la présence des sites DRE de la région promotrice puisque la délétion des DRE ne modifie pas l'activité transcriptionnelle du gène *zfcyp19b-luc* comparativement au gène *cyp19b-luc* délété en DRE. Ce résultat contraste donc avec les données obtenues chez les larves de poisson zèbre dans lesquelles aucune induction du gène ou de la protéine aromatase B n'a été mise en évidence par la TCDD (figure 1C). Cependant, l'induction observée *in vitro* dans les cellules gliales par la TCDD est faible comparativement à l'E2. La différence entre les modèles pourrait donc s'expliquer par une moindre sensibilité du modèle *in vivo* comparativement au modèle *in vitro* ou bien par la présence d'œstrogènes endogènes circulant chez la larve qui empêcherait le cross-talk positif observé dans la lignée gliale radiaire. Quelle qu'en soit la raison, cette remarque illustre la nécessité de replacer les mécanismes dans le contexte physiologique de l'organisme.

Lorsque les poissons sont co-exposés à des œstrogènes (E2 ou EE2) et à des agonistes du récepteur Ah, des inhibitions de l'expression du gène *cyp19b* et de la protéine AroB sont observées en fonction de la dose en agoniste AhR sont observées (figures 1D et 2). Dans la lignée U251-MG, les co-expositions E2-TCDD ou E2-B[a]P confirment l'effet négatif des composés dioxine-like sur l'activité transcriptionnelle du gène *zfcyp19b* induite par les œstrogènes. L'anti-œstrogénicité des molécules implique des AhR fonctionnels puisqu'en présence d' $\alpha$ -naphthoflavone, un antagoniste partiel du AhR, l'effet inhibiteur de la dioxine est partiellement (*in vivo*) ou totalement (*in vitro*) bloqué. Par ailleurs, les expérimentations *in*

*in vitro* mettent en évidence que l'anti-œstrogénicité des AhR est indépendante de la présence de sites DRE mais nécessite des sites ERE dans la région promotrice du gène *cyp19b*.

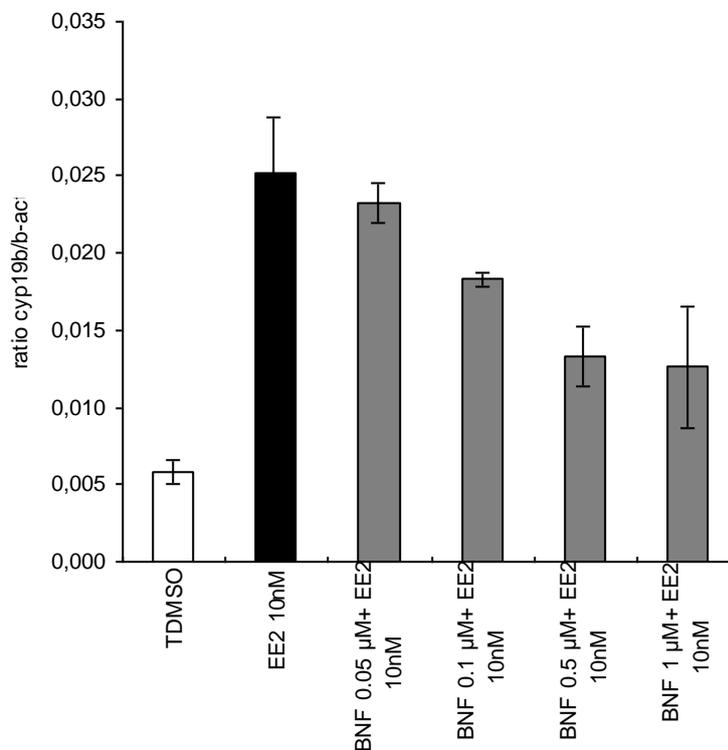


Figure 2. Effet d'une co-exposition bNF-EE2 sur l'expression du gène de l'aromatase cérébrale chez la larve de poisson zèbre. La bNF inhibe de manière dose-dépendante l'expression de l'aromatase B induite par l'EE2 démontrant le caractère anti-œstrogénique de cette molécule chez le poisson.

Les effets des ligands ER et AhR sur l'expression du gène de l'aromatase cérébrale observés chez les larves de poisson zèbre ont pu être reproduits lorsque les poissons sont exposés entre 1 et 5 jours post-fertilisation, c'est-à-dire au cours de l'embryogenèse (figure 3).

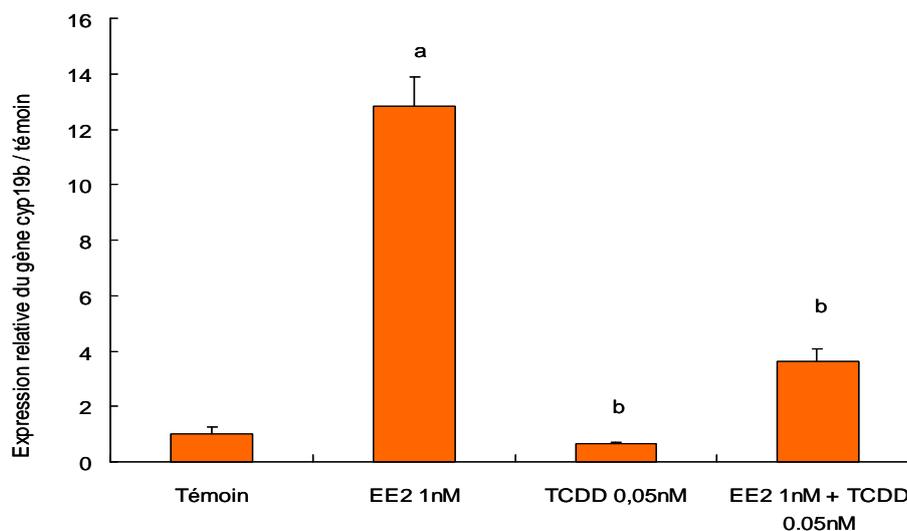


Figure 3. Effets de l'EE2 1nM et TCDD 0,05nM sur l'expression relative de *cyp19b* au cours de l'embryogenèse de poisson zèbre. Exposition entre 1 et 5 jours post-fertilisation (n= 3 exp. indépendantes).

Pour aller plus loin, nous avons recherché à déterminer si les œstrogènes étaient en mesure de modifier l'expression d'un gène AhR-dépendant, le gène du cytochrome P4501A, i.e. si le cross-talk entre les récepteurs ER et AhR était uni- ou bidirectionnel.

## **1.2. Effet des œstrogènes sur l'induction AhR-dépendante du cytochrome P4501A chez le poisson zèbre.**

Afin de déterminer dans quelle mesure les œstrogènes sont capables d'interférer avec la voie de signalisation AhR, l'activité enzymatique du cytochrome hépatique P4501A a été mesurée chez des poissons zèbre exposés à la TCDD seule ou en mélange avec des œstrogènes.

Des embryons de poissons zèbres âgés de 1 jour post-fertilisation ont été exposés durant 96 heures à des concentrations croissantes de dioxine, avec ou sans des œstrogènes (E2) et en présence ou en absence d'antagonistes des récepteurs ERs (ICI 182,780) ou AhR ( $\alpha$ -naphthoflavone). Après exposition, l'activité EROD a été quantifiée *in vivo* chez des embryons de 5 jours post-fertilisation en les incubant vivant dans des microplaques de 48 puits. Chaque puits de la microplaque contient 1 ml de milieu d'élevage supplémenté en 7-ERF (5  $\mu$ M). La cinétique d'apparition de la résorufine (qui est excrétée dans le milieu après biotransformation de la 7-ERF par les larves), a été mesurée à l'aide d'un spectrofluorimètre (longueur d'onde d'excitation de 530 nm et une longueur d'émission de 590 nm) durant 12 heures. La cinétique de fluorescence permet de calculer la pente maximale ( $V_{max}$ , exprimée en RFU/min/larves). Les résultats de la figure 4 montrent que les embryons de poissons sont extrêmement sensibles aux traitements à la dioxine. L'EC50 d'induction de l'activité EROD par la dioxine est de 0.018 nM (IC<sub>95</sub> [0,015 ; 0,021])<sup>2</sup>. L'ajout d' $\alpha$ -naphthoflavone dans le milieu inhibe les inductions TCDD-dépendantes de l'activité EROD témoignant que des AhR fonctionnelles sont nécessaires (résultats non montrés). Lorsque les embryons sont co-exposés à la TCDD et à l'E2 10nM, on constate que l'EC50 mesurée est identique à celle de la dioxine seule.

---

<sup>2</sup> Les courbes dose-réponse ont été modélisées selon la macro Excel™ RegTox 7.5 (<http://eric.vindimian.9online.fr/>) qui utilise le modèle de Hill pour calculer les EC50.

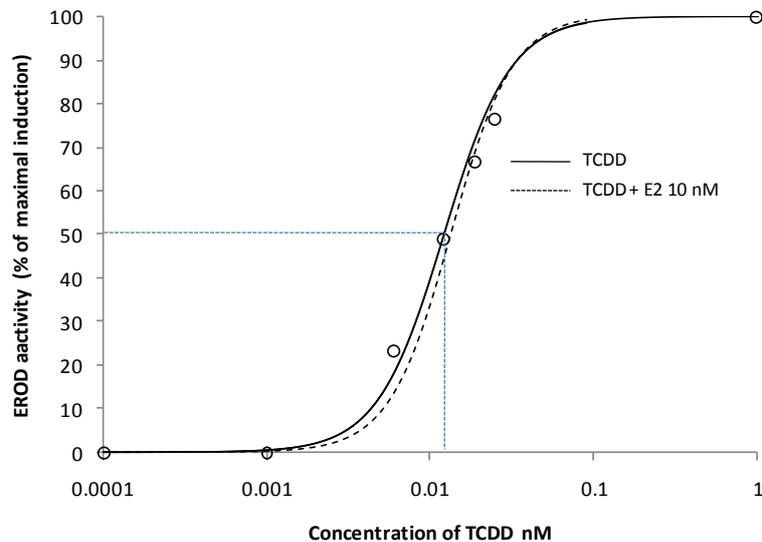


Figure 4. Mesure de l'activité EROD *in vivo* chez des embryons de poissons zèbres exposés entre 1 et 5 jours post-fertilisation à des concentrations croissantes de TCDD (trait plein) ou co-exposés avec de l'E2 10 nM (pointillé).

Des expériences complémentaires de co-traitements d'embryons à la TCDD (0.025nM) ± EE2 (1nM) ± ICI (1µM) ont permis de confirmer l'absence d'interaction des oestrogènes sur l'expression du cytochrome P4501A (résultats non montrés).

Nos données expérimentales indiquent donc que les oestrogènes n'exercent aucun effet inhibiteur sur l'expression du P4501A au cours de l'embryogenèse du poisson zèbre. Il est important de rappeler que durant cette phase de développement, l'interférence négative de la voie AhR activée par la dioxine sur la signalisation oestrogénique a été montrée (cf figure 3).

