

**ÉCOLE DOCTORALE : Santé, Sciences, Technologies**

**Équipes : Gonadotropines, INRA, Nouzilly**

**Evaluation des risques écotoxicologiques, INERIS, Verneuil-en-Halatte**

**THÈSE** présentée par :

**Mélanie VOSGES**

soutenue le : 15 décembre 2010

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université François - Rabelais**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la Vie

**Effets neuroendocrines des perturbateurs  
endocriniens chez le poisson zèbre (*Danio rerio*) :**

***Etude du système à GnRH***

**THÈSE dirigée par :**

**Mr Yves COMBARNOUS**

Directeur de recherche, CNRS, INRA, Nouzilly

**RAPPORTEURS :**

**Mr Vincent PREVOT**

**Mr Vance TRUDEAU**

Directeur de recherche, INSERM, Lille

Professeur, Université d'Ottawa, Canada

**JURY :**

**Mr François BRION**

**Mr Yves COMBARNOUS**

**Mme Sylvie DUFOUR**

**Mme Anne DUITTOZ**

**Mr Olivier KAH**

**Mr Vincent PREVOT**

**Mr Vance TRUDEAU**

Ingénieur de recherche, INERIS, Verneuil-en-Halatte

Directeur de recherche, CNRS, INRA, Nouzilly

Directrice de recherche, CNRS, Paris

Professeur, Université François Rabelais, Tours

Directeur de recherche, CNRS, Rennes

Directeur de recherche, INSERM, Lille

Professeur, Université d'Ottawa, Canada



*A mes grands-parents,  
...mes racines, ma diversité...*

## Remerciements

*Je tiens à remercier Mr Vance Trudeau et Mr Vincent Prévot d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail de thèse. Je souhaite remercier Mme Sylvie Dufour d'avoir accepté de juger ce travail en qualité d'examinateur. Merci également à Anne Duittoz d'avoir accepté de participer au jury de cette thèse et, au passage, merci pour votre investissement dans le Master Biologie de la reproduction qui m'a offert une formation solide et donné l'envie de poursuivre en thèse.*

*Je tiens à adresser mes plus profonds remerciements à François Brion pour l'encadrement de cette thèse. D'abord merci pour la confiance que tu m'as accordée, merci également pour l'ensemble des discussions qui ont fait avancer cette thèse dans la bonne direction et surtout merci de n'avoir cessé de croire en ce travail ! Merci aussi pour ton enthousiasme qui est contagieux et merci d'avoir su me rassurer quand je perdais confiance. Enfin, merci d'avoir fait en sorte que ma fin de thèse ait été une épreuve supportable, tes encouragements m'ont permis de voir le bout, et surtout merci pour tes corrections et ton regard pertinent lors de l'élaboration de ce manuscrit.*

*J'adresse mes sincères remerciements à Yves Combar nous, mon directeur de thèse. Vous avez été là dès mes débuts, m'aidant à trouver mon premier stage au CDTA d'Orléans, m'accueillant ensuite dans votre équipe et enfin m'encourageant à faire une thèse. Vous n'avez jamais été très loin, toujours bienveillant, je vous en remercie. Merci également pour la qualité de vos enseignements en Master. J'en profite pour remercier Danièle et Claire, je n'ai que de bons souvenirs de mon passage à l'INRA parmi vous !*

*Je tiens également à remercier sincèrement Olivier Kah pour son aide et ses conseils avisés tout au long de cette thèse, mais surtout pour m'avoir initié à la neuroanatomie sans laquelle il aurait été difficile de mener ce travail ! Merci de m'avoir accueilli dans votre laboratoire et au passage je remercie l'ensemble de l'équipe NAO, avec un petit clin d'œil à Mado, Karen & Arianna.*

*J'adresse mes remerciements à Eric Thybaud et Jean-Marc Porcher pour m'avoir permis de réaliser cette thèse au sein de l'unité d'écotoxicologie de l'INERIS dans des conditions favorables. Merci notamment de m'avoir donné l'opportunité de participer à des congrès.*

