Evaluation des effets de la contamination androgénique des milieux aquatiques chez le poisson

Mélanie VILLERET – *melanie.villeret@ineris.fr*

Directeur de thèse : Christophe MINIER – Université du Havre
Thèse suivie à l'INERIS par Jean-Marc PORCHER et Wilfried SANCHEZ, Direction des risques chroniques / Dangers et impacts sur le vivant / Unité Ecotoxicologie *in vitro* et *in vivo*

Les perturbateurs endocriniens (PE) sont définis comme étant « une substance ou un mélange exogène altérant les fonctions du système endocrinien et induisant des effets nocifs sur la santé d'un organisme intact, de ses descendants ou (sous-) populations » (OMS, 2002). Leurs effets chez le poisson, à différents niveaux d'organisation biologique, sont largement documenté (induction de caractères sexuels secondaires, intersexualité, perturbation de la reproduction, déclin piscicole). Face à de tels constats, il est important de disposer de méthodes appropriées pour tester et interpréter les données permettant d'évaluer pour les organismes les risques de l'exposition à ces substances présentes dans l'environnement.
Au cours des 15 dernières années, un important effort de recherche a été fourni par la communauté scientifique sur la thématique des perturbateurs endocriniens et ainsi de nombreuses données de laboratoire mais également de terrain sont disponibles concernant les œstrogènes. Cependant les données relatives aux androgènes sont plus fragmentaires. Il n'en demeure pas moins que ces derniers sont aussi une préoccupation environnementale puisqu'il a été mis en évidence la présence de composés capables d'interagir avec le récepteur des androgènes dans différents rejets et matrices environnementales comme les effluents d'usines de pâte à papier et les cours d'eau adjacents, ou encore les effluents de stations d'épuration. Au regard des données disponibles, il apparaît important de développer des outils permettant l'étude de la contamination par les androgènes et les anti-androgènes et de ses effets, mais également d'accroître les connaissances mécanistiques autour de cette famille de perturbateurs endocriniens.
Le chabot (*Cottus sp*) est une espèce chez laquelle il a été rapporté un dimorphisme sexuel important au niveau du tissu rénal au cours de la période de reproduction. Ce dimorphisme est imputable à une modification du rein des poissons mâles associée à une hypertrophie des canaux néphrétiques et à la sécrétion de syaloglycoprotéines. Ainsi, cette espèce est susceptible de disposer de biomarqueurs d'androgénicité. De plus, son utilisation dans un contexte de biosurveillance s'avère pertinente.
L'objectif de cette thèse est donc de développer et de valider un biomarqueur d'androgénicité chez le chabot. L'atteinte de cet objectif passe par :

- L'identification d'un marqueur sous contrôle androgénique et développer une méthode de dosage spécifique.
- La caractérisation de la réponse de ce biomarqueur en conditions contrôlées et sur le terrain.

Afin de vérifier si nous observions également les changements histologiques précédemment décrits dans la littérature, des chabots sauvages ont été prélevés par pêche électrique dans une rivière française en période de reproduction et hors période de reproduction. A leur sortie de l'eau, les poissons ont été sacrifiés, mesurés, pesés et sexés. Les reins et les gonades ont été prélevés, pesés et ont ensuite subi un traitement histologique. Ainsi, l'observation des coupes de gonades et de reins au microscope a permis de confirmer le sexe du poisson, de vérifier son statut de reproduction et de confirmer l'hypertrophie rénale chez le mâle en période de reproduction. L'analyse des coupes histologiques de rein réalisée avec un microscope à contraste de phase équipé d'une caméra a permis de quantifier l'hypertrophie observée grâce au calcul de l'épaisseur de l'épithélium rénal (KEH) selon la méthode décrite chez l'épinoche.
Les valeurs de KEH des chabots prélevés sur le terrain en période de reproduction diffèrent avec le sexe du poisson. Pour les mâles on obtient une valeur moyenne de KEH de 20,96 ± 3,57 µm alors que chez les femelles cette même valeur est de 16,96 ± 1,28 µm ce qui correspond à un facteur d'induction de 1,3.

Dans un second temps, dans le but de vérifier si l'hypertrophie des canaux néphrétiques et la synthèse de syaloglycoprotéines pouvait être inductible spécifiquement par les androgènes chez le chabot, des chabots provenant du terrain hors période de reproduction et mis à dépurer au laboratoire pendant environ deux mois ont ainsi été exposés par balnation à différentes concentrations de molécules androgéniques de référence (Trenbolone acétate (TBA), 11-

Kétotestostérone (11-KT), Spironolactone (Sp), Dihydrotestostérone (DHT)) ou non androgéniques (Ethinyl-oestradiol (EE2), Cadmium (Cd), Fénitrothion (Fn)) dissoutes dans du dimethylsulfoxyde (0.001 % de DMSO par aquarium) ou seulement à du solvant pour les témoins. Au cours des expositions, ils sont placés dans des aquariums contenant 4L d'eau à raison de 10 chabots (sexes confondus) par aquarium. L'eau est renouvelée tous les jours et les poissons sont nourris tous les deux jours avec des chironomes congelés. Au terme des expositions, les poissons subissent le même traitement que sur le terrain. De plus, l'exposition à la TBA a été réalisée en parallèle chez des épinoches provenant des mésocosmes de l'INERIS afin de comparer les réponses obtenues chez les deux espèces.