L'absence d'interaction de la voie ER vers la voie AhR observée chez les embryons de poisson zèbre s'accorde avec des études menées *in vitro* sur cultures primaires d'hépatocytes de saumon (Bemanian et al., 2004) et *in vivo* chez le saumon (Arukwe et al., 2001) et chez la gambusie (Aubry et al., 2005). L'ensemble de ces résultats est donc en faveur d'un cross-talk unidirectionnel chez le poisson. Cependant, des résultats contradictoires ont été obtenus dans des lignées humaines de cancer du sein (MELN, Balaguer et al., 1999) ou des lignées hépatiques de poissons (PELN, Cosnefroy et al., sous presse). Ainsi dans les lignées MELN et PELN, l'E2 inhibe l'activité EROD induite par la TCDD. Dans la lignée PELN, cet effet est levé en présence d'ICI 182,780 montrant une implication directe du récepteur ER dans la modulation de la voie AhR (Ait-Aissa et al., 2008). De même, le co-traitement de ces cellules avec de la TCDD et de l'ICI, conduit à une induction significativement supérieure comparativement aux cellules traitées à la dioxine seule (Aissa et al., 2008). De plus, nous avons récemment observé que l'exposition de chevaines à 50 ng/L d'EE2 conduit à une inhibition de l'activité EROD chez les mâles et les femelles comparativement aux lots témoins (Hinfrey et al., soumis). Des observations similaires ont été faites chez des saumons juvéniles traités à de l'E2 ou du nonylphenol (Oppen-Berntsen et al., 1999). Par conséquent, l'interférence entre la voie ER et AhR semble spécifique au type cellulaire employée mais

aussi aux paramètres expérimentaux utilisés pour étudier ces interactions, e.g. temps et doses d'exposition, stade de développement. Des mesures supplémentaires d'activité EROD sur larves de poissons zèbres auraient permis de tester l'hypothèse d'un cross-talk unidirectionnel à d'autres stades de développement du poisson.

### Conclusions intermédiaires

- Nos données permettent de confirmer la forte induction du gène de l'aromatase B par les œstrogènes dans les cellules gliales radiales *in vivo* et l'intérêt de ce gène comme marqueur d'exposition aux xéno-œstrogènes au cours du développement précoce du poisson (stade embryonnaire et larvaire). De façon intéressante, la régulation gliale-spécifique du gène *cyp19b* par les œstrogènes *in vivo* est reproduite *in vitro* dans un contexte cellulaire neuro-gliale. Cette induction ER-dépendante du gène de l'aromatase B requiert des ERE fonctionnelles dans la région promotrice du gène aromatase B (Menuet et al., 2005). Pour analyser plus avant les mécanismes moléculaires de cette régulation œstrogéno-dépendante, des expérimentations de délétions/mutations de la région promotrice du gène aromatase B ont été réalisées dans les cellules U251-MG. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication présentée en Annexe 2 du rapport<sup>3</sup>. Ces expérimentations montrent que les ERE sont nécessaires mais ne sont pas suffisants pour induire une réponse œstrogénique maximale en présence d'oestradiol. Une région spécifique, nommée GxRE (Glial x Responsive Element) est aussi impliquée dans la réponse œstrogénique. En effet, la délétion ou la mutation de l'élément de réponse GxRE se traduit par une diminution de l'induction E2-dépendante du gène *cyp19b*. De plus, cette séquence GxRE est capable de fixer des facteurs qui sont exclusivement présents dans le contexte glial. En agissant en synergie avec les séquences ERE et ½ ERE, le GxRE participe à la très forte inductibilité du gène *cyp19b* par les œstrogènes spécifiquement dans le contexte glial.
- Nos données démontrent l'absence de fonctionnalité des sites putatifs DRE des régions promotrices des gènes de l'aromatase A et B de poisson zèbre. Il est donc peu probable que des composés de type dioxine puissent influencer l'expression des aromatasés par la voie classique passant par le complexe récepteur Ah et l'élément de réponse aux dioxines. Elles démontrent aussi la faible sensibilité des gènes *cyp19* aux dioxines seules *in vivo* dans les conditions expérimentales testées.
- Nous démontrons pour la première fois que les composés à activité dioxine-like exercent des effets anti-œstrogéniques sur l'expression d'un gène œstrogéno-régulé, l'aromatase B, dans le contexte glial radiale *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'oestradiol dans ce processus (Menuet *et al.*, 2005, Pellegrini *et al.*, 2005), les effets observés soulèvent la question des effets des molécules agonistes des récepteurs Ah et ER 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 œstrogéno-mimétiques et à activité dioxine.
- Enfin à l'aide d'un bio-essai sur embryon de poisson zèbre, nous avons pu quantifier l'activité enzymatique du P4501A et déterminer l'absence d'interférence de la voie ER activée sur la voie AhR démontrant que le cross-talk ER/AhR est unidirectionnel dans nos conditions expérimentales.

---

<sup>3</sup> Le Page Y, Menuet A, Kah O., Pakdel F. (2008) Characterization of a cis-acting element involved in cell-specific expression of the zebrafish brain aromatase gene. *Molecular Reproduction and Development* 75:1549-1557

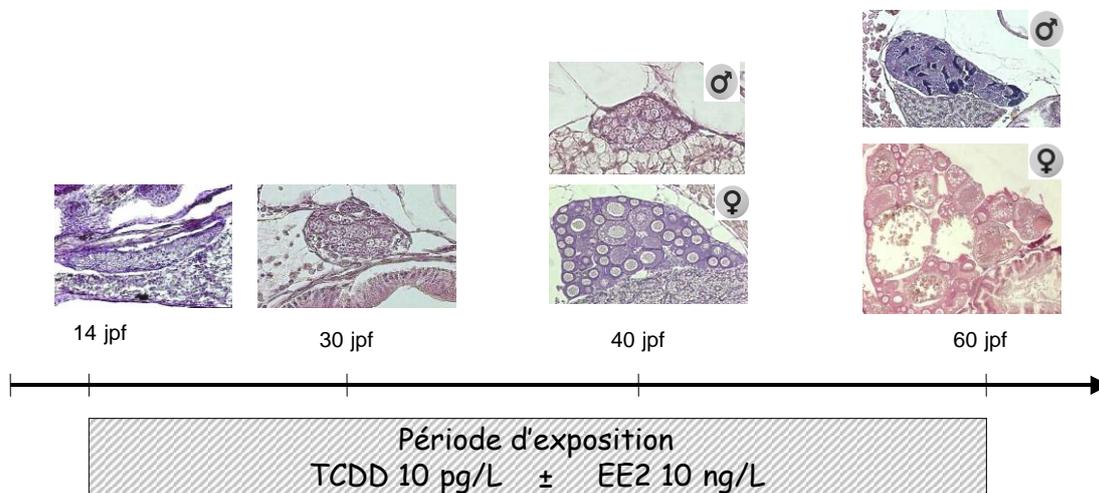
## 2. ETUDE DES CONSEQUENCES FONCTIONNELLES SUR LA REPRODUCTION CHEZ LE POISSON.

Il s'agissait ici de s'interroger sur les conséquences fonctionnelles d'une interaction entre des agonistes du récepteur Ah et des processus physiologiques qui sont sous contrôle hormonale et indispensables pour la reproduction, i.e. la différenciation sexuelle et la vitellogénèse. Ces questions ont été traitées à l'aide de deux modèles biologiques, le poisson zèbre (différenciation sexuelle) et la gambusie (vitellogénèse).

### 2.1. Etude des conséquences d'une exposition à une faible dose de TCDD, seule ou en mélange avec un œstrogène de synthèse, l'EE2, sur l'expression de gènes ER-dépendants et sur la différenciation sexuelle chez le poisson zèbre (*Danio rerio*).

Nous avons montré que la dioxine était capable d'inhiber l'induction E2-dépendante de l'aromatase cérébrale (Cheshenko et al., 2007, voir paragraphe 1.1). Ces données ont été obtenues à l'aide d'expositions court termes (72-96 heures) et des doses relativement importantes. La question des interactions et des effets de faibles doses en ligands ER et AhR sur la reproduction des poissons restaient donc posée. Afin d'adresser cette problématique, nous avons recherché les effets de faibles concentrations en EE2 et en dioxine seule ou en combinaison, chez le poisson zèbre.

Le schéma expérimental employé est présenté dans la figure 5. La phase d'exposition débute avant le début de la différenciation histologique des gonades qui a lieu entre 20 et 30 jours post-fertilisation. Elle comporte aussi la phase durant laquelle les gonades se développent et entrent en ovogenèse et spermatogenèse (60 jours post-fertilisation) (Brion et al., 2004, Hinfray, données non publiées).



$N_{\text{initial}} = 125$  larves / traitement  
réparties en 4 aquariums

Figure 5. Protocole d'exposition des poissons zèbres à un ligand agoniste AhR, la TCDD, seul ou en mélange avec l'ethynyl-oestradiol. Des analyses histologiques chez des poissons zèbres issus de notre élevage ont été réalisées afin de caractériser la période d'exposition des poissons (Hinfray, non publié).

Pour l'EE2, les concentrations dans les effluents sont bien renseignées et il a été démontré qu'elles sont efficaces pour féminiser différentes espèces de poissons, y compris le poisson zèbre (Nash et al., 2005, Fenske et al., 2005, Schäfers et al., 2007). Une concentration de 10 ng/L a donc été retenue. Pour la dioxine, les informations relatives à ces effets sur le développement gonadique des poissons sont rares. Néanmoins chez *Gobiocypris rarus*, Wu et al., (2001) ont montré une altération de la différenciation sexuelle pour une concentration de 10 pg/L. C'est cette concentration qui a été retenue dans le cadre de cette expérience. Idéalement, différentes concentrations et combinaisons en EE2 et TCDD auraient dû être testées. Néanmoins, nous avons privilégié de ne tester qu'une seule concentration de TCDD et EE2, seule et en mélange, au profit d'un nombre de réplication plus important (n= 4 réplicats / condition).

A la fin de la période d'exposition, les effets de la TCDD et de l'EE2 sur la signalisation oestrogénique ont été évalués en analysant l'expression de gènes ER-régulés : les trois isoformes des récepteurs ERs et le gène *cyp19b* dans le cerveau et la vitellogénine hépatique. Les mesures d'expressions des gènes ER $\alpha$ ,  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 et *cyp19b* ont été réalisées par RT-PCR selon des protocoles établies (Menuet et al., 2002, 2005). La vitellogénine a été quantifiée à l'aide d'une méthode ELISA compétitive (Brion et al., 2002). Afin de déterminer l'impact fonctionnel de ces traitements sur la différenciation gonadique, des coupes histologiques des gonades ont été réalisées chez des poissons âgées de 60 jours. Au cours de l'expérience, la mortalité cumulée a été inférieure à 20% quelle que soit la condition.

### 2.1.1. Effet sur l'expression des gènes ER-dépendants dans le cerveau

Les résultats obtenus montrent que le traitement des poissons à une concentration faible d'EE2 se traduit par une induction du gène de l'aromatase cérébrale d'un facteur 4 comparativement au groupe contrôle (figure 6).

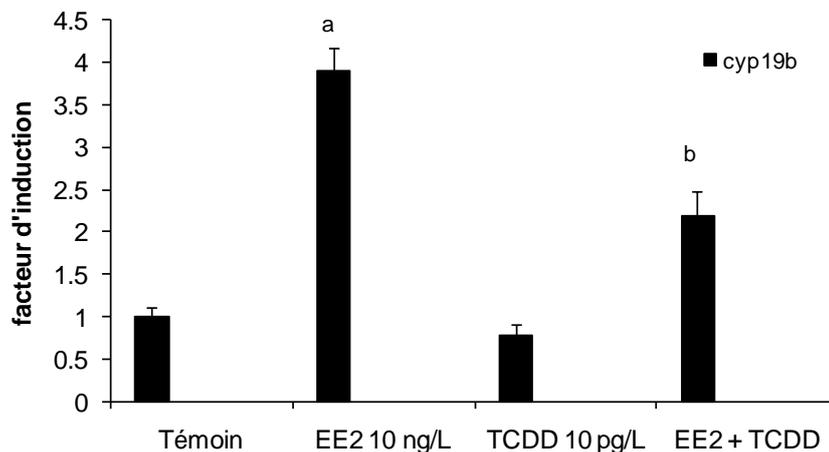


Figure 6 Effets de l'exposition de *Danio rerio* de 14 à 60 dpf à l'EE2 (10 ng/L) et à la TCDD (10 pg/L), seul ou mélange, sur l'expression relative de gène *cyp19b* dans le cerveau (n=16, moyenne  $\pm$  SEM).