*Parce que faire une thèse c'est aussi faire partie d'une équipe, j'adresse mes plus chaleureux remerciements à l'équipe d'écotoxicologie qui a su faire de mes 3 années de thèse bien plus que 3 années de travail. D'abord, merci à Olivier et Benjamin pour tous les bons moments, surtout pour les « fameux » vendredi! Cyril, merci pour ta bonne humeur de papule! Nath, merci pour tout, surtout pour ta vigilance, sans toi le labo ne serait peut être qu'un tas de cendres! Edith, un énorme merci pour ton aide à la fin de cette thèse, sans ton coup de pouce je serais encore en train de compter des neurones !! Merci également aux thésards, Awa, Nico, Sabrina, Damien, et les autres... bon courage à vous pour la fin. Sélim merci pour tes remarques pertinentes.*



*Un merci à tous ceux avec qui j'ai partagé un moment, une manip, un café ou un éclat de rire !*

*J'adresse un merci tout particulier à Manu, la maman du labo, merci pour tes conseils nombreux et toujours bien utiles. Merci de mettre un peu d'ordre dans cette équipe et merci pour ta gentillesse et ton soutien tout au long de ces 3 années.*

*Un grand merci à tous mes colocataires de bureau, ceux qui sont partis, ceux qui sont encore là, Mohammed, Nawel, Migui, Marie, Kelly et sans oublier ... Marc qui a su rendre ce bureau tellement plus... Gossipy (ARrrêeete !), merci pour ta bonne humeur et ton soutien !*

*Je ne saurais assez remercier celles qui ont été mes confidentes, qui m'ont supporté dans les moments de doutes et les moments d'euphorie, celles qui m'ont aidé dans les moments de galère, celles qui tout simplement sont devenues mes amies. Audrey, tu as toujours su trouver les mots pour me remotiver quand ça allait moins bien alors mille fois merci ma Pony. Anne, heureusement que tu étais là dans bien des moments mais est-il nécessaire de te dire merci alors qu'on partage ensemble un cerveau ? oui, quand même mille fois merci ma Poupy. Toutes les trois on est arrivée au bout de cette aventure, ensemble et plus soudées que jamais, merci infiniment pour tous les moments partagés.*

*Pour terminer, parce qu'à mes yeux rien n'est plus important, j'adresse mes plus profonds remerciements à merveilleuse famille. A tous, dans votre diversité, un immense merci pour votre soutien (merci pou tou zot' soutien).*

*...A mes parents, vous m'avez toujours encouragé à donner le meilleur et vous m'avez toujours donné le meilleur. Vos valeurs sont devenues mes valeurs. Merci pour votre confiance et votre soutien inconditionnel.*

*...A ma grand-mère, merci d'avoir toujours été fière de mon travail, je suis tellement triste de ne pas partager la fin de cette thèse avec toi.*

*...A mon parrain, un infini merci, parce que mes premiers pas dans la Biologie c'est des heures passées avec toi à écouter pousser les légumes et à apprendre l'anatomie du lapin.*

*...A mon frère, tu as toujours été mon exemple, merci pour ta philosophie et tes encouragements, et pardon d'avoir manqué de temps ces trois dernières années pour passer des moments avec toi et ta petite famille... mais on va se rattraper !! Au passage un clin d'œil à ma mini nièce, Lou, merci pour toute ton énergie (non non, tu vois je ne fais pas d'école de couture !)*

*Jean-Charles qui mieux que toi sait combien merci à de sens à mes yeux ? Mais ce mot me paraît finalement dérisoire face à tout ce que tu m'as apporté. Ton soutien et ta force ont été les piliers de mon équilibre ces trois dernières années. Parce que sans toi je n'aurais pas même imaginé arriver au bout, je te dédis ce travail.*

# Liste des publications et des communications

## *Publications*

---

**Vosges M.**, Kah O., Piccini B., Porcher J-M., Brion F. Neuroanatomical characterization of the GnRH systems in the zebrafish (*Danio rerio*) and study of potential effect of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol. *En préparation*.

**Vosges M.**, Le Page Y., Chung B-C., Combarous Y., Porcher J-M., Kah O., Brion F., 2010. 17 $\alpha$ -ethinylestradiol disrupts the ontogeny of the forebrain GnRH system and the expression of brain aromatase during early development of zebrafish. *Aquatic Toxicology*, 99 (4), 479-491.

**Vosges M.**, Kah O., Hinfrey N., Chadili E., Le Page Y., Combarous Y., Porcher J-M., Brion F., 2010. 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol and Nonylphenol affect the development of forebrain GnRH neurons through an estrogen receptors-dependent pathway. *Soumis à Reproductive Toxicology*.

