

COLLOQUE PNRPE

PROGRAMME
NATIONAL
DE RECHERCHE
SUR LES
PERTURBATEURS
ENDOCRINIENS

François Brion, INERIS
Gilles Monod, INRA
Farzad Pakdel, Olivier Kah, CNRS

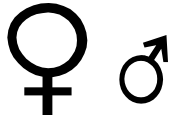
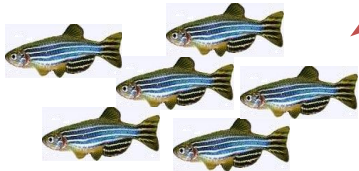
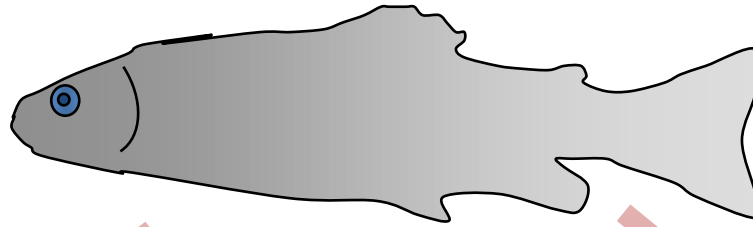
Évaluation des effets endocrines des œstrogènes mimétiques et des composés à activité dioxine sur l'expression de gènes cibles et impacts fonctionnels sur la reproduction chez le poisson



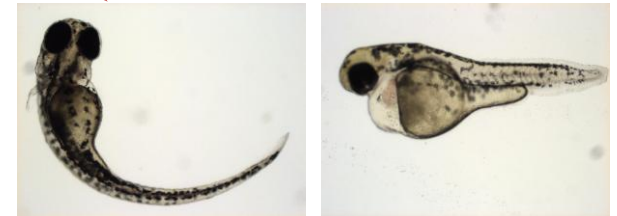
Contexte

Xéno-œstrogènes
(agonistes ER)

Composés dioxine-like
(agonistes AhR)



Effets endocrines
←
des dioxines



Sex-ratio et Reproduction

Toxicité embryolaire

Effet populationnel

Contexte

- ⊙ Interactions complexes entre les récepteurs Ah et ER.
 - ⊙ Ligands agonsites du AhR conduisant à des réponses œstrogéniques ou anti- œstrogéniques
- ⊙ Études *in vitro* dans des lignées de mammifères
- ⊙ Peu d'étude chez le poisson, des résultats contradictoires
- ⊙ Effet sur la reproduction?

Objectifs et démarche expérimentale

- ⊙ 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
- ⊙ Évaluer l'impact fonctionnel des interactions moléculaires entre les voies AhR et ER-dépendantes sur la reproduction du poisson
 - ⊙ Différenciation sexuelle
 - ⊙ Vitellogenèse

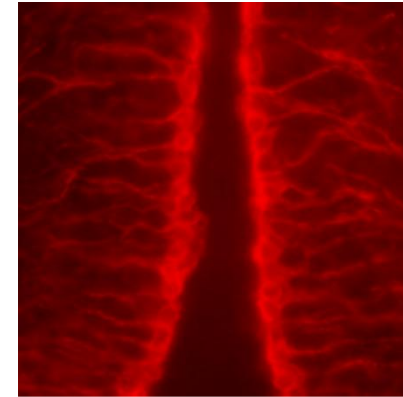
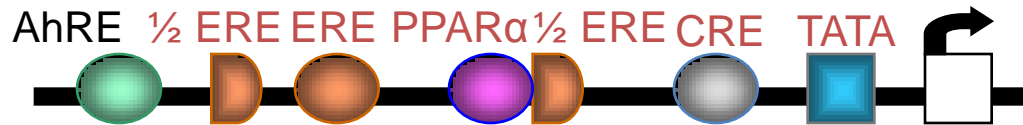
Aromatases chez les poissons