Ce résultat s'accorde avec la régulation oestrogénique connue du gène de l'aromatase cérébrale chez le poisson zèbre (Menuet et al., 2005, Cheshenko et al., 2007) et confirme des résultats récents obtenus chez le gardon exposé durant la phase de différenciation sexuelle à une concentration similaire d'EE2 (Lange et al., 2008). Ces données renforcent l'idée de la sensibilité de ce gène au cours du développement des poissons exposés à de faibles concentrations d'EE2.

Lorsque les poissons étaient co-exposés à la TCDD et l'EE2, une inhibition de l'induction EE2-dépendante de l'aromatase cérébrale était observée (figure 6). Nous démontrons ainsi qu'une faible concentration de TCDD est capable d'interférer négativement avec la signalisation oestrogénique en bloquant partiellement l'action de l'EE2 et confirmons l'action anti-oestrogénique de la dioxine sur l'expression d'un gène oestrogéno-régulé dans le système nerveux central au cours du développement des poissons (Cheshenko et al., 2007).

De plus, nous montrons que les traitements à l'EE2 et la TCDD+EE2 affectent négativement l'expression du gène ER $\alpha$  mais pas des gènes ER $\beta$ 1 et ER $\beta$ 2 (figure 7). La dioxine seule entraîne une diminution de l'expression du ER $\alpha$ . Cependant, cette différence n'est pas significative.

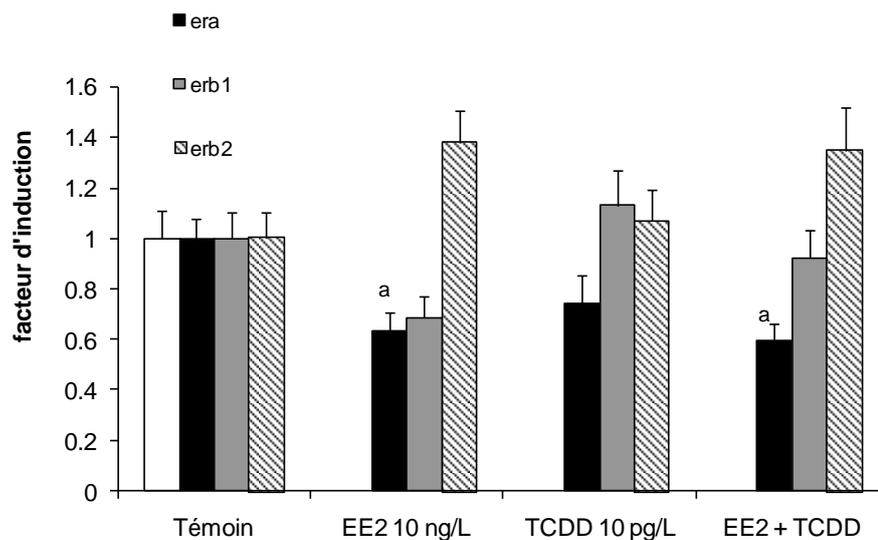


Figure 7. Exposition de *Danio rerio* de 14 à 60 dpf à EE2 (10 ng/L) et TCDD (10 pg/L). Effets sur l'expression relative des 3 isoformes des récepteurs ER dans le cerveau. Résultats donnés sous formes de facteurs d'induction par rapport aux individus témoins (moyenne  $\pm$  SEM, n=16). a= significativement différent du témoin;  $\alpha < 0,05$

Chez le poisson zèbre et le poisson rouge, il a été démontré que les 3 isoformes des ERs sont régulés différemment par l'oestradiol et que ces régulations sont tissus-spécifiques (Menuet et al., 2002, Marlatt et al., 2008). Au niveau hépatique, une boucle d'auto-régulation positive du récepteurs ER $\alpha$  par l'oestradiol a été mis en évidence (Pakdel et al., 1997, Menuet et al., 2005). De même, dans le cerveau du poisson rouge (*C. auratus*), l'oestradiol régule positivement l'expression du ER $\alpha$  au niveau de l'hypothalamus (Marlatt et al., 2008). Plus récemment, l'analyse de l'expression des gènes ERs dans les cerveaux de gardon exposés à de faibles concentrations d'EE2 montrent que le gène ER $\alpha$  est sensible aux traitements oestrogéniques avec des effets qui diffèrent selon le stade de développement du poisson. Très tôt au cours du développement, l'EE2 induit l'expression de ER $\alpha$  suivit par un effet répresseur de l'EE2 sur ce gène après la période de différenciation sexuelle (Lang et al., 2008). Dans le cas de notre étude, l'expression du ER $\alpha$  a été mesurée après la période de différenciation histologique des gonades et est réprimée par l'EE2 ce qui est conforme aux observations de Lange et al. (2008). Chez les souris ER-KO, il a été montré que les récepteurs ERs sont impliqués dans la régulation de la LH (Couse et al., 1999). Chez le poisson, le rôle spécifique de chacune des isoformes du récepteur ER n'est pas déterminée mais les données montrent que les ERs dans le cerveau sont des cibles moléculaires des PE. Les perturbations

induites par l'EE2 sur l'expression des ERs dans le système nerveux central des poissons ont été associées à des changements de comportements chez des épinoches sexuellement matures (Brian et al., 1996).

L'ensemble de ces résultats indiquent donc une altération de la voie de signalisation oestrogénique par des faibles concentrations d'EE2 et de TCDD chez le poisson exposé au cours de son développement précoce.

### 2.1.2. Effet sur l'expression de la vitellogénine (Vtg).

Parallèlement, les concentrations en vitellogénine circulante ont été mesurées. Les résultats montrent des inductions massives de la Vtg chez les poissons exposés à l'EE2 10 ng/L (figure 8). Elles s'accompagnent d'hypertrophies dans les hépatocytes et par l'accumulation de matériel éosinophile dans les reins et la cavité générale. Ce matériel éosinophile correspond à une accumulation anormale de Vtg comme montré par des marquages immuno-histochimiques à l'aide de l'anticorps anti-Vtg de poisson zèbre (résultats non montrés). Aucune induction significative de la Vtg n'a été mesurée chez les poissons exposés à la dioxine seule. Ce résultat confirme qu'à cette concentration, la TCDD seule n'est pas capable d'induire l'expression de gènes ER-dépendants, que ce soit dans le foie ou le cerveau. En outre, la TCDD n'est pas capable d'inhiber l'induction de la Vtg médiée par l'EE2. Au contraire, la co-exposition TCDD-EE2 potentialise l'effet inducteur de l'EE2 seule sur la réponse vitellogénique.

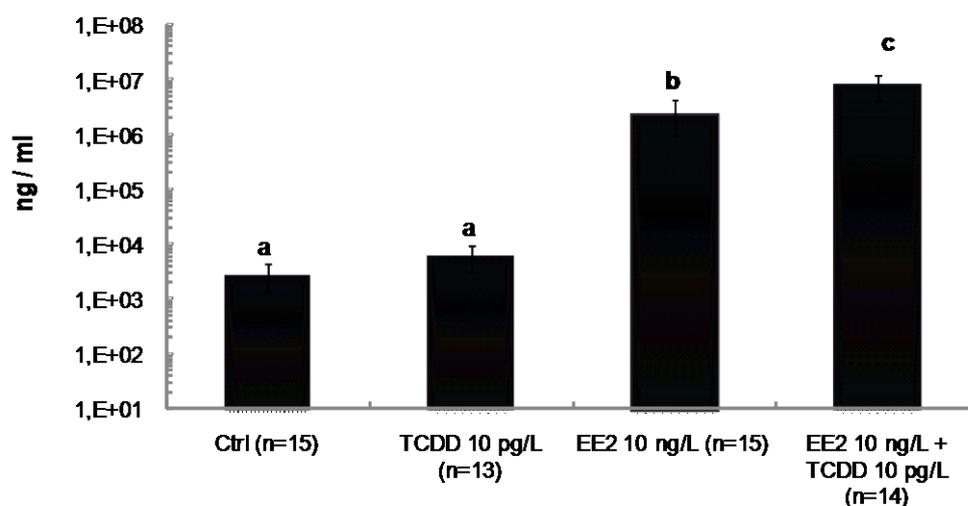


Figure 8. Effet d'une exposition de *Danio rerio* de 14 à 60 dpf à EE2 (10 ng/L) et TCDD (10 pg/L) sur les concentrations en vitellogénine circulantes exprimées en ng/ml d'homogénats de corps entiers (moyenne ± intervalle de confiance à 95%).

En cultures primaires d'hépatocytes de poissons, les effets anti-œstrogéniques des molécules agonistes du AhR sur la synthèse de la vitellogénine ont été démontrés. L'activité anti-vitellogénique des dioxines et des PCBs est liée à leur potentiel inducteur du cytochrome P4501A (Safe et Krishnan, 1995, Anderson et al., 1996) et implique le récepteur Ah (Navas et Segner, 2000, Bemanian et al., 2004). Au niveau hépatique, le récepteur Ah activé est capable d'inhiber l'initiation de la transcription du gène ER $\alpha$ , en interférant avec la boucle d'auto-régulation transcriptionnelle de ce récepteur, et du gène de la vitellogénine (Bemanian et al.,

2004). Dans une lignée hépatique de poisson (PLHC1) stablement co-transfectée avec le gène de la luciférase sous contrôle des oestrogènes et le récepteur ER $\alpha$  de truite (lignée PELN, rt-ER ERE-luc cell, Cosnefroy et al., sous presse), la TCDD inhibe partiellement l'expression basale et induite de la luciférase par l'E2 (Ait-Aissa et al., 2008). Des effets anti-oestrogéniques similaires ont été observés dans la lignée PELN avec un ligand atypique du AhR, le clotrimazole (Ait-Aissa et al., 2009). Cependant, des résultats *in vitro* en culture primaires d'hépatocytes de saumon montrent que certaines molécules AhR agonistes comme le PCB 77 et PCB 126 sont capables d'induire l'expression du ER $\alpha$  et de gènes ER-dépendants en l'absence de composés oestrogéno-mimétiques (Mortensen et Arukwe, 2007, Mortensen et Arukwe 2008). La co-exposition d'hépatocytes de saumon avec du PCB77 et un composé oestrogénique, le nonylphenol, produit une réponse anti-oestrogénique (Mortensen et Arukwe, 2007). Dans l'expérience que nous avons menée, il est clair que la dioxine n'induit pas d'effet anti-oestrogénique au niveau hépatique ce qui contraste avec les données obtenues dans différents modèles cellulaires de poissons mais s'accordent avec les données obtenues *in vivo* chez le saumon juvénile ou une potentialisation de la réponse oestrogénique au niveau hépatique a été observée avec le PCB77 et la nonylphenol (Arukwe et al., 2001). Les mécanismes sous-jacents responsables de cette potentialisation ne sont pas élucidés. Elle pourrait être liée aux ratios des concentrations en substances AhR et ER agonistes utilisés dans les schémas expérimentaux et/ou au ratio en récepteurs Ah/ER au sein du tissu cible étudié. Quelle que soit les mécanismes, la comparaison des réponses des gènes ER-dépendants dans le cerveau et le foie montre des différences nettes aux co-traitements par la TCDD et l'EE2, avec une forte sensibilité du gène aromatase B au effet anti-oestrogénique de la dioxine.

### 2.1.2. Effet sur la différenciation sexuelle.

L'analyse histologique des gonades a permis de déterminer le sexe histologique des poissons. Dans le groupe contrôle, 50% et 26% des poissons ont développé des ovaires et des testicules respectivement, alors que le reste des individus étaient indifférenciés (figure 9).

