Les progestatifs, les poissons et les milieux aquatiques : apports du projet ANR " proofs "

François Brion, Clémentine Garoche, Nathalie Hinfray, Selim Ait-Aissa

LES PROGESTATIFS, LES POISSONS ET LES MILIEUX AQUATIQUES : APPORTS DU PROJET ANR « PROOFS »

Contributeurs
François BRION,
Clémentine GAROCHE,
Nathalie HINFRAY,
Sélim AÏT-AÏSSA

Durant ces vingt dernières années, la question des effets des perturbateurs endocriniens (PE) sur des fonctions physiologiques clés telles que la reproduction a fait l'objet de nombreux travaux en raison des risques encourus pour les organismes et les milieux aquatiques. À cet égard, de nombreux travaux ont porté sur les risques associés aux composés oestrogéniques et, en particulier, les œstrogènes utilisés dans les pilules contraceptives [1 ; 2]. Pourtant, la présence d'autres pharmaceutiques stéroïdiens dans les milieux aquatiques est aujourd'hui avérée sans que l'on puisse en appréhender les conséquences. Parmi ces stéroïdes, les progestatifs de synthèse représentent un ensemble de substances largement utilisées en médecine humaine et vétérinaire. Certains progestatifs ont pu être quantifiés dans des effluents de stations d'épuration et des eaux de surface, à des concentrations faibles (ng/L-µg/L) mais capables d'affecter la reproduction des poissons exposés en laboratoire. Cependant, il existe un manque d'information sur les mécanismes, les effets et l'exposition des organismes aux progestatifs qu'il est nécessaire de combler dans l'optique d'évaluer les dangers et les risques que ces substances soulèvent pour les espèces aquatiques et l'environnement.

OBJECTIFS ET MÉTHODE

C'est dans ce contexte qu'un programme interdisciplinaire coordonné par l'Ineris impliquant différentes équipes de recherches nationales a été mené. Le projet ANR « PROOFS » (Occurrence and effects of environmental ligands of the progesterone receptor on fish reproduction and neuro-development) visait à acquérir des informations nouvelles sur les modes d'actions et les effets potentiels de progestatifs dans l'environnement sur le neuro-développement et la reproduction des poissons. Il visait également à renseigner des activités progestatives d'échantillons environnementaux et à identifier les composés responsables de ces activités biologiques. Pour ce faire, la stratégie utilisée a reposé sur un panel de bio-essais de type gène-rapporteur *in vitro* et *in vivo* permettant d'évaluer la capacité des substances à interagir avec des voies de signalisation médiées par les récepteurs nucléaires stéroïdiens et à déréguler l'expression de gènes cibles dans différents tissus de l'embryon de poisson zèbre (figure 1).

Cette stratégie a été appliquée à un ensemble de 26 progestatifs et a permis d'acquérir des informations nouvelles sur l'interaction de ces molécules avec le récepteur de la progestérone de poisson zèbre en démontrant notamment que la majorité de ces composés se comportent comme des antagonistes du récepteur PR de poisson zèbre contrairement au récepteur humain. En outre, l'Ineris a démontré la multiplicité d'actions des progestatifs qui sont capables d'interférer avec différents récepteurs nucléaires tels que les récepteurs des androgènes, des œstrogènes et des glucocorticoïdes (figure 2). À l'échelle de l'organisme, ces mécanismes d'actions moléculaires se traduisent par des dérégulations précoces de l'expression tissu-spécifique de gènes impliqués dans la biosynthèse des neuro-stéroïdes (induction du gène de l'aromatase cérébrale) et des corticostéroïdes (inhibition du

Figure 1 /
Stratégie développée pour renseigner des mécanismes et des effets PE d'un ensemble de progestatifs pharmaceutiques. Ces outils ont été combinés à de l'analyse chimique pour quantifier des activités progestagéniques dans les échantillons et identifier des substances chimiques.

Figure 2 /
Les progestatifs de synthèse se caractérisent par des profils toxicologiques complexes en raison de leurs capacités à interagir en tant qu'agoniste ou antagoniste de différents récepteurs nucléaires stéroïdiens chez le poisson zèbre.

gène de la 11 β-hydroxylase dans les cellules interrénales) **(figure 3) [3; 4]**. Une investigation plus poussée a permis de mettre en évidence que ces altérations s'accompagnent de modifications de la survie et/ou la prolifération neuronale ainsi que de la capacité des embryons à synthétiser du cortisol et à répondre à des stress. L'approche permet d'apporter des informations originales sur les dangers de ces molécules sur le système endocrinien d'un vertébré modèle. L'originalité de ce projet réside aussi dans l'utilisation intégrée d'outils *in vitro* et d'analyses chimiques au sein d'une démarche EDA *(Effect Directed Analysis)*. Elle a permis de mettre en évidence, pour la première fois, des activités biologiques progestagéniques au sein de matrices environnementales (eaux usées, eaux de surface) en révélant des activités spécifiques des poissons et d'identifier des substances pharmaceutiques potentiellement impliquées dans ces réponses biologiques dont un métabolite dérivé d'un progestatif de synthèse.