Biosynthèse des œstrogènes à partir des androgènes

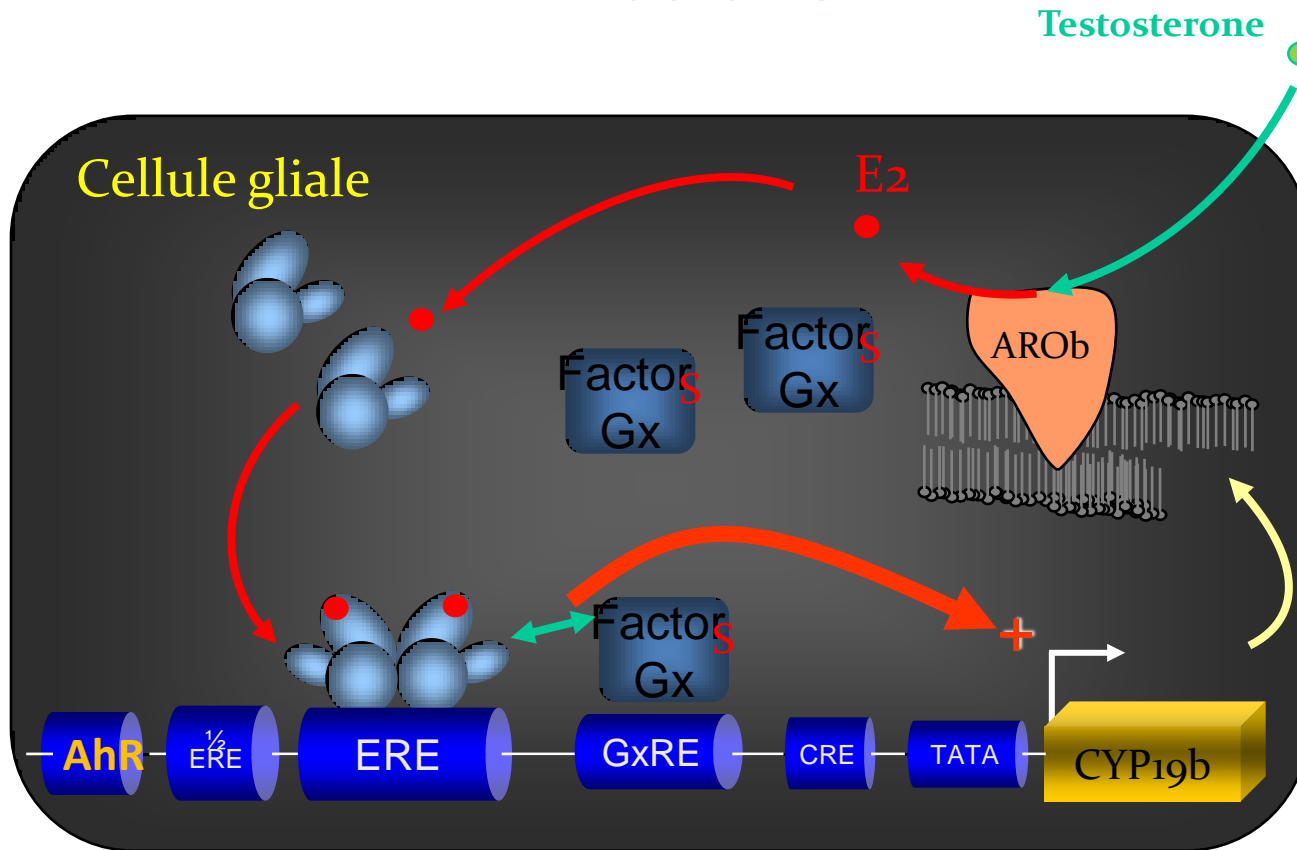
P450 AroB

Aromatase cérébrale

Cyp19a1b



Aromatase cérébrale chez le poisson zèbre, gène oestrogéno-régulé dans les cellules gliales radiaires



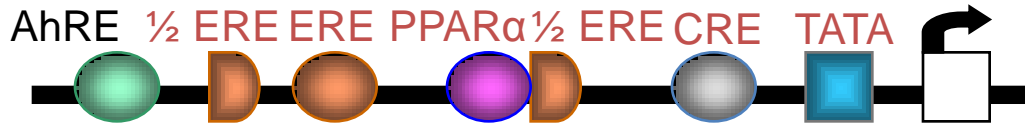
Menuet et al., 2005, Le Page et al., 2008

