Caractérisation des régulations de la stéroïdogenèse au cours de la différenciation sexuelle de la gonade chez le poisson zèbre (*Danio rerio*) à des fins d'études écotoxicologiques

Morgane CAULIER – morgane.caulier@rennes.inra.fr

Directeur de thèse : Patrick KESTEMONT – Facultés Universitaires Notre-Dame de la paix – NAMUR (Belgique) – Patrick.kestemont@fundp.ac.be
Thèse suivie à l'INERIS par Nathalie HINFRAY– DRC / VIVA / ECOT - Thèse suivie à l'INRA par Yann Guiguen – Laboratoire LPGP – équipe différenciation sexuelle et ovogenèse (INRA Rennes)

Contexte

Depuis les années 1970, un nombre en constante augmentation de travaux se sont intéressés aux effets des perturbateurs endocriniens (PE) suite aux dangers qu'ils peuvent représenter pour l'homme mais également pour les écosystèmes. Par définition, un PE est un composé pouvant causer des effets néfastes sur la santé d'un organisme ou de sa descendance suite à des changements dans la fonction endocrine. A ce jour, un nombre important de recherches s'est intéressé aux perturbations de la fonction de reproduction, qui est un processus couramment influencé par les PE. Le développement de tests permettant d'identifier les substances PE et de quantifier leurs effets sur les poissons est donc devenu un enjeu important ces dernières années notamment dans la perspective de REACH.

Dans le but de mettre en évidence le potentiel PE d'un composé donné, un test intitulé « Fish Sexual Development Test » (FSDT), qui est une extension de la ligne directrice OCDE TG 210 intitulée « Fish Early Life Stage Toxicity Test », a été proposé à l'OCDE comme ligne directrice pour la détection des composés PE affectant le processus de différenciation des gonades chez les poissons. Ce test est réalisé par exposition d'œufs fertilisés de différentes espèces de poissons à cycle de vie court et continu (poissons zèbres, medaka, vairons à tête de boule) jusqu'à la fin de la période de différenciation sexuelle (60 jours post fertilisation (jpf) pour le poisson zèbre). A l'issue de l'exposition, une analyse de l'histologie des gonades et des modifications du sexe-ratio qui en découlent est réalisée.

Chez le poisson zèbre, peu de choses sont connues concernant la différenciation sexuelle de ses gonades : les individus passent par un stade ovarien précoce et, environ 30 jours après fécondation, chez certains individus, les ovaires évolueront en testicules tandis que chez le reste de la population, ils continueront leur développement en ovaires matures. Ce processus est sous contrôle des différents acteurs dont une régulation par les hormones stéroïdiennes qui n'a été que peu étudiée chez ce poisson modèle, créant un manque de connaissances basiques sur le sujet et rendant difficile la détermination des mécanismes d'action des PE sur ce processus physiologique.

Objectifs

L'objectif de cette thèse est la caractérisation de la stéroïdogenèse au cours de la différenciation sexuelle de la gonade du poisson zèbre, en conditions normales dans un premier temps et en conditions perturbées ensuite. Cette caractérisation se fait à la fois par une localisation des cellules stéroïdogènes, l'étude de l'expression temporelle de différents gènes et régulateurs de la stéroïdogenèse ainsi qu'une mise en évidence d'une différenciation moléculaire de la gonade avant que toute différenciation histologique ne soit observée. Les résultats obtenus en conditions normales de développement seront utilisés lors d'expositions à des substances PE modèles couramment retrouvées dans l'environnement aquatique. Dans ce contexte, l'utilisation de lignées de poissons zèbres transgéniques expriment la GFP sous contrôle de promoteurs de gènes connus pour être sensibles à une exposition à des PE peut s'avérer être un outil intéressant pour l'analyse des effets de substances chimiques.

Méthodes

Pour caractériser la stéroïdogenèse au cours de la différenciation gonadique du poisson zèbre, différents outils ont été utilisés. Grâce à la technique d'Hybridation *in toto* (HIT) à différents stades de développement (20, 30, 40 et 60 jours post fécondation (jpf)), l'expression spatio-temporelle de gènes et de régulateurs de la stéroïdogenèse connus pour intervenir dans le processus de différenciation sexuelle chez le poisson zèbre a été étudiée. Ces gènes incluent des gènes impliqués dans le contrôle transcriptionnel d'enzymes de la stéroïdogenèse tels que *sf1, foxl2, fsta et fstb, dax1*, des enzymes de la stéroïdogenèse (*cyp11a1, cyp17, cyp19a1a, cyp11c1, hsd3b*) ainsi

qu'un régulateur clé du transport du cholestérol dans la mitochondrie (*Star*). Ces résultats ont été complétés par la localisation spatio-temporelle de 5 protéines, CYP11C1, CYP19A1A, CYP19A1B, CYP17A ET FOXL2, à 15, 20, 30, 40 et 60jpf par immunohistochimie (IHC).

