



Rik Eggen, biologiste moléculaire, a dirigé le département de Toxicologie de l'environnement avant de prendre les fonctions de directeur adjoint de l'Eawag qu'il assume aujourd'hui.
Coauteurs: Evangelina Kallivretaki, Helmut Segner (Université de Berne).

Rôle des œstrogènes dans l'organogénèse

L'enzyme clé de la biosynthèse des œstrogènes est la cytochrome P450 aromatase. Elle en catalyse en effet la réaction décisive de transformation des androgènes en œstrogènes et contrôle donc le taux d'œstrogènes dans l'organisme. A partir de l'exemple du poisson zèbre, nous avons cherché à savoir si l'aromatase joue un rôle régulateur dans la formation des organes sexuels et de la ligne latérale.

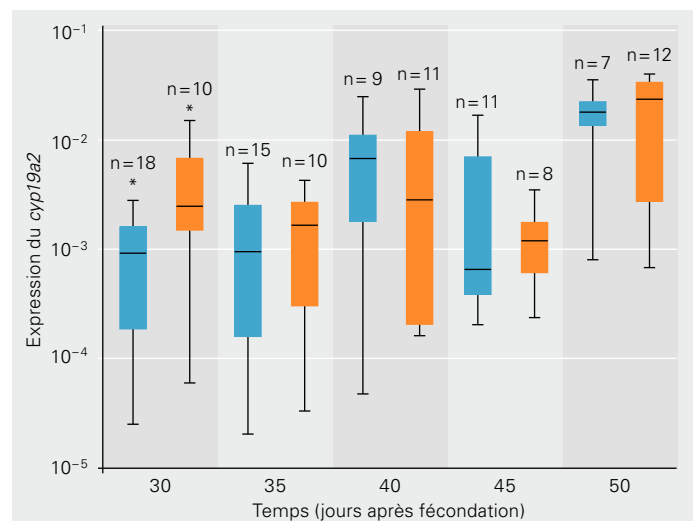
Les œstrogènes sont des hormones stéroïdes présentes chez tous les vertébrés aquatiques et terrestres [1]. Alors que l'organisme comporte naturellement plusieurs types d'œstrogènes, c'est au 17β -œstradiol que sont attribuables la quasi-totalité des implications biologiques de cette famille de substances. Ainsi, les œstrogènes interviennent notamment dans le contrôle de la différenciation et maturation sexuelles ainsi que dans celui de la reproduction. Mais ils exercent aussi de multiples fonctions régulatrices dans le développement et la différenciation d'autres organes comme, par exemple, au niveau du système nerveux. Pour qu'ils puissent assurer correctement cette multitude de fonctions, leurs niveaux doivent être finement régulés, équilibrés et ajustés tout au long des différentes phases de la vie.

Les œstrogènes se forment à partir du cholestérol au terme d'une série complexe de transformations. Si divers enzymes interviennent dans ce processus biosynthétique, c'est la dernière étape, catalysée par la cytochrome P450 aromatase, au cours de laquelle les androgènes sont transformés en œstrogènes qui détermine finalement leur taux dans l'organisme [2]. Chez le poisson zèbre, deux gènes codent pour cette protéine, le gène *cyp19a1* d'expression majoritairement ovarienne et le gène *cyp19a2* principalement exprimé dans le cerveau. Ces deux gènes constituent une cible potentielle pour toute une série de polluants qui interfèrent de cette manière dans les processus œstrogéno-régulés et exercent alors une activité endocrinienne indirecte. En nous servant du poisson zèbre comme modèle animal, nous avons étudié le rôle de l'aromatase – et par là même des œstrogènes – dans le développement des organes sexuels et de la ligne latérale, organe mécanosensoriel spécifique des poissons [3].

