

Interactions entre composés œstrogéniques et dioxines sur la reproduction des poissons

F. Brion¹, N. Hinfray¹, G. Monod², F. Pakdel³, O. Kah³

¹INERIS, Unité "Ecotoxicologie *in vitro* et *in vivo*", Parc Technologique ALATA, BP 2, 60550 Verneuil-en-Halatte, France

²INRA-SCRIBE, 35000, Rennes, France, ³UMR CNRS 6026 Université de Rennes 1, 35000, Rennes, France

Introduction

Dans l'environnement, les organismes sont le plus souvent exposés à des mélanges complexes de substances dont les interactions sont délicates à appréhender. Parmi les substances largement présentes dans le milieu aquatique figurent des composés œstrogènes mimétiques et « dioxine-like ». Les œstrogènes mimétiques sont capables de moduler par divers mécanismes la transcription de certains gènes œstrogéno-dépendants et d'affecter la reproduction des individus. Les dioxines sont 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 et présenter des activités œstrogéniques ou anti-œstrogéniques sans se fixer aux ERs (Safe *et al.*, 1998, Ohtake *et al.*, 2003). A l'heure actuelle, ces effets sont très peu renseignés chez le poisson et il existe peu de données permettant de relier les mécanismes d'action de ces molécules aux effets biologiques et aux risques qu'elles peuvent représenter *in vivo* sur la fonction de reproduction.

Dans ce contexte, l'objectif de ce programme est d'étudier les interactions entre ces deux classes de composés ubiquistes, les œstrogènes mimétiques et les composés à activité dioxine-like, sur des modèles poissons et d'en évaluer les impacts sur la fonction de reproduction.

Méthodologie

Notre stratégie combine des modèles biologiques de complexités variables afin d'appréhender les effets à des niveaux d'organisation biologiques variés :

Au niveau moléculaire :

Il s'agit d'étudier *in vitro* les interconnexions entre les récepteurs Ah et 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 comme les gènes de l'aromatase cérébrale (gène *cyp19a1b*) et ovarienne (gène *cyp19a1a*), a été étudiée dans des différentes lignées cellulaires, les cellules gliales radiales et les cellules ovarienne de hamster chinois (CHO).

Au niveau de l'organisme :

Il s'agit de replacer les 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, *cyp19a1b* et gène de l'aromatase ovarienne, *cyp19a1a*). Par ailleurs, des expérimentations sur le poisson zèbre et la gambusie (*Gambusia holbrooki*) sont menées afin d'étudier l'impact fonctionnel des interactions entre récepteurs Ah et ER sur la reproduction du poisson en se focalisant sur la différenciation sexuelle (poisson zèbre) et la vitellogenèse (gambusie).

Résultats et Discussion

Les œstrogènes régulent positivement l'aromatase cérébrale.

L'exposition d'embryons ou de larves de poisson zèbre à des oestrogènes se traduit par une forte induction du gène de l'aromatase cérébrale dans les cellules gliales radiaires *in vivo* et l'intérêt de ce gène comme marqueur d'exposition des xéno-oestrogènes au cours du développement précoce du poisson (stade embryonnaire et larvaire). De façon intéressante, la régulation gliale-spécifique du gène *cyp19a1b* par les œstrogènes *in vivo* est reproduite *in vitro* dans un contexte cellulaire neuro-gliales. Cette induction ER-dépendante du gène de l'aromatase B requière des ERE fonctionnelles dans la région promotrice du gène aromatase B (Menuet et al., 2005) ainsi que des facteurs neuro-gliaux encore non identifiés qui agissent via des séquences GxRE situées dans la région promotrice du gène aromatase B (Le Page et al., 2008).

Contrairement aux oestrogènes, les dioxines seules ne régulent pas l'expression de l'aromatase cérébrale *in vivo*. L'analyse des régions promotrices des gènes de l'aromatase démontre l'absence de fonctionnalité des éléments de réponses aux dioxines des régions promotrices des gènes de l'aromatase 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.

Les dioxines exercent des effets anti-oestrogéniques.