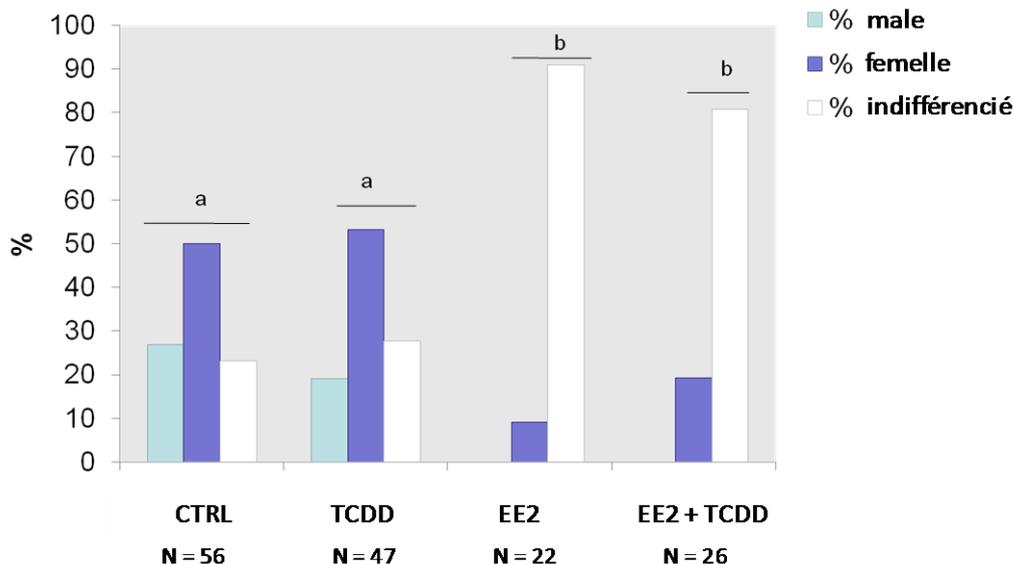


Figure 9. Effet d'une exposition de *Danio rerio* de 14 à 60 dpf à de l'EE2 (10 ng/L) et de la TCDD (10 pg/L) sur le développement gonadique.

Une proportion similaire d'individus mâles, femelles et indifférenciés a été observée dans les

lots traités à la dioxine. Par contre, l'exposition à l'EE2 seule a conduit à un effet profond sur le développement gonadique, la majorité des individus présentant des gonades indifférenciées. Cet arrêt ou retard dans le développement gonadique s'accordent avec les données observées chez le poisson zèbre exposés à des concentrations similaires d'EE2 durant cette phase de développement (Fenske et al., 2005, Schäfers et al., 2007, Schulz et al., 2007). Cet effet sur le développement gonadique persiste chez les poissons co-exposés à la TCDD, démontrant que la dioxine ne peut moduler l'effet négatif de l'EE2 sur les gonades.

### Expérience complémentaire.

Une seconde expérience a été menée en 2008 et visait à déterminer si l'exposition précoce de poissons zèbres ente 1 et 30 jours post-fertilisation à de l'EE2 seul ou en mélange avec de la TCDD se traduisait par un effet long terme sur le sexe ratio des populations et des impacts sur la capacité de reproduction des individus. Dans cette expérience, le ratio EE2/TCDD a été modifié par rapport à la première expérience en réduisant la concentration nominale d'EE2 (5 ng/L) et en augmentant la concentration en dioxine (50 pg/L). A la fin de la période d'exposition, des poissons ont été prélevés pour analyser l'expression du gène de l'aromatase cérébrale. Le reste des poissons a été mis en eau clair. A partir de 80 jours post fertilisation, les poissons ont été mis en condition de reproduction. A partir de cet âge, les pondoirs ont été relevés quotidiennement jusqu'à l'âge de 150 jours post-fertilisation.

Les résultats d'expression de l'aromatase B chez les larves de 30 dpf, confirment ceux obtenus précédemment à savoir une induction de l'aromatase par l'EE2, une absence d'effet de la TCDD seule et une inhibition de l'induction médiée par l'EE2 lors de la co-exposition à la TCDD.

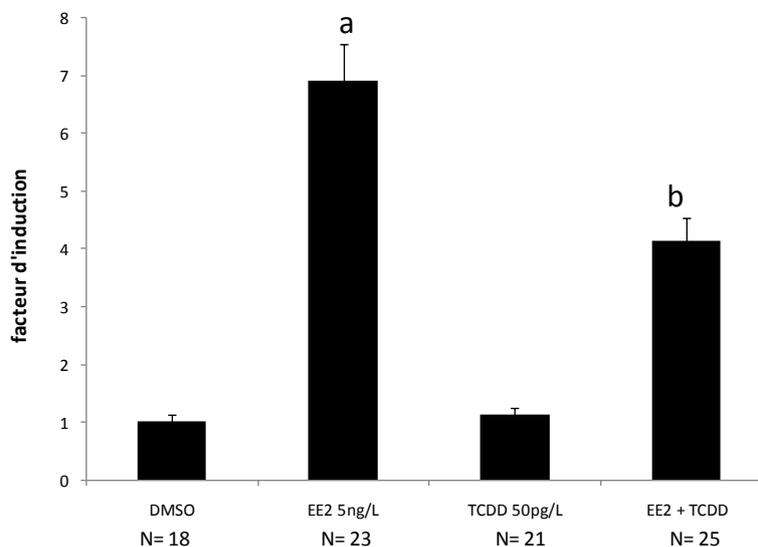


Figure 10. Effet d'une exposition de *Danio rerio* de 1 à 30 dpf à de l'EE2 (5 ng/L) et de la TCDD (50 pg/L) sur l'expression du gène *cyp19b* dans les têtes de poisson zèbre. moyenne ± SEM (pour chaque groupe les effectifs N sont indiqués).

Concernant les effets sur la reproduction, les données obtenues n'ont pas permis de mettre en évidence un effet significatif des différents traitements sur l'âge de première ponte, sur le sexe-ratio (figure 11A) et les capacités de reproduction des individus, (figure 11B).

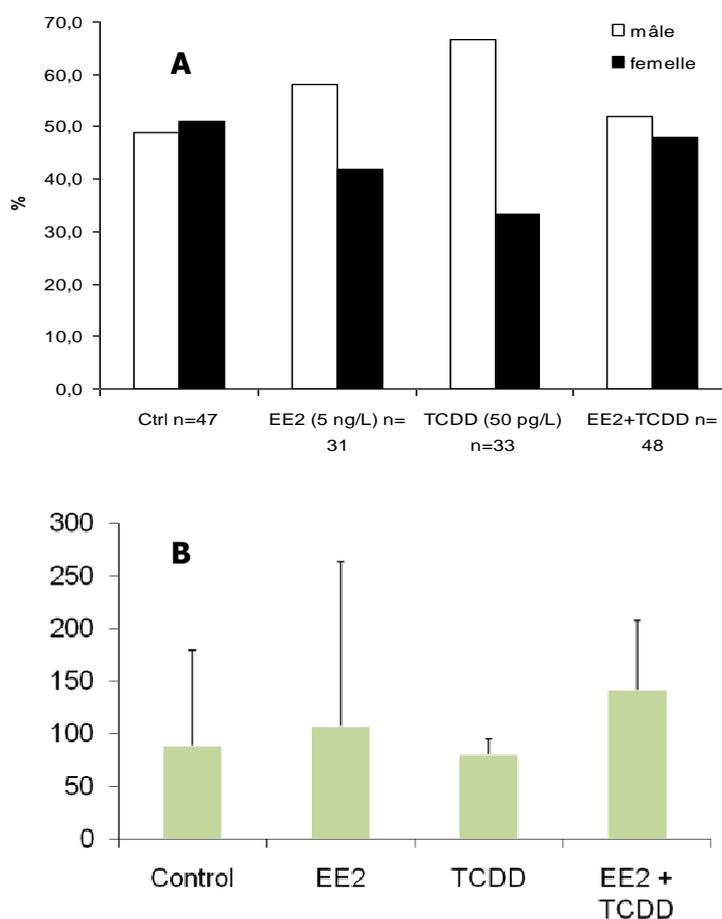


Figure 11. Effet d'une exposition de *Danio rerio* de 1 à 30 apr à de l'EE2 (5ng/L) et de la TCDD (50 pg/L) sur le sexe-ratio (A) et du nombre moyens d'œufs pondus par femelles (B). Aucune différence n'est mis en évidence pour le sexe-ratio (test du Chi<sup>2</sup>) ou sur la fécondité des femelles (test de kruskall et Wallis)

De même, les taux de mortalité à 24 heures et les taux d'éclosion à 6 jours de la génération F1 n'ont pas révélés de différence significative entre les traitements. Si ces données vont dans le sens d'une absence d'effet à long terme des composés ER et AhR, il ne faut cependant pas sous-estimés les difficultés expérimentales rencontrées : mort de certains individus sans que leur sexe n'ait pu être identifié macroscopiquement ou histologiquement, « fuite » de certains poissons des dispositifs expérimentaux durant la phase de reproduction, forte variabilité entre réplicat dans le nombre d'événement de ponte. Récemment, Heiden et al (2009) ont mis en évidence des effets longs termes sur la reproduction d'individus adultes exposés à la TCDD durant leur développement embryonnaire et la phase de différenciation histologique. Néanmoins, ces données sont difficilement comparables avec nos résultats dans la mesure ou les paramètres expérimentaux sont très différent des notes : les doses retenues dans leurs expériences sont très élevées (25000 et 50000 pg/L de TCDD) et les poissons sont exposées de façon discontinue à la TCDD.

## Conclusions intermédiaires

Les résultats de cette étude montrent que l'exposition de poisson zèbre à de faibles concentrations en EE2, seules ou associées à la TCDD, durant les stades précoces de développement altèrent l'expression de gènes impliqués dans la signalisation oestrogénique dans le cerveau, i.e. l'ER $\alpha$  et l'aromatase cérébrale. Notamment, nous montrons l'effet oestrogénique de l'EE2 par sa capacité à induire l'aromatase cérébrale à des concentrations environnementales et la capacité de faibles doses de TCDD à inhiber ces inductions. De manière intéressante, les réponses biochimiques et histologiques sont de natures différentes puisque la dioxine potentialise l'effet de l'EE2 sur la vitellogénine et n'est pas capable de moduler l'effet de l'EE2 sur le développement gonadique.

La forte sensibilité du ER $\alpha$  et du cyp19b chez le poisson zèbre exposé à de faibles concentrations d'EE2 et de TCDD soulève le besoin d'évaluer plus précisément les effets des œstrogènes et des dioxines sur les fonctions neuro-endocrines impliquées dans la reproduction et renforce l'idée de la vulnérabilité des stades précoces de développement des poissons aux perturbateurs endocriniens.

## 2.2. Etude des conséquences d'une exposition à un ligand du récepteur Ah, la bêta-naphtoflavone 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 était de déterminer si l'exposition à ce type de micropolluant inhibait la vitellogenèse de la gambusie femelle, et si ceci se répercute sur le développement de la descendance.

Plusieurs expérimentations ont été menées et visaient à définir dans un premier temps les bases expérimentales pour étudier les effets de molécules agonistes du récepteur Ah sur la vitellogenèse de la gambusie femelle et dans un second temps d'apporter des informations sur l'effet de la bêta-naphtoflavone.

### 2.2.1. Dynamique de reprise de l'ovogenèse et influence de la ration alimentaire sur la vitellogenèse.

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. Cette possibilité de décider de l'arrêt et du démarrage du cycle sexuel de la gambusie femelle offre des atouts expérimentaux. En particulier, des groupes d'individus dont la vitellogenèse s'accomplit de façon synchrone peuvent être constitué ce qui permet d'optimiser la puissance statistique des expériences et de définir précisément la fenêtre d'exposition au toxique. Les expériences qui ont été menées visaient à définir (i) les conditions de température et de photopériode nécessaires à la reprise de l'ovogenèse, (ii) d'étudier dans le temps la dynamique de

l'ovogenèse chez des groupes d'individus dont le cycle sexuel était bloqué et (iii) de déterminer si la ration alimentaire ne constituait pas un facteur limitant dans l'accomplissant de la vitellogenèse.