Parallèlement, le développement de lignée de poissons zèbres transgéniques s'est avérée être approche utile pour étudier le processus de différenciation de la gonade chez cette espèce modèle ainsi que d'étudier les effets de PE sur ce processus. Ces lignées en cours de caractérisation expriment la GFP sous le contrôle des promoteurs de 3 gènes candidats : cyp17a, cyp19a1a et cyp11c1. Ces trois gènes ont été pressentis comme pouvant être des rapporteurs à la fois d'une exposition pure à des xénobiotiques, ces gènes étant connus pour être sensibles à des expositions à des perturbateurs endocriniens, mais également comme étant des rapporteurs potentiels du sexe chez le poisson zèbre. Leur utilisation permet notamment l'étude plus rapide et plus facile de ces trois gènes d'intérêt (étude de leur expression, de leurs interactions, du lignage cellulaire,…) et de leur perturbation.

Résultats et discussions

Les HIT réalisées dans les gonades de poissons mâles et femelles âgés de 60jpf ont permis la localisation des cellules stéroïdogènes. Les gènes cibles sont exprimés dans les cellules de Leydig du testicule (*cyp17a, cyp11c1, star*) et dans le cytoplasme des ovocytes et/ou des cellules interstitielles de l'ovaire (*cyp17a, cyp11a1, star, fstb*). Cette localisation a été confirmée par IHC pour les protéines CYP11C1, CYP17A, FOXl2A et CYP19A1A. La protéine CYP19A1A a également été localisée dans les cellules folliculaires des ovocytes.

A 20 et 30 jpf, pour lesquels l'identification précise du sexe des poissons n'est pas possible, les marquages en HIT n'ont été observés que dans certaines gonades suggérant une possible différence males/femelles. A 40 et 60 jpf, le gène cyp11c1 est plus fortement exprimé dans les gonades mâles tandis que cyp17a1 et star sont exprimées dans les gonades mâles et femelles. Les résultats obtenus par IHC, qui nécessite encore d'être confirmés, ne montrent pas une différence aussi nette entre les gonades mâles et femelles. Toutefois, ils nous permettent de mettre en évidence que de façon précoce (15jpf), seuls CYP19A1A et FOXL2A sont exprimés, CYP11B2 n'étant exprimé qu'à partir de 20jpf et CYP17A à 30dpf dans une partie des gonades.

Enfin, la caractérisation de la lignée transgénique exprimant la GFP sous contrôle du promoteur de Cyp19a1a confirme les résultats obtenus par Hit et IHC. En effet, l'étude de la fluorescence de la GFP et sa localisation par IHC confirme son expression au sein de cellules folliculaires et le cytoplasme des ovocytes comme attendu.

Conclusions et Perspectives

Les résultats obtenus ont permis de localiser, grâce à différentes approches (HIT, IHC, lignées transgéniques) les sites d'expressions d'enzymes importantes de la stéroïdogenèse (*star, cyp17a1* et *cyp11b2*) dans les gonades males et femelles chez le poisson zèbre à différents stades de développement. Ils montrent que certains gènes impliqués dans la stéroidogenèse sont différemment exprimés dans les gonades mâles et femelles durant le développement précoce. La caractérisation des lignées poissons zèbres transgéniques nous permettra de déterminer dans quelle mesure ces outils permettront d'obtenir des informations sur la stéroidogenèse et d'étudier les effets des PE.

Communications

Caulier M., Hinfray N., Brion F., Guiguen Y. Caractérisations des régulations de la stéroïdogenèse au cours de la différenciation de la gonade chez le poisson zèbre (Danio rerio) à des fins d'études écotoxicologiques. Journée des doctorants de l'INERIS, Verneuil-en-Halatte, juin 2011 [poster].

Caulier M., Guérin A., Cauty C., Hinfray N., Brion F., Guiguen Y. Gonadal expression patterns of steroidogenesis-related genes during sex differentiation in zebrafish. 9th annual meeting of the International symposium on reproductive physiology of fish, Cochin, août 2011 [poster].

Caulier M., Hinfray N., Guérin A., Chadili E., Brion F., Guiguen Y. Caractérisation d'une implication de la stéroïdogenèse dans le processus de différenciation sexuelle de la gonade chez le poisson zèbre (Danio rerio) à des fins d'études écotoxicologiques. Colloque national du réseau ANTIOPES, Avignon, mars 2012 [poster].

Mots clés : poisson zèbre, différenciation sexuelle, stéroidogenèse, perturbateurs endocriniens