Nous montrons que les dioxines sont capables d'antagoniser *in vitro* et *in vivo* les inductions du gène de l'aromatase B médiées par les oestrogènes. En outre, nous montrons que l'anti-oestrogénicité des dioxines requière des récepteurs Ah fonctionnels *in vitro* et *in vivo* puisque l'ajout d'un antagoniste du récepteur Ah bloque totalement ou partiellement l'effet inhibiteur des dioxines.

L'interférence négative de la voie AhR vers la voie ER au cours de l'embryogenèse semble unidirectionnelle. En effet, à l'aide d'un bio-essai *in vivo* sur embryon de poisson zèbre, nous avons pu quantifier

l'induction de l'activité enzymatique du cytochrome P4501A par la dioxine. L'ajout d'oestrogènes dans le milieu ne modifie pas l'induction du CYP1A par la TCDD montrant ainsi l'absence d'interférence de la voie ER activée sur la voie AhR.

Effets de faibles concentrations en éthinyl-oestradiol et en dioxine sur la signalisation oestrogénique et la reproduction.

La question des interactions et des effets de faibles concentrations en ligands ER et AhR sur la reproduction des poissons a été adressée en exposant des poissons zèbres à de faibles concentrations en éthinyl-oestradiol (EE2) et en dioxine (TCDD) seule ou en combinaison, durant la période de différenciation sexuelle chez le poisson zèbre. 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 dans la système nerveux central (ER α , β 1, β 2 et *cyp19a1b*) et le foie (vitellogénine). L'analyse histologique des gonades a permis d'évaluer l'impact fonctionnel de ces traitements sur la différenciation gonadique.

Les résultats de cette étude montrent que l'exposition de poisson zèbre à une faibles concentration en EE2 (10 ng/L), seule ou associée à la TCDD (10 pg/L), durant les stades précoces de développement altèrent l'expression de gènes impliqués dans la signalisation œstrogénique dans le cerveau comme l'isoforme α du récepteur ER et l'aromatase cérébrale, AroB. Notamment, nous montrons l'effet œstrogénique de l'EE2 par sa capacité à induire l'AroB à des concentrations environnementales et la capacité de faibles doses de TCDD à inhiber ces inductions confirmant l'anti-oestrogénicité de la TCDD à une faible concentration. L'anti-oestrogénicité de la dioxine ne s'observe pas cependant sur l'expression d'une protéine hépatique ER-régulée la vitellogénine, la co-exposition EE2 et TCDD potentialisant l'induction de la vitellogénine par l'EE2 seule. Chez les poissons exposés à l'EE2, la majorité des individu présente un arrêt du développement gonadique qui n'est pas contrecarré par la co-exposition avec la TCDD.

La forte sensibilité du ER α et du cyp19a1b 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 circuits neuro-endocrines impliqués dans la reproduction et renforce l'idée de la vulnérabilité des stades précoces de développement des poissons aux perturbateurs endocriniens

Conclusions:

Nous montrons 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 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 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 oestrogénomimétiques et à activité dioxine. Cet axe de recherche est actuellement mené dans le cadre d'un programme ANR dédié aux effets neuro-endocrines des perturbateurs endocriniens chez les vertébrés (ANR NEED)

Références:

Cheshenko K., Brion F., Le Page Y, Hinfray N, Pakdel F., Kah O., Segner H., Eggen R.I.L. (2007). *Toxicological Sciences* 96: 255-267.

Le Page Y, Menuet A, Kah O, Pakdel F. (2008). *Mol Reprod Dev.* 75(10):1549-57.

Menuet A., Pellegrini E., Brion F., Gueguen M-M, Dujardin T, Anglade I, Marmignon M, Pakdel F and Kah O. (2005). *J. Comp. Neurol.* 16;485(4):304-20.

Pellegrini E, Mouriec K, Anglade I, Menuet A, Le Page Y, Gueguen MM, Marmignon MH, Brion F, Pakdel F, Kah O. (2007) *J Comp Neurol.*;501(1):150-67.