En soumettant des femelles, jusqu'alors maintenus expérimentalement au laboratoire dans des conditions de photopériodes hivernales (10h de jour), à une photopériode de 16h de jour, une reprise de la vitellogenèse est observée. La reprise de cycle est aisément observée par l'apparition d'une tâche noire abdominale au niveau de l'orifice uro-génitale (due à la distension du péritoine) dès 9 jours. Cette reprise de cycle se traduit par l'apparition d'ovocytes au stade 2 (stade qui marque le début d'accumulation de vitellus) à partir du 7<sup>ème</sup> jour, alors que les ovaires des femelles bloquées se caractérisent par des ovocytes de stade 1 qui sont typiques du repos du cycle reproducteur. La reprise de la vitellogenèse se traduit aussi par une augmentation significative de l'indice gonado-somatique net<sup>4</sup> (IGS net) 7 et 9 jours après le passage à la photopériode de 16h comparativement (figure 12).

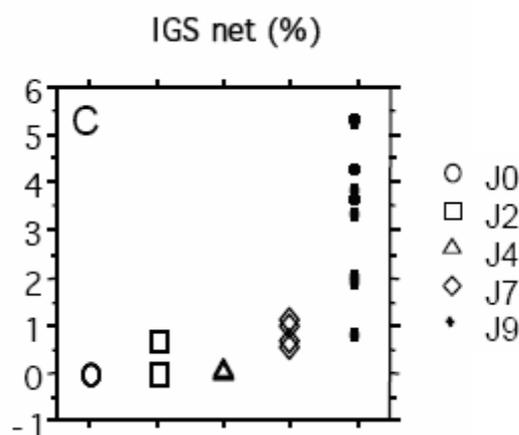


Figure 12. Evolution de l'IGS net mesurés en fonction du temps après passage à une photopériode de 16 heures (J0). A J0, les femelles bloquées se caractérisent par des ovocytes au stade 1 (pré-vitellogenèse).

Bien que significative, cette augmentation est cependant variable d'un individu à l'autre, la reprise du cycle ne se faisant pas de façon absolument synchrone pour l'ensemble des individus. Cette remarque ne remet pas en cause le protocole développé ici mais il s'agira de considérer dans les expérimentations futures cette variabilité inter-individuelle. Conjointement à la variation de la photopériode, l'effet de la température a été pris en compte en étudiant la dynamique de reprise à 16h-25°C et 16h-30°C. Dans les conditions expérimentales testées, des comportements d'agressivité entre femelles ont été notés pour la température la plus élevée. Enfin, différentes rations alimentaires ont été testées (0.5, 1 et 2% de nourriture sèche par masse de poissons humides), celles-ci n'influençant pas la dynamique de reprise de la vitellogenèse.

Sur la base de ces expériences, nous montrons 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). Les informations acquises ont été mises à profit pour étudier dans un second temps, l'effet de la bêta-naphtoflavone sur la vitellogenèse.

<sup>4</sup> 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. Dans l'IGS net, ne sont donc considéré que les ovocytes ayant commencés à accumuler du vitellus au cours de l'expérience.

### 2.2.2. Effet de la bêta-naphtoflavone sur la vitellogenèse.

Afin d'étudier l'influence de la bêta-naphtoflavone sur la vitellogenèse, une première expérience a été réalisée en 2007. Des femelles maintenues en conditions hivernales contrôlées ont été réparties en lots distincts (témoin eau, témoin solvant, et 3 concentrations de bêta-naphtoflavone : 1µg/L, 4µg/L, 16µg/L). Les concentrations en bêta-naphtoflavone se situent dans la même gamme que celles qui avaient été démontrées inhibitrices vis-à-vis de l'induction de la vitellogenèse chez le mâle (Aubry *et al.*, 2005). Les femelles ont été acclimatées en maintenant les conditions de photopériodes hivernales durant 7 jours. Au temps J0, la phase d'exposition des poissons à la b-NF débute en introduisant la substance dans le milieu et dure 14 jours. Au 5<sup>ème</sup> jour de contamination, la photopériode est augmentée à 16h, photopériode qui permet la reprise de la vitellogenèse et du cycle reproducteur (figure 13).

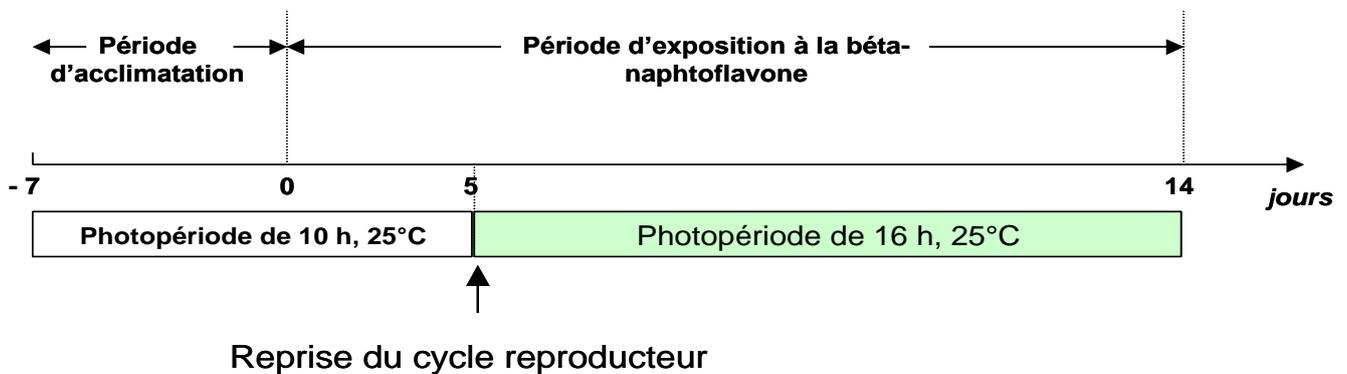


Figure 13 Schéma d'exposition des femelles gambusies pour l'étude des effets d'un ligand du récepteur Ah sur la vitellogenèse. L'exposition dure 14 jours durant lesquelles, les poissons sont soumis à une photopériode de 10h (cycle bloqué) puis à une photopériode de 16h permettant la reprise du cycle.

A l'issue de cette expérience, une diminution significative de l'IGS net et de la fécondité normalisée<sup>5</sup> des femelles a été observée chez les femelles exposées à 1 et 4 µg/L comparativement au lot témoin<sup>6</sup> (figure 14). A la plus forte concentration d'exposition ces deux paramètres ne sont cependant pas différents du groupe témoin ni des groupes 1 et 4 µg/L. Les résultats obtenus suggèrent que la bNF pourrait affecter la vitellogenèse de la gambusie femelle, mais la relation dose-effet apparaît plus complexe qu'une simple relation de proportionnalité.

<sup>5</sup> Fécondité normalisée =  $(\ln(\text{nombre d'ovocytes ou œufs}/\text{taille})) \times 100$

<sup>6</sup> Le lot témoin regroupe les données issues du groupe témoin eau et témoin solvant, aucune différence significative n'ayant été observée pour l'ensemble des paramètres mesurés.

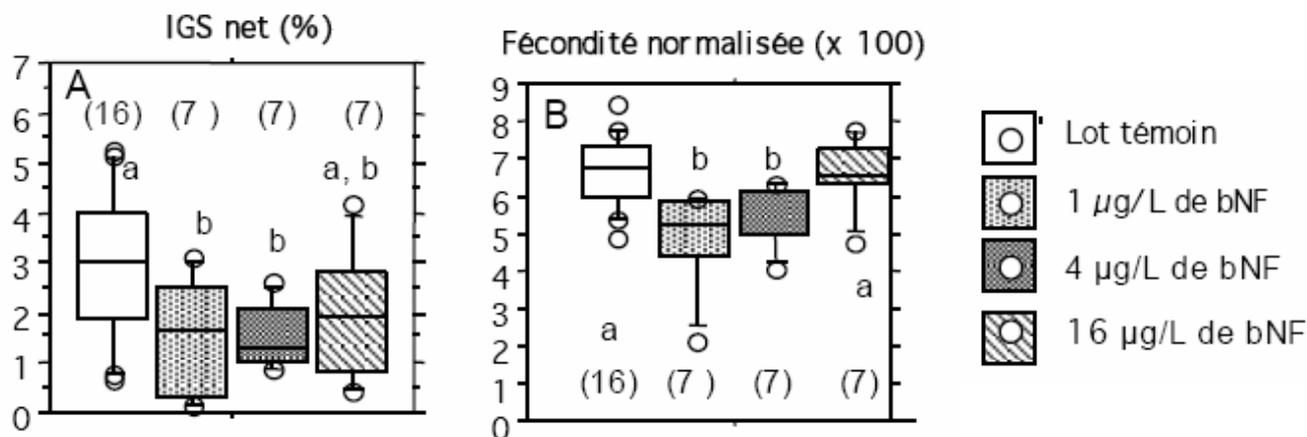


Figure 14. (A) Indice gonado-somatique (IGS) net et (B) fécondité normalisée mesurés dans les lots témoin et traités à la bêta-naphtoflavone.

Ces expériences menées avec la bêta-naphtoflavone semblent indiquer qu'elle a un effet inhibiteur sur la vitellogenèse à de faibles concentrations (1 et 4 µg/L), la masse et le nombre d'ovocytes entrés en vitellogenèse étant diminués par rapport aux témoins. Cependant, la relation dose-effet semble complexe et ne paraît pas se limiter à une simple relation de proportionnalité.

Deux expériences complémentaires ont été réalisées en 2008. afin de reproduire les résultats obtenus dans cette première expérience et qui faisaient apparaître des effets négatifs de la bNF. La seconde a cherché à aborder la question des conséquences possibles pour la descendance d'une exposition à la bNF durant l'ovogenèse.

### 2.2.3 Essai de confirmation des effets négatifs de la bNF.

Cette expérience a été préparée en tenant compte des enseignements de celle précédemment réalisée en 2007. Ainsi, une attention particulière a été portée à la réduction de la variabilité inter-individuelle (inter-femelle) quant à la cinétique de l'ovogenèse. Une hypothèse avait été formulée pour expliquer cette variabilité : l'état ovarien des femelles n'était pas le même lorsque celles-ci avaient été transférées en condition photopériodique hivernale, et cela pouvait influencer la dynamique de reprise ultérieure.

Ainsi, pour préparer les expériences réalisées en 2008, des femelles ont été suivies individuellement, et chacune d'elles a été transférée en condition photopériodique hivernale 4 jours après sa parturition. Un groupe de plusieurs dizaines de femelles ayant suivi ce conditionnement a ainsi été constitué à l'automne 2007. Les conditions matérielles ont été les mêmes que celles décrites pour les expériences réalisées précédemment (voir paragraphe 2.2.2). Les variables biologiques analysées ont été également les mêmes.

Cinq lots de 7 femelles ont été constitués : témoin, témoin solvant, 1 µg/L bNF, 4 µg/L bNF et 16 µg/L bNF. L'exposition a été réalisée en conditions semi-statiques, avec apport de bNF en solution dans l'acétone (50 µl pour 10 L d'eau) tous les 2 jours.

Après une période d'acclimatation de 2 jours, le traitement à la bNF a été enclenché sous photopériode hivernale (10 heures de lumières). Deux jours après, une photopériode estivale (16 heures de lumières) a été appliquée durant 10 jours. Les femelles ont alors été sacrifiées et analysées comme précédemment décrit.