Aromatases chez les poissons

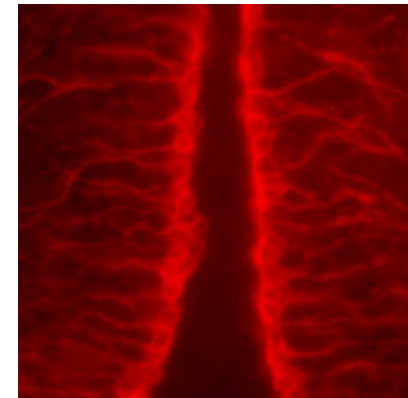
Biosynthèse des œstrogènes à partir des androgènes

Aromatase cérébrale

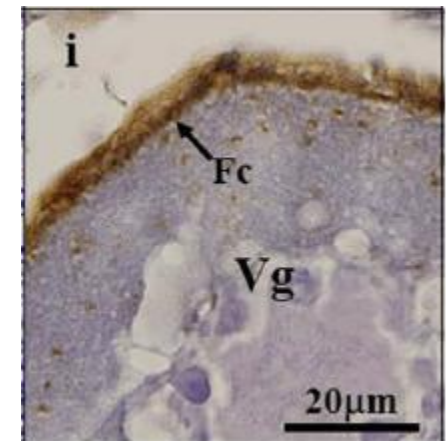
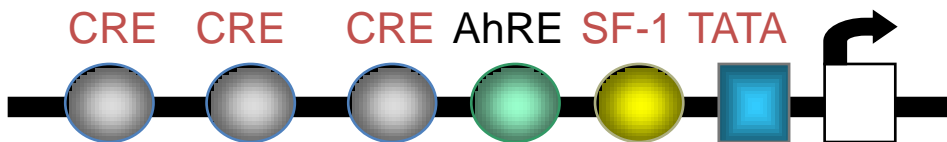
Cyp19a1b