**Vosges M.**, Braguer J.C., Combarous Y., 2008. Long-term exposure of male rats to low-dose ethinylestradiol (EE<sub>2</sub>) in drinking water: effects on ponderal growth and on litter size of their progeny, *Reproductive Toxicology*, 25 (2), 161–168.

## *Communications orales*

---

**Vosges M.**, Pillon D. Effets centraux des perturbateurs endocriniens : effets du 17 $\alpha$ -éthinyloestradiol sur l'ontogenèse du système GnRH chez deux espèces modèles de vertébrés, le poisson zèbre et la souris. *Journée des Perturbateurs Endocriniens, 19 Octobre 2009, INRA Nouzilly, France*.

**Vosges M.**, Le Page Y., Combarous Y., Porcher J-M, Kah O, Brion F. 17 $\alpha$ -ethinylestradiol disrupts the ontogeny of the forebrain GnRH system and the expression of brain aromatase during early development of zebrafish. *Annual Meeting on Health, Sciences and Technology, Université François Rabelais, 30 juin 2010, Tours*.

**Vosges M.**, Hinfray N., Le Page Y., Cosnefroy A., Piccini B., Turies C., Porcher J-M, Kah O, Brion F. 17 $\alpha$ -ethinylestradiol disrupts the ontogeny of the forebrain GnRH system and the expression of brain aromatase during early development of zebrafish. *Symposium NEED, 10 Juillet 2010, Rouen, France.*

### ***Communications affichées***

---

**Vosges M.**, Bou Ezz Edine F., Brion F., Lareyre J-J., Le Gac F., Caraty A., Kah O. Caractérisation d'un système à Kisspeptine-10 dans le cerveau du Poisson zèbre et ses relations avec les systèmes à GnRH. 35<sup>ème</sup> *Colloque de la Société de Neuroendocrinologie, 10-12 Septembre 2008, Strasbourg, France. (Annexe 1)*

**Vosges M.**, Kah O., Porcher J-M., Brion F. Effect of ethinylestradiol (EE2) on GnRH system in zebrafish (*Danio rerio*) exposed at adult and larval stages. *SETAC Europe 19th Annual Meeting, 31 May - 4 June 2009, Göteborg, Sweden.*

**Vosges M.**, Kah O., Le Page Y., Porcher J-M., Brion F. Effects of ethinylestradiol on the development of the GnRH systems and the expression of brain aromatase during zebrafish (*Danio rerio*) development. 36<sup>ème</sup> *Colloque de la Société de Neuroendocrinologie, 15-18 Septembre 2009, Nice, France.*

**Vosges M.**, Le Page Y., Chung B-C., Porcher J-M., Kah O., Brion F. Effects of ethinylestradiol on the ontogenesis of GnRH neurons during zebrafish (*Danio rerio*) development. *13th Annual Meeting of the LARC Neuroscience network, 30 Octobre 2009, Caen, France.*

**Vosges M.**, Hinfray N., Le Page Y., Cosnefroy A., Piccini B., Turies C., Porcher J-M, Kah O, Brion F. 17 $\alpha$ -ethinylestradiol disrupts the ontogeny of the forebrain GnRH system and the expression of brain aromatase during early development of zebrafish. *Symposium NEED. 10 Juillet 2010, Rouen, France. (Annexe 2)*

## *Travaux associés*

---

Brion F., Hinfrey N., Baudiffier D., **Vosges M.**, Palluel O., Ait-Aïssa S., Pakdel F., Kah O., Porcher J-M. 2009. Effects of EE2 and TCDD, alone or in combination, on ER-dependent genes expression and sexual differentiation in the zebrafish. *SETAC Europe 19th Annual Meeting, 31 May - 4 June 2009, Göteborg, Sweden.* (Communication orale)

Servili A., Le Page Y., **Vosges M.**, Brion F., Kah O. Neuroanatomical characterization of the KISS/GPR54 systems: Comparison with GnRH projections and leptin receptor expressing cells. *13th Annual Meeting of the LARC Neuroscience network, 30 Octobre 2009, Caen, France.* (Communication orale)

Kah O., **Vosges M.**, Le Page Y., Servili A., Porcher J-M., Brion F. Using zebrafish to study the neuroendocrine effects of endocrine disruptors. *1st European Zebrafish PI Meeting, 18-21 March 2010, Padova, Italy.* (Poster)