Les résultats obtenus montrent qu'aucun effet du traitement à la bNF n'a été constaté (Figure 15). Et il apparaît que, pour un même traitement, la variabilité inter-individuelle reste forte, ce que soit la variable biologique considérée.

Cette expérience ne confirme pas les tendances qui se dégagent lors de l'expérience réalisée en 2007. En outre, la variabilité inter-individuelle représente une contrainte importante que le protocole de "conditionnement" des femelles qui a été mis en œuvre n'a pas permis de réduire.

Un essai avec une concentration plus élevée en bNF (40 µg/L) a été engagé. Mais cette concentration s'est avérée rapidement toxique pour les femelles (arrêt de prise alimentaire, puis mort).

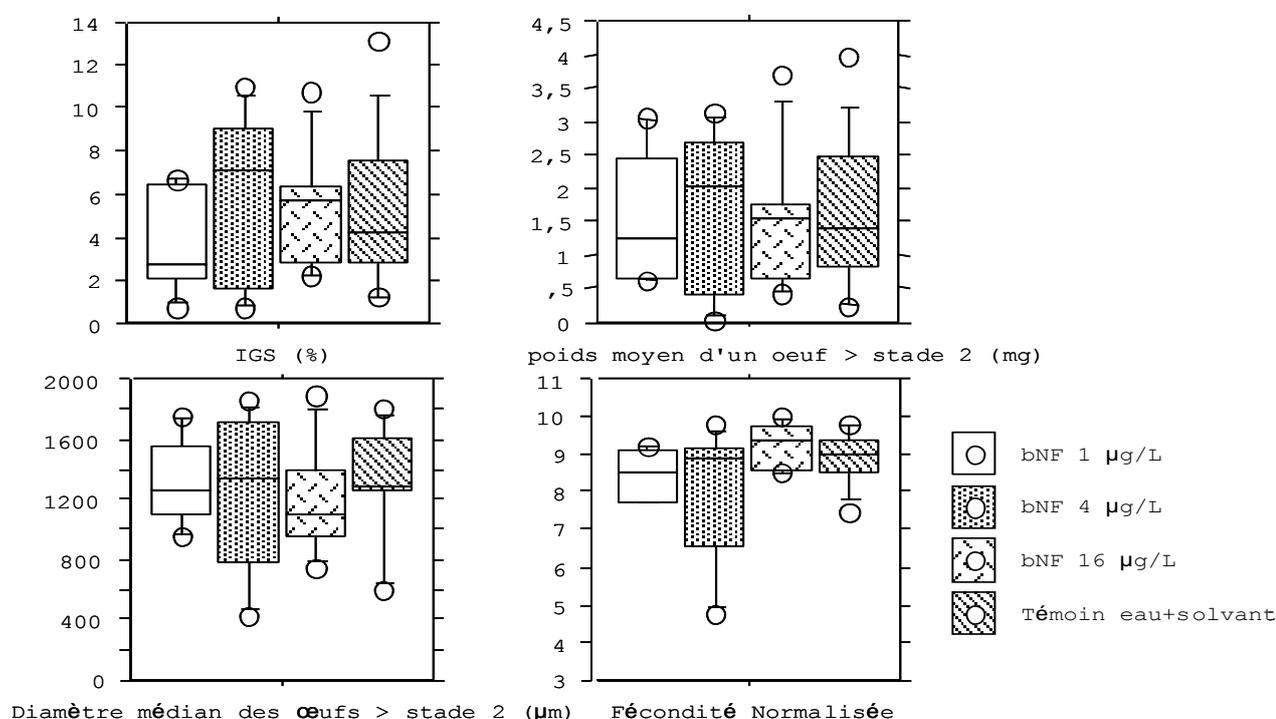


Figure 15. Effet de la bêta-naphtoflavone sur l'ovogenèse chez la gambusie. Répétition de l'expérience réalisée en 2007 (pour la définition des variables, cf. paragraphe 2.2.2).

#### 2.2.4. Essai d'analyse des conséquences pour la descendance d'une exposition à la bNF durant l'ovogenèse

Bien que nos expériences ne permettent pas de conclure à un effet significatif de la bNF sur l'ovogenèse de la gambusie, il restait possible d'envisager qu'une exposition de la mère puisse retentir sur sa descendance.

Cette expérience s'est déroulée suivant le protocole général suivant :

1. Exposition de femelles à la bNF, en condition photopériodique hivernale ;
2. Passage en condition photopériodique estivale tout en poursuivant l'exposition à la bNF ;
3. Arrêt de l'exposition et transfert des femelles en pondoirs ;

4. Récupération des petits et dénombrement ;
5. Transfert des petits en enclos extérieurs de grossissement ;
6. Analyse des individus à l'âge adulte (taille, poids, caractère sexuel secondaire, rapport gonado-somatique).

Les phases (1) et (2) se sont déroulées dans les mêmes conditions que pour les expériences précédentes.

Les phases (3) et (4) ont mobilisé un dispositif constitué d'une cinquantaine d'aquarium de 10 litres dans lesquels sont installés des petits enclos grillagés où sont introduites les femelles gestantes (un enclos par aquarium et une femelle par enclos). Ce dispositif permet aux petits, après la parturition, de se tenir isolés de leur mère (risque de prédation).

Les phases (5) et (6) se sont déroulées en extérieur, du début de l'été jusqu'à l'automne, sur la plate-forme expérimentale de l'Unité Expérimentale d'Ecologie et Ecotoxicologie Aquatique (INRA, Rennes). Pour cette expérience, les lots suivants ont été constitués: témoin, témoin solvant, 4 µg/L bNF, 20 µg/L bNF

### ***Production de petits***

Les femelles n'ont pas toutes produit des petits, et ce quel que soit la modalité de traitement. Ainsi, le nombre de femelles ayant donné naissance à des petits viables est : Témoin : 5 / 11 (32 petits), Témoin solvant : 5 / 11 (51 alevins), 4 µg/L bNF : 4 / 8 (48 alevins), 20 µg/L bNF : 0 / 8

Le nombre de femelles infertiles est relativement important dans les lots témoins. On peut cependant remarquer qu'aucune des femelles ayant subi l'exposition à 20 µg/L bNF n'a produit de petits.

### ***Développement des petits***

À l'issue de la période de grossissement réalisée en conditions extérieures (phase 6 du protocole), la survie a été globalement très bonne pour les 3 traitements : témoin (97 %), témoin solvant (100 %), 4 µg/L bNF (85 %).

Pour chacun des traitements, malgré des effectifs de mâles et de femelles différents en valeur absolue, la sex-ratio n'est pas statistiquement différente de 1 (50 % de mâles et 50 % de femelles) : témoin (19 M : 12 F), témoin solvant (18 M : 33 F), 4 µg/L bNF (21 M : 20 F).

La mesure des différentes variables ne fait apparaître aucune différence statistiquement significative entre les individus mâles issus des mères témoins et ceux issus des mères exposées à l'acétone (données non présentées)

Après regroupement des données mesurées sur les individus mâles "témoins" et "témoins solvant", la comparaison avec les données obtenues à partir des individus issus des mères exposées à 4 µg/L bNF ne montre aucune différence statistiquement significative (Figure 16).

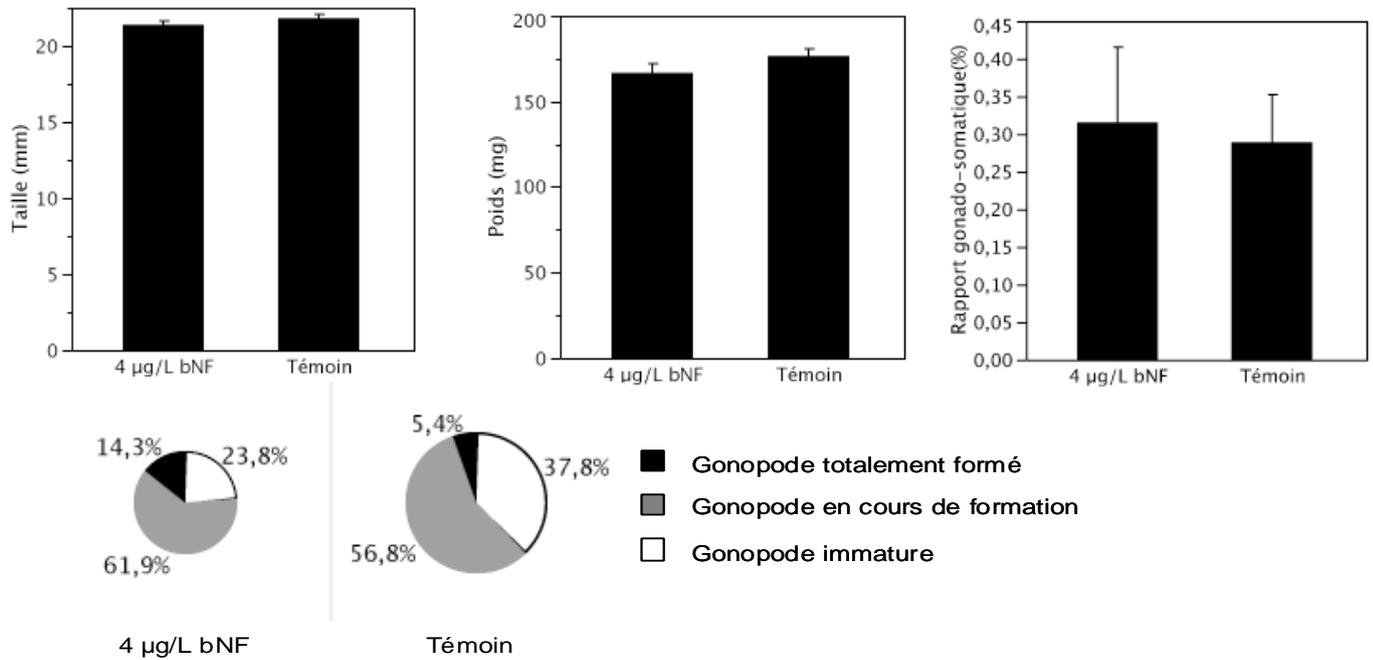


Figure 16. Caractéristiques des individus mâles issus de femelles témoins (n = 37) et de ceux issus de femelles exposées à 4 µg/L bNF (n = 21) Moyenne ± s.e.m. Comme chez les mâles, aucune différence statistiquement significative n'apparaît entre les individus femelles issus de mères témoins et celles issues de mère exposées à l'acétone seul.

Après regroupement des données mesurées sur les individus femelles "témoins" et "témoins solvant", la comparaison avec les données obtenues à partir des individus issus des mères exposées à 4 µg/L bNF ne montre aucune différence statistiquement significative (Figure 17).