P450 AroB



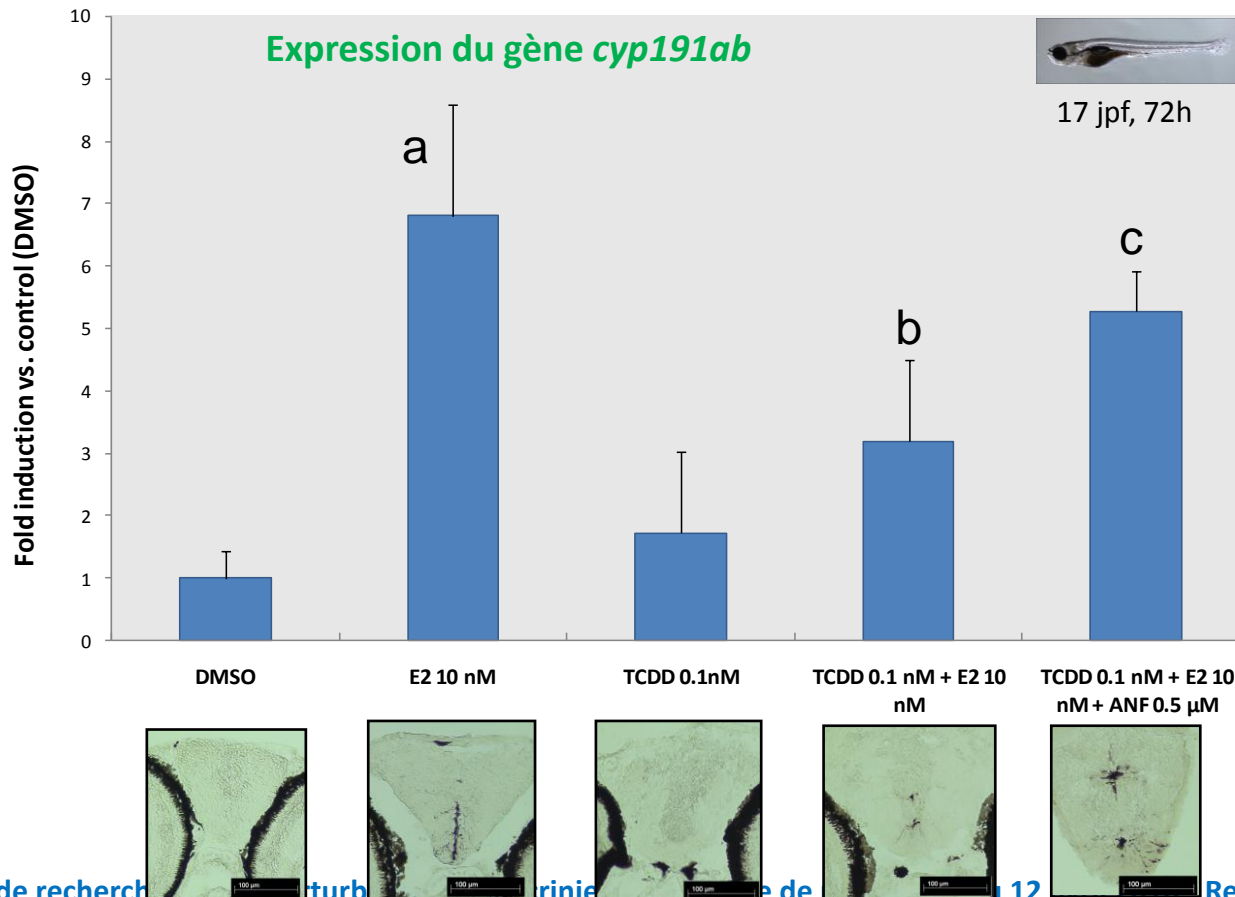
Cyp19a1a = aromatase gonadique



Interférence des agonistes AhR sur la signalisation oestrogénique

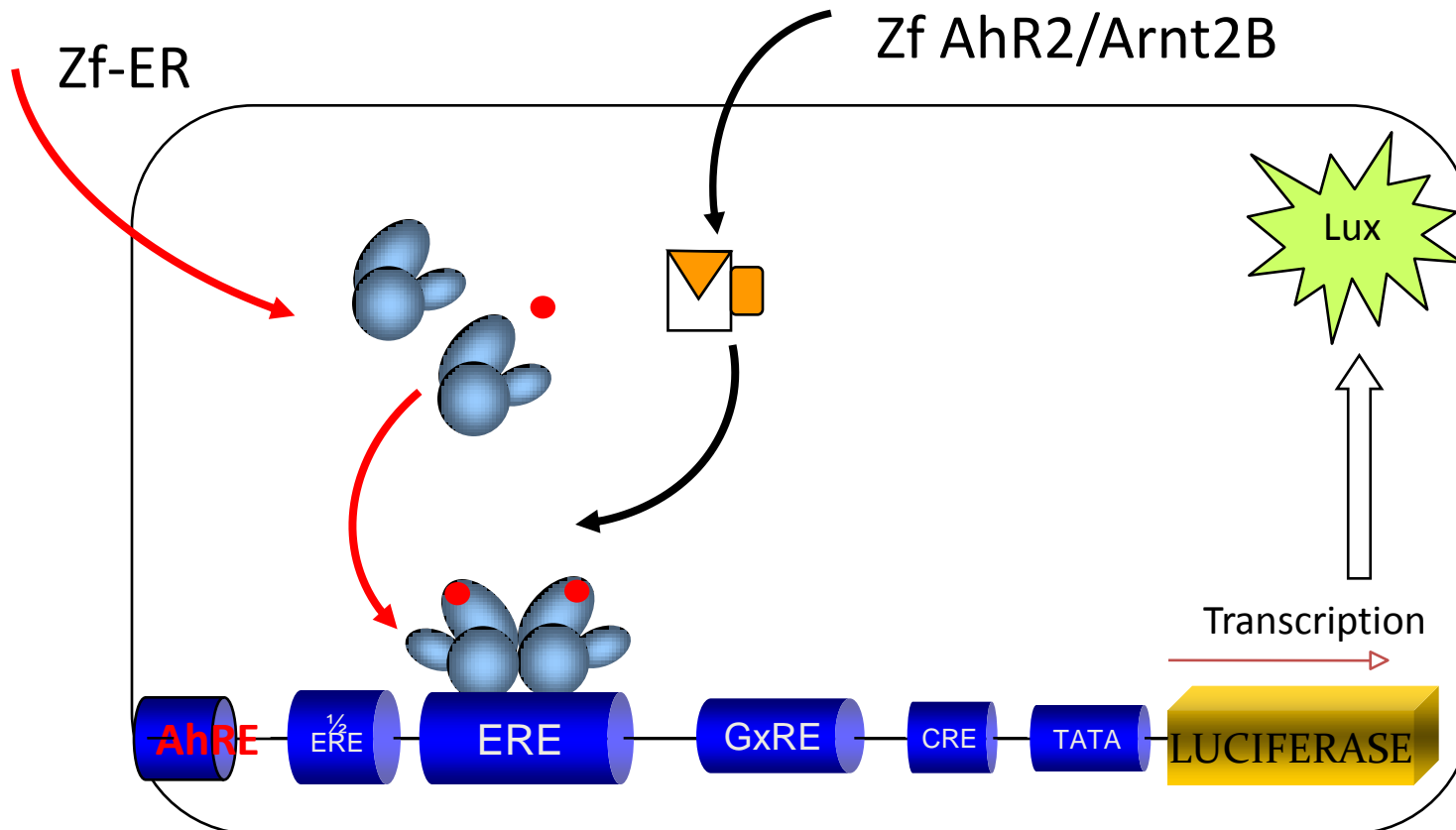
Expression of Zebra Fish Aromatase *cyp19a* and *cyp19b* Genes in Response to the Ligands of Estrogen Receptor and Aryl Hydrocarbon Receptor