CONCLUSION

Ce travail a permis l'acquisition d'un ensemble de données et de connaissances originales sur les dangers des progestatifs de synthèse sur le système endocrinien des poissons ainsi que sur l'occurrence environnementale d'activités biologiques associées à des ligands du récepteur de la progestérone. Ce projet souligne l'intérêt des stratégies combinant modèles *in vitro* et *in vivo* spécifiques du poisson que ce soit pour caractériser le potentiel perturbateur endocrinien des substances seules ou les matrices environnementales. À la lumière de ces travaux, il semble nécessaire de poursuivre des actions de recherche sur ces polluants aquatiques émergents afin d'en évaluer les risques pour les milieux aquatiques et adopter des actions de gestion adéquates.

Références

[1] Brion, F.; Tyler, C. R.; Palazzi, X.; Laillet, B.; Porcher, J. M.; Garric, J. and Flammarion, P. (2004). Impacts of 17ß 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.*

[2] Vosges, M.; Le Page, Y.; Chung, B.-C.; Combarnous, Y.; Porcher, J.-M.; Kah, O. and Brion, F. (2010). 17α-ethinylestradiol disrupts the ontogeny of the forebrain GnRH system and the expression of brain aromatase during early development of zebrafish. *Aquat Toxicol 99(4): 479-491.*

[3] Cano-Nicolau, J.; Garoche, C.; Hinfray, N.; Pellegrini, E.; Boujrad, N.; Pakdel, F.; Kah, O.; Brion, F. (2016) Several synthetic progestins disrupt the glial cell specific-brain aromatase expression in developing zebra fish. *Toxicol Appl Pharmacol.* 15;305:12-21.

[4] Hinfray, N.; Tebby, C.; Garoche, C.; Piccini, B.; Bourgine, G.; Aït-Aïssa, S.; Kah, O.; Pakdel, F.; Brion, F. (2016). Additive effects of levonorgestrel and ethinylestradiol on brain aromatase (cyp19a1b) in zebrafish specific *in vitro* and *in vivo* bioassays. *Toxicol Appl Pharmacol. 15;307:108-14.*

ABSTRACT /

During the past twenty years, numerous studies have examined the effects of estrogenic compounds, notably 17α-ethinylestradiol a potent synthetic steroidal estrogen used as pharmaceuticals in contraceptive pills, because these substances were among the first identified as endocrine disrupting compounds responsible for the feminization of wild populations of fish observed worldwide. There is now evidence of the occurrence of other natural and synthetic steroids in aquatic environment. Among steroidal pharmaceuticals, the risks encountered by synthetic progestins on aquatic species have been recently pointed out but data on their occurrence and effects on fish endocrinology and physiology are missing to properly assess their hazard and risk to aquatic species. The national project ANR "PROOFS" aimed at investigating the effect of progestins on key molecular and cellular targets of the endocrine system using zebrafish in vitro and in vivo reporter gene mechanism-based assays. It also aimed at providing data on the occurrence of progestagenic activity of environmental samples and to identify substances responsible for these activities through an effect-directed analysis (EDA) approach. Among the 26 pharmaceutical progestins investigated, our data revealed that they can act on several steroidal nuclear receptors. By using novel transgenic zebrafish models, we demonstrated for the first time their estrogenic activity in the developing brain and their capacity to disrupt corticosteroigenesis in interrenal cells. Finally, we reported strong progestagenic activity in waste waters and identified several pharmaceuticals as potential candidate responsible for these activities. Overall, the ANR project "PROOFS" brings novel and relevant data on occurrence and endocrine potency of progestins stressing the need to further study these emerging contaminants.

Figure 3 /
Les progestatifs de synthèse sont capables d'altérer l'expression de différents gènes cibles dans le cerveau (aromatase cérébrale) et les cellules interénales (11β-hydroxylase) et altérer des processus clés du développement (neurogenèse) et le comportement.