La différenciation sexuelle des gonades est-elle déterminée par *cyp19a2*? Le poisson zèbre est un gonochoriste indifférencié, c'est-à-dire qu'il naît femelle et dispose tout d'abord d'ovaires juvéniles non fonctionnels qui au cours de la maturation se transforment en gonades mâles ou femelles. Au début de notre étude, l'hypothèse la plus répandue était que la différenciation sexuelle des gonades dépendait de la concentration et de la distribution de l'aromatase exprimé dans le cerveau. Elle stipulait donc que plus la fréquence de lecture du gène *cyp19a2* était élevée, plus la te-

neur des cellules cérébrales en aromatase était forte et donc plus le taux d'œstrogènes était élevé, ce qui conduisait à la formation de gonades femelles. Selon le même raisonnement, de faibles taux d'œstrogènes induisaient inversement la formation de gonades mâles. Nous avons cherché à vérifier le bien-fondé de cette théorie en étudiant des poissons zèbres se trouvant en phase de différenciation gonadique, soit entre le 30^{ième} et le 50^{ième} jour après fécondation. Nous avons prélevé les têtes pour quantifier l'expression de l'aromatase cérébrale à partir de la quantité de transcrits formés (ARNm) et pour caractériser la distribution de l'enzyme dans le cerveau. Les corps ont quant à eux été utilisés pour déterminer le statut sexuel des poissons. Ceux dont les gonades présentaient des parties testiculaires ou qui possédaient déjà des testicules pleinement développés ont été classés parmi

Fig. 1: Expression du gène *cyp19a2* dans le cerveau de jeunes poissons zèbres mâles (barres bleues) et femelles (barres orange). Les limites inférieures et supérieures des barres correspondent respectivement aux quantités minimales et maximales d'ARNm dosées, la ligne tracée à l'intérieur indiquant la moyenne (\pm écart-type). n = nombre de poissons dans chaque groupe d'appartenance sexuelle. * = différence significative de quantité d'ARNm entre les deux sexes au 30^{ième} jour après fécondation ($p < 0,012$).



les mâles tandis que ceux disposant encore d'ovaires immatures étaient classés parmi les femelles. Jusqu'au 50^{ième} jour après fécondation environ, les gonades femelles juvéniles conservent la faculté de se transformer en testicules. Ce n'est qu'une fois la maturation des ovocytes amorcée que le sexe des poissons peut être déterminé avec certitude.

L'expression de *cyp19a2* est indépendante du sexe des poissons.

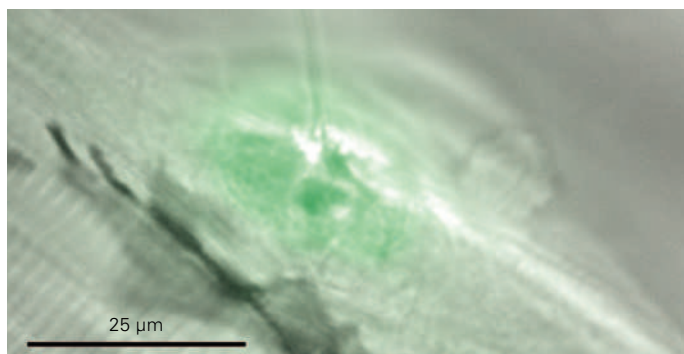
Nous avons observé la présence de transcrits de l'aromatase dans la tête des poissons zèbres durant toute la durée de l'étude, leur teneur tendant à augmenter avec le temps. Cependant, tandis que les concentrations d'ARNm présentaient une disparité particulièrement importante au sein d'un même groupe sexuel, aucune corrélation entre les quantités de transcrits de l'aromatase et le sexe des poissons n'a été constatée (Fig. 1). Le gène *cyp19a2* est donc transcrit en continu tout au long de la différenciation sexuelle et son expression est indépendante du sexe des individus. Des observations similaires ont été faites avec les teneurs en protéines (résultats non illustrés). En outre, la répartition de l'aromatase dans les tissus cérébraux des poissons en développement était sensiblement la même chez les deux sexes. Selon le schéma déjà observé chez les poissons adultes, l'enzyme est principalement localisé dans certaines zones du cerveau (télencéphale et diencéphale) et dans l'hypophyse.

Nos résultats indiquent que, contrairement à l'idée première, la différenciation sexuelle du poisson zèbre n'est pas uniquement régulée par l'expression du gène *cyp19a2* et par le taux d'œstrogènes dans l'organisme. Ce processus paraît autrement plus complexe et semble nécessiter l'intervention minutieusement coordonnée de plusieurs gènes et probablement de divers autres facteurs. Partant de cette constatation, nous allons approfondir nos recherches sur le processus de différenciation sexuelle dans le cadre d'un projet financé par le Fonds national suisse.