Ksenia Cheshenko,^{*,1} Francois Brion,^{†,1} Yann Le Page,[‡] Nathalie Hinfray,[†] Farzad Pakdel,[‡] Olivier Kah,[‡] Helmut Segner,[§] and Rik I.L. Eggen^{*,2}
TOXICOLOGICAL SCIENCES **96**(2), 255–267 (2007)



Interférence des agonistes du récepteur Ah sur la signalisation œstrogénique *in vitro*

Cellules U251-MG

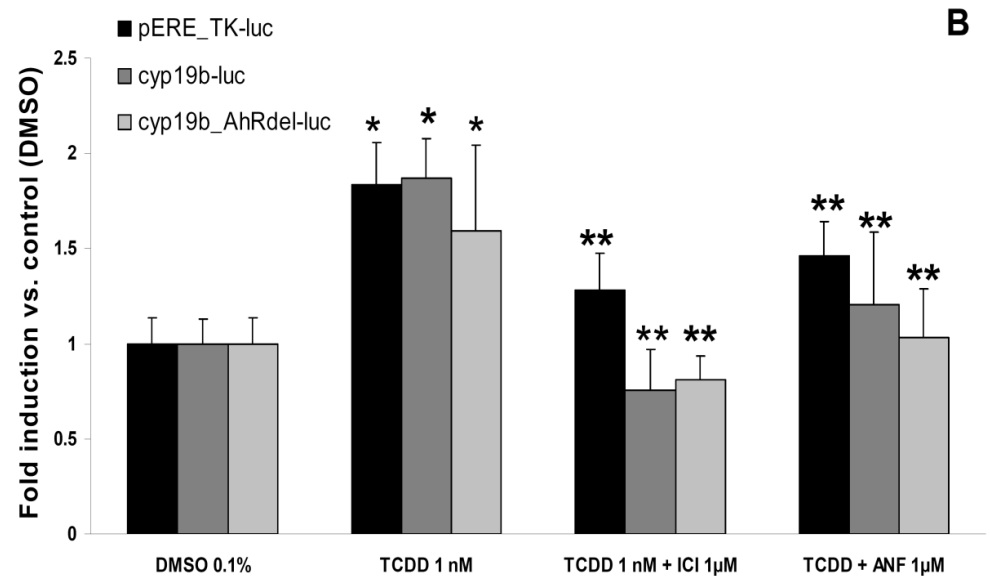
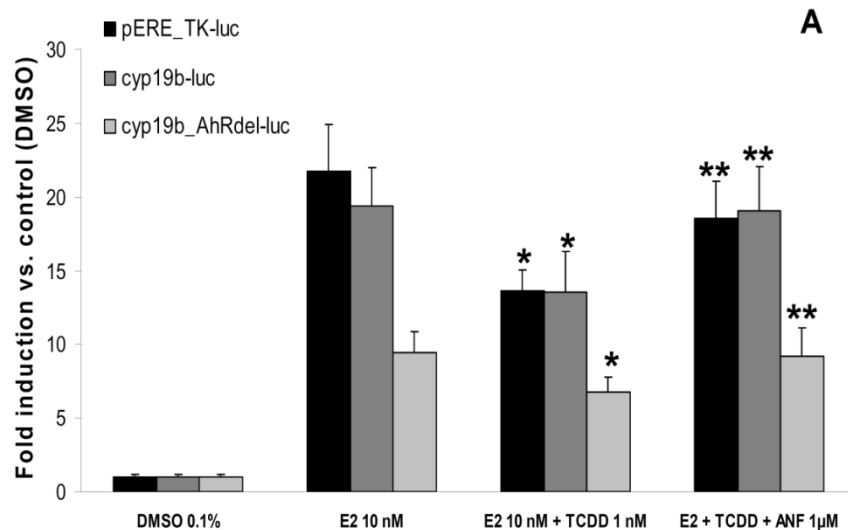