Kah O., Le Page Y., **Vosges M.**, Tong S-K., Porcher J-M., Chung B-C., Brion F. Early life stage effects of endocrine disruptors in zebrafish: evidence from wild type and transgenic zebrafish. *HESI Health and Environmental Sciences Institute Workshop on Development of alternatives to chronic ecotoxicity tests: predicting early-life stage and endocrine-mediated toxicity in aquatic vertebrate species, June 2010, Paris, France.* (Conférence Invitée)

Cosnefroy A., Aït-Aïssa S., Piccini B., Turies C., **Vosges M.**, Hinfrey N., Porcher J-M., Kah O., Brion F. Use of Cyp19a1b-GFP zebrafish to assess the estrogenic activity of emerging pollutants, benzophenone derivatives (BPs). *Symposium NEED, 10 Juillet 2010, Rouen, France.* (Poster)

Brion F., Piccini B., Le Page Y., Tong S-K., Ait-Aïssa S., Porcher J-M., **Vosges M.**, Chung B-C., Kah O. A novel in vivo assay to assess the estrogenic activity of chemical substances using transgenic *cyp19a1b*-GFP zebrafish embryos. *The zebrafish embryo model in toxicology and teratology, 2nd-3rd September 2010, Karlsruhe, Allemagne.* (Poster, **Annexe 3**)

Brion F., Piccini B., Le Page Y., Tong S-K., Ait-Aïssa S., Porcher J-M., **Vosges M.**, Chung B-C., Kah O. A novel in vivo assay to assess the estrogenic activity of chemical substances using transgenic *cyp19a1b*-GFP zebrafish embryos. *14th LARC Neuroscience Network Meeting, 29<sup>th</sup> October 2010, Lille.* (Poster)

## Résumé

Les perturbateurs endocriniens (PE) sont capables d'interférer avec le système endocrinien entraînant ainsi des effets délétères sur le développement et la reproduction des organismes. À ce jour, la plupart des études consacrées aux effets des PE sur l'axe reproducteur se sont focalisées sur leurs effets sur les gonades et les tissus périphériques. Cependant, il apparaît que les circuits neuroendocrines contrôlant le développement et la reproduction pourraient également être affectés par les PE. Parmi ces réseaux neuroendocrines, la GnRH (Gonadotropin-releasing hormone) semble constituer une cible de choix des PE. En effet, la GnRH est l'intégrateur majeur du contrôle central de la fonction de reproduction. Le développement et l'activité des neurones à GnRH sont finement régulés, notamment par les hormones stéroïdes, ce qui les rend potentiellement sensibles aux PE. Ainsi, l'objectif de ce travail était d'étudier les effets neuroendocrines des xéno-œstrogènes sur le système à GnRH d'un modèle de vertébré, le poisson zèbre (*Danio rerio*). De plus, nous avons étudié l'expression protéique de l'aromatase cérébrale (AroB), l'enzyme de biosynthèse des œstrogènes.

A l'aide de techniques d'immunohistochimie couplées à des analyses neuroanatomiques et morphométriques, nous avons caractérisé le système à GnRH du poisson zèbre adulte et nous montrons que la distribution des neurones immunoréactifs à la GnRH (GnRH-ir), leur nombre et leur taille ne sont pas affectés par une courte exposition à 1nM de 17 $\alpha$ -éthinyloestradiol (EE2) chez le mâle. En revanche, l'étude de l'ontogenèse des neurones à GnRH du cerveau antérieur au cours du développement du poisson zèbre exposé à des concentrations croissantes d'EE2 ou de nonylphénol (NP), montre que ces xéno-œstrogènes perturbent le développement du système à GnRH au cours des stades précoces. Nous démontrons notamment que les deux xéno-œstrogènes produisent une augmentation du nombre de neurones à GnRH-ir de manière concentration-dépendante et démontrons l'implication de récepteurs des œstrogènes fonctionnels dans les effets centraux médiés par ces composés. Parallèlement, nous montrons le spectaculaire effet inducteur de l'EE2 et du NP sur l'expression de l'AroB dans les cellules gliales radiales et montrons pour la première fois l'existence de relations étroites entre les cellules gliales et les neurones à GnRH suggérant l'existence de relations fonctionnelles qui pourraient expliquer les effets observés sur les neurones à GnRH.

L'ensemble de ces travaux démontre que les réseaux neuroendocrines sont des variables critiques et sensibles des PE et souligne la nécessité de considérer leurs effets sur ces réseaux centraux si l'on souhaite correctement évaluer les risques de ces substances sur la reproduction des vertébrés.