Le développement de la ligne latérale est-il influencé par *cyp19a1*?

Les œstrogènes n'interviennent pas uniquement au niveau de la différenciation sexuelle mais jouent également un rôle important dans le développement des organes sensoriels, ce qui a été notamment démontré chez les poissons. Notre observation

Cellules sensorielles ciliées d'un neuromaste. Superposition d'une image de microscopie optique et d'une photo prise au microscope à fluorescence après marquage des cellules ciliées avec un colorant fluorescent.



Mirjam Fröhlicher, Eawag

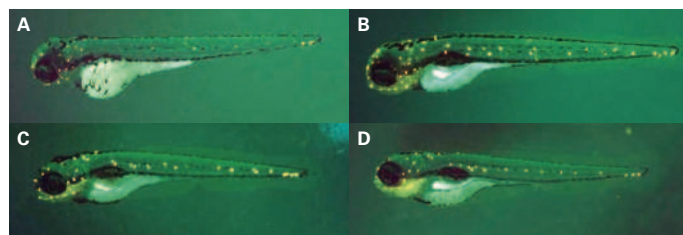


Fig. 2: Effet d'un morpholino «knock-down» sur le nombre de neuromastes dans la ligne latérale. A: embryon traité avec un morpholino anti-*cyp19a1*; B: embryon témoin non traité; C: embryon traité avec un morpholino témoin; D: embryon traité avec un morpholino anti-*cyp19a2*.

d'une expression du gène *cyp19a1* au niveau de la ligne latérale du poisson zèbre est en accord avec ces résultats. Cet organe mécanosensoriel est normalement visible sous la forme de faibles lignes autour des yeux et le long des flancs et permet aux poissons de localiser grâce aux variations de pression dans l'eau les mouvements se produisant dans leur environnement aqueux (voir aussi l'article de M. Fröhlicher, p. 18). Les récepteurs de la ligne latérale, appelés neuromastes, sont chacun constitués d'un groupe de cellules sensorielles, les cellules ciliées. Pour estimer si le gène *cyp19a1* est réellement impliqué dans le développement de la ligne latérale et de ses neuromastes, nous avons réprimé artificiellement son expression par la technique du « knock-down » (cf. encadré p. 18). Pour ce faire, des oligonucléotides antisens appelés morpholinos sont injectés dans des œufs de poissons zèbres dans lesquels ils viennent s'hybrider avec les transcrits du gène *cyp19a1*, bloquant donc la synthèse protéique et réprimant l'activité aromatasase dans les neuromastes.

Une répression de *cyp19a1* induit une réduction du nombre de neuromastes.

Notre essai a révélé que les poissons « knock-down » présentaient nettement moins de neuromastes que leurs homologues non traités (Fig. 2A+B). De même, le nombre de neuromastes demeurait inchangé dans les sujets traités avec un morpholino témoin (Fig. 2C) ou formulé pour s'hybrider avec les transcrits de *cyp19a2* (Fig. 2D). Nous en concluons que l'aromatase codée par *cyp19a1* est effectivement impliquée dans le développement de la ligne latérale, ce qui constitue un fait nouveau et tout à fait surprenant. Cette constatation signifie en effet que les perturbateurs endocriniens abondamment présents dans l'environnement aquatique sont non seulement en mesure d'interférer dans le système reproducteur mais peuvent également perturber bien d'autres processus organogénétiques dans l'organisme. ○ ○ ○

- [1] Lange I.G., Hartel A., Meyer H.H.D. (2003): Evolution of oestrogen functions in vertebrates. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 83, 219–226.
- [2] Cheshenko K., Pakdel F., Segner H., Kah O., Eggen R.I.L. (2008): Interference of endocrine disrupting chemicals with aromatase CYP19 expression or activity, and consequences for reproduction of teleost fish. *General and Comparative Endocrinology* 155, 31–62.
- [3] Kallivretaki E. (2006): Functional significance of aromatase in zebrafish during development. Dissertation, University of Bern, 156 pp.