- ⊙ Effet de la TCDD seule ou avec des œstrogènes
- ⊙ Promoteur *cyp19a1b* complet et délaité en séquence AhRE

Interférence des agonistes AhR sur la signalisation œstrogénique

En présence d'œstradiol

En absence d'œstradiol

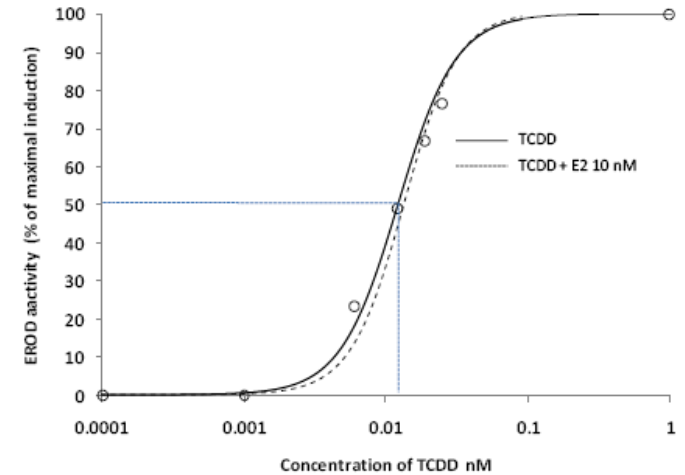
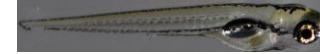
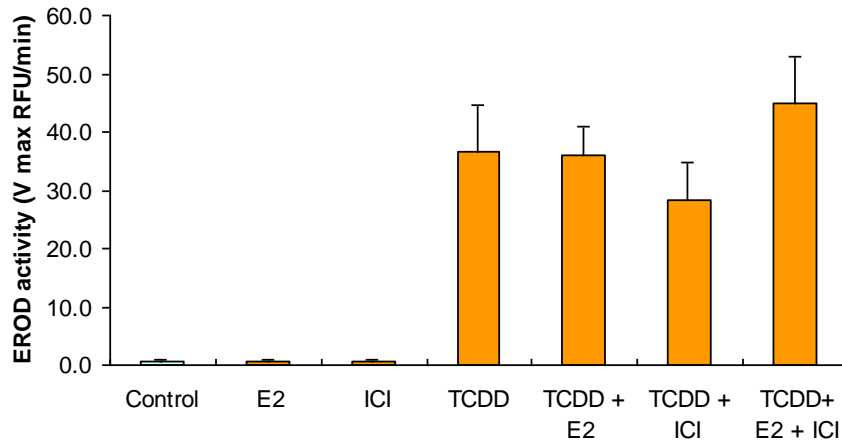