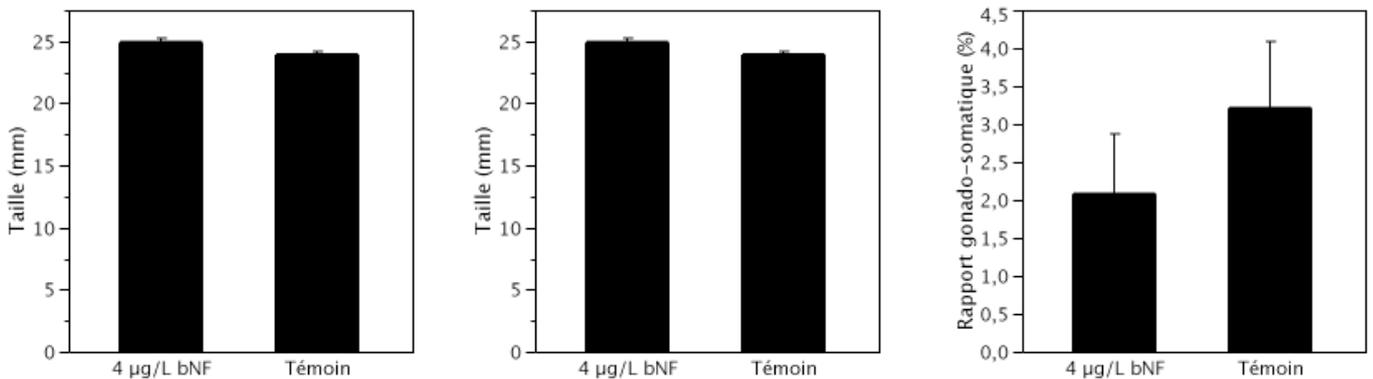


Figure 17. Caractéristiques des individus femelles issus de femelles témoins (n = 45) et de ceux issus de femelles exposées à 4 µg/L bNF (n = 20). Moyenne ± s.e.m. Le faible taux de femelles ayant donné naissance à des petits viables, et ce quelle que soit la modalité de traitement, amène à analyser les résultats obtenus avec une très grande prudence. Les expériences antérieures avaient toujours montré un taux voisin de 100 %. L'explication à cette faible fertilité réside probablement dans la "préparation" des femelles prévues pour les expériences de l'année 2008. Nous pensons en particulier à un déficit d'insémination des femelles durant la phase précédant leur transfert sous photopériode hivernale (nombre de mâles trop faible, voire mâles faiblement fertiles). Nous avons d'ailleurs pu constater, sans en mesurer pleinement la signification, que le nombre de petits produits lors de la parturition précédant ce transfert était relativement faible. Il est donc fort possible qu'une proportion importante des femelles conditionnées pour les expériences de l'année 2008 n'avaient pas stocké de spermatozoïdes

dans leur spermathèque, ce qui rendait impossible la fécondation des ovocytes arrivés à maturité ...

Compte tenu des données disponibles, les analyses réalisées sur les descendants récoltés ne font pas apparaître d'influence du traitement subi par les mères.

### **Conclusion intermédiaire**

L'étude proposée chez la gambusie reposait sur l'idée de synchroniser le cycle ovarien des femelles afin d'augmenter la puissance des comparaisons statistiques entre traitements.

La manipulation photopériodique est clairement une approche qui permet de stopper et d'enclencher l'activité ovarienne de la gambusie. Mais, force est de constater que la variabilité inter-individuelle de la dynamique de reprise de l'ovogenèse semble très difficilement réductible en dessous d'un niveau qui permettrait d'en tirer un réel gain statistique. Ceci diminue ainsi les espoirs de détecter des effets plus subtiles qu'un blocage total de l'ovogenèse ... sauf, peut-être, à augmenter fortement les effectifs de chaque traitement ; ce qui pose d'autres problèmes, notamment matériels ... En tout état de cause, ceci explique sans doute pourquoi nous n'avons pas confirmé en 2008 les tendances observées en 2007.

Le problème rencontré lors de l'essai d'analyse des effets sur la descendance est très regrettable, mais finalement moins "inquiétant" que celui qui concerne la difficulté d'arriver à un niveau de synchronisation inter-femelles élevé. En effet, il est quasi certain qu'il a été provoqué par une insémination insuffisante des femelles. Et ce déficit d'insémination est avant tout lié au fait de n'avoir pas assez donné d'importance à la "pression d'insémination" durant la phase de conditionnement.

Le bilan global de cette étude est donc relativement limité. Et la faible puissance statistique des comparaisons reste un problème très limitant qu'il semble difficile de résoudre à court terme.

## Conclusion Générale

L'objectif de ce programme était d'étudier les interactions entre deux classes de composés ubiquistes, les œstrogènes mimétiques et les composés à activité « dioxine-like », sur des modèles poissons. Les travaux réalisés ont permis de répondre en partie aux objectifs et aux questions que nous nous étions posées.

Ils ont permis d'étudier *in vitro*, sur les cellules gliales U251-MG, et *in vivo*, sur embryons et larves de poisson zèbre, les mécanismes d'actions de molécules agonistes AhR (TCDD, B[a]P, bNF) sur la régulation des gènes de l'aromatase de poisson zèbre seule ou en mélange avec des œstrogènes naturels (E2) ou de synthèse (EE2). Un résultat marquant concerne la mise en évidence des effets anti-œstrogéniques de ces molécules sur l'expression de l'aromatase cérébrale *in vitro* et *in vivo* chez les larves de poisson zèbre. L'anti-œstrogénicité des molécules agonistes AhR est indépendante des sites DRE des régions promotrices des gènes *cyp19* mais nécessite des sites ERE et implique une interaction des molécules avec des AhR fonctionnels.

Par ailleurs, nous montrons qu'au cours de l'embryogenèse le cross-talk ER/AhR est unidirectionnel, l'œstradiol et l'éthinylœstradiol ne modulant pas l'activité 7-ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) du cytochrome P4501A.

Des expositions de poissons zèbres durant leurs développement précoces à de faibles concentrations en éthinylœstradiol et en dioxine, ont permis de montrer que l'EE2, seul ou associé à la TCDD, durant les stades précoces de développement altèraient l'expression de gènes impliqués dans la signalisation œstrogénique dans le cerveau, i.e. l'ER $\alpha$  et l'aromatase cérébrale. Notamment, nous montrons l'induction de l'aromatase cérébrale pour des concentrations environnementales d'EE2 et la capacité de faibles doses de TCDD à inhiber ces inductions. De manière intéressante, les réponses biochimiques et histologiques mesurées étaient de natures différentes puisque la dioxine potentialise l'effet de l'EE2 sur l'expression d'un gène ER-dépendant dans le foie, la vitellogénine, et n'est pas capable de moduler l'effet de l'EE2 sur le développement gonadique.

Enfin, chez la gambusie, un protocole expérimental original basé sur la manipulation photopériodique permettant de stopper et d'enclencher l'activité ovarienne de la gambusie a été utilisé pour étudier les effets de la bNF sur la vitellogenèse et la qualité de la descendance. Des premiers résultats obtenus supportaient l'hypothèse d'un effet négatif de cette molécule sur la vitellogenèse. Cependant ces résultats n'ont pu être reproduits dans le cadre de ce programme.

L'ensemble de ce travail démontre des interactions croisées entre les ligands ER et AhR qui sont de natures complexes et dépendantes du contexte cellulaire et tissulaire étudié. Nos travaux montrent l'intérêt de combiner des tests cellulaires et les tests *in vivo* sur organismes entiers afin de replacer les mécanismes d'interactions dans le contexte physiologique de l'organisme. Nos travaux soulignent l'intérêt des modèles biologiques *in vitro* et *in vivo* utilisés pour étudier ces interactions chez le poisson et leurs intérêts pour évaluer le potentiel œstrogénique et anti-œstrogéniques des substances chimiques.

Enfin, la forte sensibilité de la signalisation œstrogénique (ER $\alpha$ , *cyp19b*) dans le système nerveux central aux ligands ER et AhR soulève la question des effets neuro-endocrines des perturbateurs endocriniens et le besoin d'évaluer plus précisément leurs effets sur les circuits neuro-endocrines impliqués dans la reproduction. Des travaux sont actuellement menés entre nos laboratoires dans le cadre d'un programme ANR pour adresser spécifiquement ces questions (ANR NEED).

## Références Bibliographiques

- Aït-Aïssa S, Cosnefroy A, Porcher JM, Baudiffier D, Pakdel F, Kah O, Balaguer P, Brion F Interference between estrogen (ER) and aryl hydrocarbon receptors (AhR) signaling pathways in two fish biological models : the PELN reporter cell line and zebrafish embryos. 15th International Congress on In Vitro Toxicology, 25-28 Sept 2008, Stockholm, Sweden
- Aït-Aïssa S, Hinfray N, Porcher JM, Balaguer P, Brion F. Differential modulation of estrogenic response by AhR ligands, dioxin and clotrimazole, in stable human (MCF-7) and fish (PLHC-1) reporter cell lines. SETAC Europe 19th Annual Meeting, 31 May - 4 June 2009, Göteborg, Sweden
- Anderson MJ, Olsen H, Matsumura F, Hinton DE. (1996). In vivo modulation of 17 beta-estradiol-induced vitellogenin synthesis and estrogen receptor in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver cells by beta-naphthoflavone Toxicol Appl Pharmacol. 137(2):210-8.
- Arukwe A., Yadetie F., Male R., Goksøyr A. (2001) In vivo modulation of nonylphenol-induced zonagenesis and vitellogenesis by the antiestrogen, 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl (PCB-77) in juvenile fish. Environ. Toxicol. Pharmacol. 10(1-2):5-15
- Aubry E, Rime H., Monod G. (2005) Beta-naphthoflavone inhibits the induction of hepatic estrogen-dependent proteins by 17alpha-ethynylestradiol in mosquitofish (*Gambusia holbrooki*). Biomarkers 10(6):439-55.
- Balaguer P, François F, Comunale F, Fenet H, Boussioux AM, Pons M, Nicolas JC, Casellas C (1999) Reporter cell lines to study the estrogenic effects of xenoestrogens. Sci Total Environ, 233 (1-3): 47-56
- Bemanain V., Male R., Goksøyr A. (2004) The aryl hydrocarbon receptor-mediated disruption of vitellogenin synthesis in the fish liver: Cross-talk between AHR- and ERalpha-signalling pathways. Comp Hepatol. 2;3(1):2.
- Brian, JV, Augley JJ, Braithwaith VA (2006). Endocrine disrupting effects on the nesting behaviour of male three-spined stickleback *G. aculeatus*. J. Fish. Biol. 68,1883-1890.
- Brion F., Nilsen B. M., Eidem J. K., Goksøyr A., Porcher J. M. (2002). Development and validation of an ELISA to measure vitellogenin in the zebrafish (*Danio rerio*). Environ Toxicol Chem 21(8): 1699-1708.
- Brion F., Tyler C.R., Palazzi X., Garric J., Laillet B., Porcher J. M., Flammarion P. (2004). Impacts of 17beta-estradiol, including environmentally relevant concentrations, on reproduction after exposure during embryo-larval-, juvenile- and adult-life stages in zebrafish (*Danio rerio*). Aquat Toxicol. 68:193-217.
- 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.
- Cosnefroy A, Brion F., Guillet B., Laville N., Porcher JM, Balaguer P, Aït-Aïssa S A stable fish reporter cell line to study estrogen receptor transactivation by environmental (xeno)estrogens Toxicology in Vitro, In Press,
- Couse JF, Korach KS (199). Reproductive phenotypes in the estrogen receptor-alpha knockout mouse. Ann Endocrinol;60(2):143-8.
- Flouriout G., Pakdel F., Ducouret B., Valotaire T. (1995) Influence of xenobiotics on rainbow trout liver estrogen receptor and vitellogenin gene expression. J Mol Endocrinol. 15(2):143-51.
- Flouriout G., Pakdel F., Ducouret B., Ledrean Y., Valotaire T. (1997).Differential regulation of two genes implicated in fish reproduction: vitellogenin and estrogen receptor genes. Mol Reprod Dev. 48(3):317-23
- Fenske M., Segner H. (2004) Aromatase modulation alters gonadal differentiation in developing zebrafish (*Danio rerio*). Aquat Toxicol. 14;67(2):105-26.
- Fenske M, Maack G, Schäfers C, Segner H.(2005) An environmentally relevant concentration of estrogen induces arrest of male gonad development in zebrafish, *Danio rerio*. Environ Toxicol Chem. 24(5):1088-98.
- Heiden TJ, Spitsbergen J., Heideman W, Peterson RE (2009) Persistent Adverse Effects on Health and Reproduction Caused by Exposure of Zebrafish to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin During Early Development and Gonad Differentiation Toxicol. Sci.,; 109: 75 - 87.
- IPCS, (1998). Global Assessment of the States-of-the-Science of Endocrine Disruptors
- Jobling S, Coey S, Whitmore JG, Kime DE, Van Look KJ, McAllister BG, Beresford N, Henshaw AC, Brighty G, Tyler CR, Sumpter JP. (2002). Wild intersex roach (*Rutilus rutilus*) have reduced fertility. Biol Reprod. 67:515-24.
- Kavlock, R. J., G. P. Daston, C. DeRosa, P. Fenner-Crisp, L. E. Gray, S. Kaattari, G. Lucier, M. Luster, M. J. Mac, C. Maczka, R. Miller, J. Moore, R. Rolland, G. Scott, D. M. Sheehan, T. Sinks and H. A. Tilson (1996). "Research needs for risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors :a report of the U.S. EPA-sponsored workshop." Environ Health Perspect 104: 715-740.