L'exposition de chabots adultes mâles et femelles hors reproduction pendant 14 ou 21 jours à 0, 0,5 et 5 µg/L de TBA montre qu'une hypertrophie rénale est induite de manière dose dépendante. Respectivement à 14 et 21 jours on observe des valeurs de KEH de14,58 ± 0,5 µm et 12,65 ± 1,03 µm pour les témoins qui correspondent aux valeurs des individus hors reproduction en conditions naturelles, 16,89 ± 0 ,81 µm et 17,73 ± 0,52 µm pour les chabots traités à 0,5 µg/L et 21,01 ± 1,76 µm et 19,33 ± 1,03 µm pour les chabots traités à 5 µg/L, ce qui correspond aux valeurs des individus mâles en reproduction en conditions naturelles. Ainsi le facteur d'induction maximal est obtenu à 5 µg/L pendant 21 jours ; il est de 1,5.

Lorsque les résultats obtenus pour les chabots et ceux obtenus pour les épinoches sont comparés, il est observé que l'épinoche est plus sensible en terme d'inductibilité avec un facteur d'induction maximal obtenu à 5 µg/L pendant 21 jours (d'une valeur de 2,1).

Les autres expositions de chabots adultes mâles et femelles hors reproduction pendant 14 ou 21 jours à 0, 1 et 10 µg/L de 11-KT ou de Cd, à 0,5, 5 et 50 µg/L de Sp ou de DHT et à 0,05 et 0,5 µg/L d'EE2 montrent qu'une hypertrophie rénale est induite à la plus forte concentration utilisée de 11-KT et de DHT avec des facteurs d'inductions respectifs de 1,2 et 1,3. Lors de ces expositions, l'EE2, la Sp, le Cd et le Fn n'ont pour leur part pas été capable de provoquer une hypertrophie rénale aux concentrations utilisées.

Ainsi, les changements histologiques précédemment décrits se sont vérifiés lors de nos observations sur le terrain. La mesure de l'épaisseur de l'épithélium rénal (KEH) qui nous a permis de quantifier ce phénomène chez des chabots sauvages prélevés dans une rivière française, nous a également renseigné sur l'inductibilité de ce phénomène grâce à des expositions menées en laboratoire.

Si la réponse est apparue comme spécifiquement androgéno-régulée, il a également été mis en évidence son manque de sensibilité puisque seules des concentrations élevées et non environnementales de substances androgéniques induisent une hypertrophie. De plus, cette dernière est moins importante que celle qui est observée au cours de la période de reproduction et de celle des épinoches.

C'est pourquoi, afin de développer un biomarqueur biochimique plus sensible, une approche protéomique a été réalisée en collaboration avec l'UBO de Brest afin d'identifier et caractériser la ou les syaloglycoprotéines rénales induites par les androgènes. Des électrophorèses en deux dimensions ont ainsi été réalisées sur des échantillons rénaux de chabots traités à la TBA à 5 µg/L et 50µg/L et de chabots témoins. Les gels ont alors été colorés au bleu de Coomassie et les profils d'expression protéique ont été comparés en utilisant un logiciel d'analyse d'image. Les spots qui différaient entre les gels ont alors été carottés et analysés au spectromètre de masse.

Jusqu'à présent, 6 protéines sur les 9 spottées dans le gel à 5 µg/L de TBA et 18 protéines sur les 32 spottées dans le gel à 50 µg/L de TBA ont été identifiées en utilisant la spectrométrie de masse. Toutes les protéines identifiées sont apparues comme étant ubiquistes.

Les premiers résultats obtenus pour les gels-2D semblent également aller dans le sens d'une androgénorégulation. L'analyse des profils d'expression protéique n'a pas permis de mettre en évidence la ou les protéine(s) d'intérêt.

Ce travail a mis en évidence un signal androgéno-régulé dans le rein des chabots. Cependant, l'hypertrophie rénale est apparue peu sensible et la methode KEH chronophage. L'identification des proteines associées pourrait fournir un biomarqueur biochimique plus sensible. A ce titre plusieurs proteines restent à identifier.

Mots clés : Ecotoxicologie, poisson, biomarqueurs, perturbateurs endocriniens, androgènes

Remerciements : Cette thèse est financée par le MEDDTL et la FEEDER (INhTERREG IV-A-DIESE)