Effet anti-œstrogénique de la TCDD
in vitro

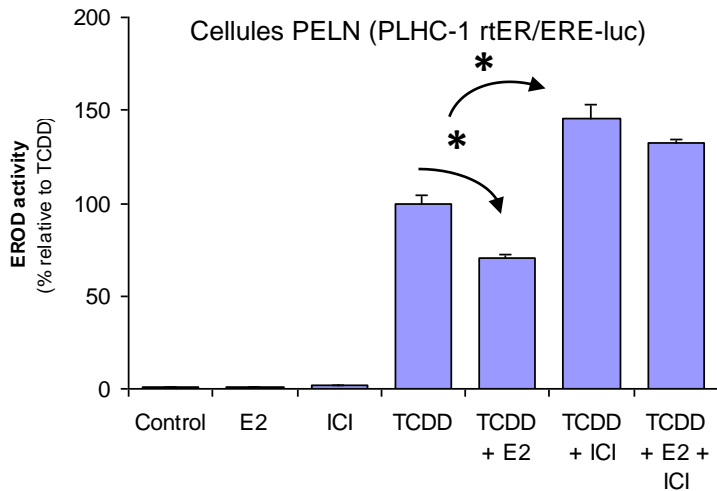
Effet œstrogénique de la TCDD
in vitro

Interférence des agonistes ER sur la signalisation AhR ?

Mesure *in vivo* de l'activité EROD



Mesure *in vitro* de l'activité EROD en lignée hépatique de poisson



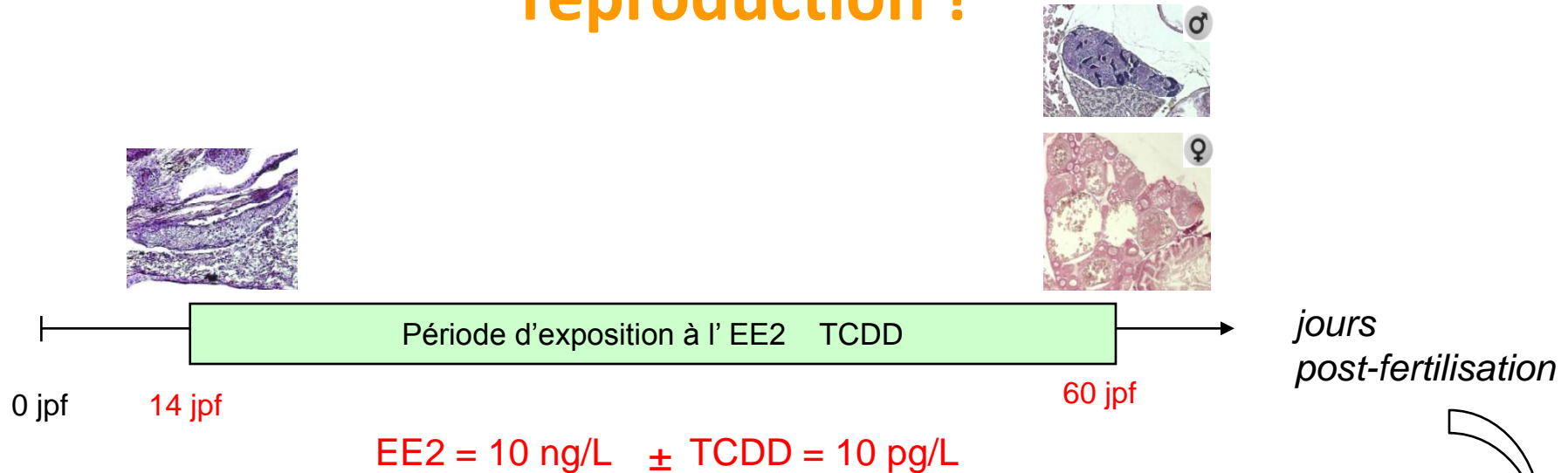
Interférence des agonistes AhR sur la signalisation œstrogénique

Conclusion 1.

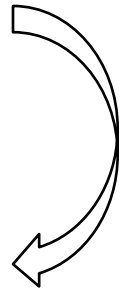
- ⊙ Les œstrogènes interfèrent négativement avec la voie AhR *in vitro* mais pas *in vivo* chez l'embryon de poisson zèbre.
- ⊙ Des ligands agonistes du récepteur Ah (TCDD, BaP, BNF) interfèrent négativement avec la signalisation œstrogénique *in vitro* et *in vivo*
- ⊙ Sensibilité de l'aromatase B aux œstrogènes et aux composés dioxines

Aromatase B = marqueur biologique des composés (anti)-oestrogénicité

Effets de l'interaction entre ligands ER et AhR à faibles concentrations sur la signalisation oestrogénique et la reproduction ?



cerveau	ARNm ER α , ER β 1, ER β 2 cyp19a1b	rtPCR	Menuet et al., 2002,2004
foie	Concentrations en vitellogénine	Zf-Vtg ELISA	Brion et al., 2002, 2004
Gonades	Histologie des gonades Sex-ratio		



Effets de l'interaction entre ligands ER et AhR à faibles concentrations sur la signalisation oestrogénique et la reproduction ?