- Kazeto Y, Place AR, Trant JM. (2004). Effects of endocrine disrupting chemicals on the expression of CYP19 genes in zebrafish (*Danio rerio*) juveniles. *Aquat Toxicol.* 69(1):25-34.
- Le Guevel R., Pakdel F.(2001) Assessment of oestrogenic potency of chemicals used as growth promoter by in-vitro methods. *Hum Reprod.* 2001 16(5):1030-6.
- Menuet A, Pellegrini E, Anglade I, Blaise O, Laudet V, Kah O, Pakdel F. (2002) Molecular characterization of three estrogen receptor forms in zebrafish: binding characteristics, transactivation properties, and tissue distributions. *Biol Reprod* 66:1881-92.
- Menuet A., Anglade I., Le Guevel R., Pellegrini E., Pakdel F., Kah O., 2003, Distribution of aromatase mRNA and protein in the brain and pituitary of female rainbow trout: Comparison with estrogen receptor alpha, *J Comp Neurol*, 462 (2), 180-93.
- Menuet A., Pellegrini E., Brion F., Gueguen M-M, Dujardin T, Anglade I, Marmignon M, Pakdel F and Kah O. (2005). Expression and estrogen-dependent regulation of the zebrafish brain aromatase gene. *J. Comp. Neurol.* 16;485(4):304-20.
- Monod G, Devaux A., Rivière, JL. (1998) Effects of chemical pollution on the activities of hepatic xenobiotic metabolizing enzymes in fish from the River Rhone. *Sci Total Environ.* 15;73(3):189-201.
- Mortensen AS, Arukwe A (2007) Activation of estrogen receptor signaling by the dioxin-like aryl hydrocarbon receptor agonist, 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB126) in salmon in vitro system. *Comp Hepatol.* 2007 Apr 13;6:2.
- Mortensen AS, Arukwe A (2008) Activation of estrogen receptor signaling by the dioxin-like aryl hydrocarbon receptor agonist, 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB126) in salmon in vitro system. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2008 Mar 1;227(2):313-24.
- Nash, J., Kime, D.E., van der ven, L., Wester, P., Brion, F., Maack, G., Stahlschmidt-Allner, P., and Tyler, C.R. (2004). Environmentally relevant concentrations of the pharmaceutical, ethinylestradiol, impact fish populations. *Environ Health Perspect*, 112(17):1725-33.
- Navas JM, Segner H. (2000). Antiestrogenicity of beta-naphthoflavone and PAHs in cultured rainbow trout hepatocytes: evidence for a role of the arylhydrocarbon receptor. *Aquat Toxicol.*51(1):79-92.
- Lange A, Katsu Y, Ichikawa R, Paull GC, Chidgey LL, Coe TS, Iguchi T, Tyler CR.(2008) Altered sexual development in roach (*Rutilus rutilus*) exposed to environmental concentrations of the pharmaceutical 17alpha-ethinylestradiol and associated expression dynamics of aromatases and estrogen receptors. *Toxicol Sci.*;106(1):113-23
- Marlatt VL, Martyniuk CJ, Zhang D, Xiong H, Watt J, Xia X, Moon T, Trudeau VL. (2008) Auto-regulation of estrogen receptor subtypes and gene expression profiling of 17beta-estradiol action in the neuroendocrine axis of male goldfish *Mol Cell Endocrinol*:283(1-2):38-48
- Ohtake F, Takeyama K, Matsumoto T, Kitagawa H, Yamamoto Y, Nohara K, Tohyama C, Krust A, Mimura J, Chambon P, Yanagisawa J, Fujii-Kuriyama Y, Kato S (2003) Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor. *Nature* 29, 423 :487-488
- Oppen-Berntsen DO., Arukwe A., Yadetie F., Lorens JB., Male R: Salmon eggshell protein expression: a marker for environmental estrogens. *Marine Biotechnol* 1999, 1:252-260
- Pellegrini E., Menuet A., Lethimonier C., Adrio F., Gueguen MM., Tascon C., Anlade I., Pakdel F., Kah O. (2005). Relationships between aromatase and estrogen receptors in the brain of teleost fish. *Gen Comp Endocrinol.*15;142(1-2):60-6.
- Pellegrini E, Mouriec K, Anglade I, Menuet A, Le Page Y, Gueguen MM, Marmignon MH, Brion F, Pakdel F, Kah O. (2007) Identification of aromatase-positive radial glial cells as progenitor cells in the ventricular layer of the forebrain in zebrafish. *J Comp Neurol.*;501(1):150-67.
- Petit F., Le Goff P., Cravedi JP., Valotaire Y., Pakdel F. (1997). Two complementary bioassays for screening the estrogenic potency of xenobiotics: recombinant yeast for trout estrogen receptor and trout hepatocyte cultures. *J Mol Endocrinol.* 19(3):321-35.
- Prasch AL., Teraoka H., Carney SA., Dong W., Hiraga T., Stegeman JJ., Heidman, W., Peterson RE. (2003) Aryl hydrocarbon receptor 2 mediates 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin developmental toxicity in zebrafish. *Toxicol Sci.* 76(1):138-50.
- Rodríguez-Marí A., Yan Y-L., BreMiller R. A., Wilson C, Cañestro C., Postlethwait J.H. (2005) Characterization and expression pattern of zebrafish anti-Müllerian hormone (amh) relative to sox9a, sox9b, and cyp19a1a, during gonad development. *Gene Express. Patterns.* 5( 5) 655-667
- Schäfers, C., Teigeler, M., Wenzel, A Maack, G. Fenske M. and Segner H. (2007). Concentration- and time-dependent effects of the synthetic estrogen, 17 $\alpha$ -ethinylestradiol, on reproductive capabilities of the zebrafish *Danio rerio*, *J. Toxicol. Environ. Health, Part A* 70,768–779.
- Schulz RW, Bogerd J, Male R, Ball J, Fenske M, Olsen LC, Tyler CR.(2007) Estrogen-induced alterations in amh and dmrt1 expression signal for disruption in male sexual development in the zebrafish. *Environ Sci Technol.*41(17):6305-10.

Safe S, Wang F, Porter W, Duan R, McDougal A. (1998). Ah receptor agonists as endocrine disruptors: antiestrogenic activity and mechanisms. *Toxicol Lett.* 102-103:343-347.

Wu WZ, Li W., Xu Y., Wang JW (2001). Long-term toxic impact of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on the reproduction, sexual differentiation, and development of different life stages of *Gobiocypris rarus* and *Daphnia magna*. *Ecotoxicol Environ Saf.* 48(3):293-300

## VALORISATION DES RESULTATS

### Rapport de stage

Herry Juliette. Effet d'un ligand du récepteur Ah, la bêta-naphtoflavone, sur la vitellogenèse de la gambusie (*Gambusia holbrooki*). Rapport IUT génie Biologique, option Agronomie, Université de Brest. 27 pages.<sup>7</sup>

Baudiffier Damien. Effet de la 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD), seule ou associée à un xéno- oestrogène, sur l'expression des récepteurs des oestrogènes et de l'aromatase cérébrale chez le poisson zèbre *Danio rerio* Master Biologie Cellulaire, Physiologie et Pathologie Spécialité Toxicologie- Environnement- Santé Université Paris 7, année 2007/2008

### Communication en congrès

**Brion F**, Cheshenko K, Le Page Y, **Hinfray N**, Segner H., **Kah O**, **Pakdel F** and Eggen Rik I.L. Interference between TCDD and Estradiol and its action on zebrafish brain aromatase gene expression. 2<sup>nd</sup> International Conference on "Molecular Research in Environmental Medicine", 7-8 september 2006, Paris. [Poster]

**Hinfray N.**, Ait-Aïssa S., Palluel O., **Porcher J.M.**, **Pakdel F.**, **Kah O.**, **Brion F.** Brain and gonadal aromatase as molecular and biochemical targets of endocrine disrupters in a model species, the zebrafish (*Danio rerio*). 8<sup>th</sup> International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, 3-8 june 2007, Saint-Malo, France, [Communication orale]

Aït-Aïssa S, Cosnefroy A, **Porcher JM**, Baudiffier D, **Pakdel F**, **Kah O**, Balaguer P, **Brion F** Interference between estrogen (ER) and aryl hydrocarbon receptors (AhR) signaling pathways in two fish biological models : the PELN reporter cell line and zebrafish embryos. 15th International Congress on In Vitro Toxicology, 25-28 Sept 2008, Stockholm, Sweden [Poster]

Aït-Aïssa S, **Hinfray N**, **Porcher JM**, Balaguer P, **Brion F**. Differential modulation of estrogenic response by AhR ligands, dioxin and clotrimazole, in stable human (MCF-7) and fish (PLHC-1) reporter cell lines. SETAC Europe 19th Annual Meeting, 31 May - 4 June 2009, Göteborg, Sweden [Poster]

**Brion F**, **Hinfray N**, Baudiffier D, Vosges M, Palluel O, Ait-Aïssa S, **Pakdel F**, **Kah O**, **Porcher J-M**. Effects of EE2 and TCDD, alone or in combination, on ER-dependent genes expression and sexual differentiation in the zebrafish. SETAC Europe 19th Annual Meeting, 31 May - 4 June 2009, Göteborg, Sweden [Communication orale].

---

<sup>7</sup> Stage effectué à l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Station Commune en Ichtyophysiologie, Biodiversité et Environnement (SCRIBE) sous la responsabilité de Gilles Monod.

Articles dans revue de rang A

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. [Annexe 1]

Le Page Y, Menuet A, **Kah O.**, **Pakdel F.** (2008) Characterization of a cis-acting element involved in cell-specific expression of the zebrafish brain aromatase gene. *Molecular Reproduction and Development* 75:1549-1557 [Annexe 2]

**Hinfray N.**, Cheshenko K, Ait-Aissa S., Palluel O., **Porcher J.M.**, **Pakdel F.**, **Kah O.**, Eggen R.I.L. **Brion F** (2008). Brain and gonadal aromatases as molecular and biochemical targets of endocrine disruptors in a model species, the zebrafish (*Danio rerio*). *Cybium*, 32(2) suppl. : 34-36. [Annexe 3]

Articles en préparation

Aït-Aïssa S, Cosnefroy A, **Porcher JM**, Baudiffier D, **Pakdel F**, **Kah O**, Balaguer P, **Brion F** Interference between estrogen (ER) and aryl hydrocarbon receptors (AhR) signaling pathways in two fish biological models : the PELN reporter cell line and zebrafish embryos.

**Brion F**, **Hinfray N**, Baudiffier D, Vosges M, Palluel O, Ait-Aïssa S, **Pakdel F**, **Kah O**, **Porcher J-M**. Effects of EE2 and TCDD, alone or in combination, on ER-dependent genes expression and sexual differentiation in the zebrafish. In prep.