**Mots clés:** Gonadotropin-releasing-hormone (GnRH), aromatase B, perturbateurs endocriniens, poisson zèbre (*Danio rerio*).

# Abstract

Endocrine disrupting chemicals (EDCs) are known to interfere with the endocrine system leading to adverse effects on the development and the reproductive health of organisms. To date, most of studies dedicated to the actions of EDCs on the reproductive axis have focused on their effects on the gonads and peripheral tissues. However, there is increasing evidence that neuroendocrine circuits controlling development and reproduction could be targeted by EDCs. Among these neuroendocrine networks, the Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) system appeared as a critical target. Indeed, GnRH is the key factor controlling the activity of the reproductive axis in vertebrates. The development and the activity of GnRH neurons are finely tuned by a series of factors, notably sex steroids, making these neurons prime targets for EDCs. In the light of this, the purpose of the present work was to explore the neuroendocrine effects of xenoestrogens on the GnRH system of a vertebrate model, the zebrafish (*Danio rerio*). In addition, the expression of the cytochrome brain aromatase (AroB) protein, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis, was investigated.

Using immunohistochemistry combined to neuroanatomical and morphometric analyses we characterize the GnRH system of adult zebrafish and we report that neither the distribution pattern of GnRH-immunoreactive (GnRH-ir) neurons nor the GnRH-ir neuronal number and size were affected by short term exposure to 17 $\alpha$ -ethinylestradiol (EE2) in male. In contrast, study on the ontogeny of forebrain GnRH neurons in zebrafish early developmental stages exposed to EE2 and NP, show that these two estrogenic compounds disrupt the development of GnRH system in early life stage. Notably, we demonstrate that both xenoestrogens induce an increase in the number of GnRH-ir neurons in a concentration-dependent manner and we evidence that xenoestrogen effects on GnRH ontogeny involve functional estrogens receptors. In parallel, we also show a dramatic concentration-dependent effect of EE2 and NP on the AroB expression in radial glial cells of developing zebrafish brain and we show for the first time the existence of close associations between radial glial cells and GnRH neurons suggesting the existence of functional relationships that could explain the observed effects on GnRH neurons.

In conclusion, we demonstrate for the first time that xenoestrogens, acting through ERs, disrupt key central networks that are essential for the development and regulation of reproduction. Altogether, these results demonstrate that GnRH and brain aromatase are critical and sensitive endpoints of EDCs and highlight the need to consider the neuroendocrine networks in order to improve the risk assessment of EDCs on reproduction of vertebrates.

**Keywords:** Gonadotropin-releasing-hormone (GnRH), aromatase B, endocrine disrupting chemicals, zebrafish (*Danio rerio*).

## Abréviations

5HT	5-hydroxytryptamine
ARNm	Acide ribonucléique messenger
AroB	Aromatase B
BrdU	2-déoxy-bromo-uridine
Cyp	Cytochrome P450
DA	Dopamine
E2	Œstradiol
EE2	17 $\alpha$ -éthinyloestradiol
ER	Récepteur des oestrogènes
ERE	Elément de réponse aux oestrogènes
FSH	Follicule Stimulating Hormone
GABA	Acide $\gamma$ -aminobutyrique
GAP	GnRH-associated peptide
GFP	Green fluorescent protein
GxRE	Elément de réponse au facteur glial x
GnRH	Gonadotropin-releasing Hormone
Ir	Immunoréactif(ve)
jpf	Jour post-fécondation
Kiss	Kisspeptine
LH	Luteinizing Hormone
NELF	Nasal embryonic LHRH factor
NP	Nonylphénol
NPY	Neuropeptide Y
PCB	Polychlorobiphényles
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PE	Perturbateur endocrinien
POA	Aire préoptique
T	Testostérone
TCDD	2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine
VTG	Vitellogénine
zfER	Récepteur des œstrogènes de poisson zèbre