Cibles	EE2 10 ng/L	TCDD 10 pg/L	EE2 10 ng/L + TCDD 10 pg/L
ERa ERb1 ERb2	=	=	=
cyp19a1b	+++	=	+
vitellogénine	+++	=	++++
Developpement gonadique	Arrêt/retard du développement gonadique	Pas d'effet	Arrêt/retard du développement gonadique

- ⊙ Perturbations de l'expression de gènes cibles impliqués dans la signalisation œstrogénique dans le système nerveux central par l'EE2, seul ou associé à la TCDD.

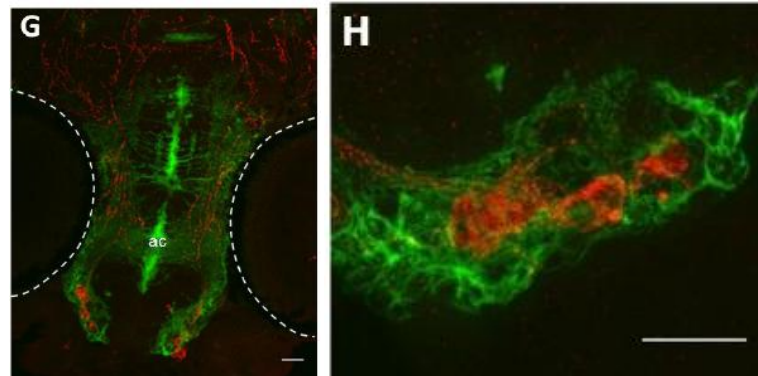
CONCLUSIONS et PERSPECTIVES

- ⊙ Tests *in vitro* et *in vivo* pour étudier les effets et les interactions de ligands agonistes des récepteurs ER et Ah
- ⊙ Concentrations faibles en EE2 et TCDD
- ⊙ Interactions complexes qui sont dépendantes du contexte cellulaires et tissulaires.
 - ⊙ Comment appréhender les mélanges de substances ayant des modes d'actions différents dans l'évaluation des dangers et des risques?
- ⊙ L'exposition précoce de poissons à des ligands des ER et de AhR, seul ou en combinaison, interfère avec l'expression de gènes cibles impliqués dans la signalisation œstrogénique (ER α , cyp19a1b)

CONCLUSIONS et PERSPECTIVES

- ⊙ Besoin d'étudier les effets des perturbateurs endocriniens au niveau central.
- ⊙ **ANR NEED** (CES 2008-2011): Neuro-Endocrine Effect of Endocrine Disruptors.
- ⊙ **Projet NEMO** (Post-Grenelle): New *in vitro* and *in vivo* methods to study endocrine disrupting chemicals in zebrafish.

Aro-GFP et **neurones GnRH**
chez l'embryon de
poisson zèbre



Vosges et al., soumis



REMERCIEMENTS



**Nathalie HINFRAY, Sélim AÏT-AÏSSA,
Damien BAUDIFFIER, Benjamin PICCINI**

INERIS, Direction des Risques Chroniques, Unité d'écotoxicologie,
Verneuil-en-Halatte

Olivier KAH, Farzad PAKDEL

Laboratoire d'Endocrinologie Moléculaire de la Reproduction
UMR CNRS 6026 - Université de Rennes 1

Gilles MONOD

Station Commune de Recherches en Ichtyophysiologie,
Biodiversité et Environnement – SCRIBE, INRA, Rennes

INERIS



⊙ **1st International Symposium on
Neuroendocrine Effects of Endocrine
Disruptors, 10-11 Juillet, ROUEN**

⊙ **<http://www.needimpact.eu>**