# Table des matières

<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>1</b>
<b>SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>4</b>
<b>I. Les perturbateurs endocriniens.....</b>	<b>4</b>
I.1 Généralités .....	4
I.1.1 Définition .....	4
I.1.2 Mécanismes d'action .....	5
I.1.3 Effets biologiques .....	6
I.2 Effets neuroendocrines des perturbateurs endocriniens ?.....	8
<b>II. La GnRH dans l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique des poissons téléostéens ..</b>	<b>10</b>
II.1 Les variants de la GnRH.....	10
II.2 Gènes et structure de la GnRH .....	11
II.3 Distribution et fonction des variants de la GnRH.....	12
II.4 Ontogenèse des neurones à GnRH .....	13
II.5 Les récepteurs de la GnRH.....	15
II.6 Régulations de la synthèse et de la sécrétion de la GnRH.....	16
II.7 Perturbateurs endocriniens et GnRH .....	20
<b>III. L'aromatase chez les poissons téléostéens .....</b>	<b>22</b>
III.1 Le complexe enzymatique.....	22
III.2 Gènes, structures, et régulations de l'aromatase .....	22
III.3 Distribution tissulaire et cellulaire de l'aromatase .....	25
III.4 Expression de l'aromatase B au cours du développement .....	28
III.5 Rôles de l'aromatase cérébrale.....	28
III.5.1 Différenciation sexuelle .....	29
III.5.2 Comportement sexuel.....	30
III.5.3 Régulations neuroendocrines de l'axe hypothalamo-hypophysaire.....	30
III.5.4 Neurogenèse .....	32
III.6 Perturbateurs endocriniens et Aromatase B .....	34
<b>OBJECTIFS DE LA THESE .....</b>	<b>37</b>



<b>CHOIX METHODOLOGIQUES.....</b>	<b>38</b>
<b>I. Modèle biologique : le poisson zèbre (<i>Danio rerio</i>).....</b>	<b>38</b>
I.1 Généralités .....	38
I.2 Le poisson zèbre sauvage et lignée transgénique <i>cyp19a1b</i> -GFP .....	39
<b>II. Choix des molécules .....</b>	<b>39</b>
II.1 Le 17 $\alpha$ -éthinyloestradiol.....	40
II.2 Le nonylphénol .....	40
<b>III. Démarche expérimentale .....</b>	<b>41</b>
III.1 Démarche expérimentale générale .....	41
III.2 Etude du système à GnRH .....	42
III.3 Etude de l'expression de l'aromatase B .....	43
<b>RESULTATS .....</b>	<b>44</b>
<b>Chapitre I : Caractérisation neuroanatomique du système à GnRH du poisson zèbre ..</b>	<b>45</b>
Contexte .....	44
Objectifs et démarche expérimentale .....	44
Résultats principaux .....	44
Conclusions .....	45
Article 1: <i>Neuroanatomical characterization of the GnRH systems in the zebrafish (<i>Danio rerio</i>) and study of potential effect of 17<math>\alpha</math>-ethinylestradiol .....</i>	46
<b>Chapitre II : Effets du 17<math>\alpha</math>-éthinyloestradiol sur l'ontogenèse du système à GnRH chez le poisson zèbre .....</b>	<b>62</b>
Contexte .....	62
Objectifs et démarche expérimentale .....	62
Résultats principaux .....	62
Conclusions .....	64
Article 2: <i>17<math>\alpha</math>-ethinylestradiol disrupts the ontogeny of the forebrain GnRH system and the expression of brain aromatase during early development of zebrafish .....</i>	65

<b>Chapitre III : La perturbation du système à GnRH implique des récepteurs ERs .....</b>	<b>78</b>
<i>Contexte</i> .....	78
<i>Objectifs et démarche expérimentale</i> .....	78
<i>Résultats principaux</i> .....	78
<i>Conclusions</i> .....	79
<i>Données expérimentales supplémentaires</i> .....	80
Article 3: 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol and Nonylphenol affect the development of forebrain GnRH neurons through an estrogen receptors-dependent pathway .....	81
<b>DISCUSSION GENERALE .....</b>	<b>105</b>
<b>I. Caractérisation neuroanatomique du système à GnRH par immunohistochimie.....</b>	<b>106</b>
<b>II. Expression de l'aromatase B au cours du développement .....</b>	<b>108</b>
<b>III. Le système à GnRH et l'aromatase B sont des cibles sensibles des PE .....</b>	<b>108</b>
<b>IV. Les effets des xéno-œstrogènes sur les circuits neuroendocrines sont dépendants du stade de développement .....</b>	<b>110</b>
<b>V. Mécanismes d'actions de la perturbation du système à GnRH et de l'aromatase B par les xéno-œstrogènes .....</b>	<b>111</b>
V.1 Quelle(s) sous-forme(s) des récepteurs des œstrogènes est (sont) impliquée(s) dans les effets médiés par les xéno-œstrogènes ? .....	112
V.2 Les effets des xéno-œstrogènes s'exercent-ils directement ou sont-ils indirects ? ....	113
V.3 Quels sont les mécanismes impliqués dans l'augmentation du nombre de neurones à GnRH-ir ?.....	115
<b>VI. Conséquences fonctionnelles des effets centraux des xéno-œstrogènes .....</b>	<b>116</b>
VI.1 Conséquences fonctionnelles de la perturbation du développement des neurones à GnRH .....	116
VI.2 Conséquences fonctionnelles de la perturbation de l'expression de l'aromatase B ..	118
<b>VII. Impact des PE sur l'aromatase B et le GnRH : quelles implications dans l'évaluation du risque des PE ? .....</b>	<b>120</b>

**CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES ..... 122**

**ANNEXES..... 125**

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... 128**

# INTRODUCTION GENERALE

---

Au cours de ces dernières décennies, l'action néfaste de certaines substances, présentes dans l'environnement, sur la reproduction et le développement des organismes a suscité de fortes préoccupations au sein de la communauté scientifique (Carlsen et al. 1992; Colborn and Clement 1992). Ces substances, d'origine naturelle ou synthétique, sont regroupées sous le terme de perturbateurs endocriniens (PE). En 2002 l'organisation mondiale de la santé a défini un PE comme une substance ou un mélange exogène altérant les fonctions du système endocrinien et induisant donc des effets nocifs sur la santé d'un organisme intact, de ses descendants ou (sous-)populations (WHO 2002). Les PE sont capables d'agir par des modes d'actions multiples sur l'ensemble des étapes de la régulation endocrine provoquant ainsi des effets délétères sur le développement et la reproduction des organismes (Kavlock et al. 1996). Les vertébrés aquatiques, de part leur habitat, sont les plus exposés à ces substances et plusieurs études écotoxicologiques ont montré un lien entre ces expositions et l'apparition de troubles du développement ainsi que la détérioration des capacités de reproduction (Guillette and Gunderson 2001; Jobling et al. 2002; Segner et al. 2003). Face à ces constats, il est apparu nécessaire de disposer de méthodes appropriées pour évaluer les dangers et les risques de ces substances pour les organismes. Ainsi de nombreuses études ont été menées en laboratoires afin d'évaluer l'impact de l'exposition à des PE sur le développement et la fonction de reproduction des espèces aquatiques, notamment chez les poissons. La plupart des ces travaux se sont focalisés sur les effets des PE sur les organes périphériques et plus particulièrement sur la gonade (pour revue, Mills and Chichester 2005). Cependant, le contrôle de la fonction de reproduction implique des niveaux de régulation supérieurs qui incluent le cerveau et l'hypophyse. A ces niveaux, des réseaux neuroendocriniens complexes agissent de manière coordonnée pour assurer le développement et la régulation de l'axe reproducteur. Cependant, les effets des PE sur les circuits neuroendocrines sont très peu documentés soulignant la nécessité de conduire des travaux spécifiques pour étudier cette problématique.

Chez les poissons, comme chez tous les vertébrés, l'élément majeur du contrôle central de la reproduction est la GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone). Cette hormone peptidique hypothalamique agit au niveau des cellules gonadotropes hypophysaires où elle stimule la synthèse et la libération des hormones gonadotropes FSH (Follicule Stimulating Hormone) et LH (Luteinizing Hormone). Au niveau des gonades, ces deux hormones régulent la gamétogenèse et également la synthèse et la sécrétion de peptides et protéines gonadiques ainsi que d'hormones stéroïdes. La synthèse et la libération de la GnRH sont régulées par de

nombreux facteurs, parmi lesquels, des rétrocontrôles complexes exercés par les hormones stéroïdes gonadiques. Ces régulations endocrines font du système à GnRH une cible potentielle des PE. Cependant, l'effet des PE sur le système à GnRH était peu documenté.

Par ailleurs, les poissons téléostéens ont la particularité d'avoir une considérable activité d'aromatation des androgènes en œstrogènes dans le cerveau. Cette propriété est liée à la forte expression de l'aromatase cérébrale (aromatase B), enzyme codée par le gène *cyp19a1b*. Cette enzyme s'exprime dans les cellules gliales radiaires et son gène est régulé positivement par les estrogènes (Menuet et al. 2005). Il a été montré que les cellules gliales radiaires jouent un rôle important dans la neurogenèse chez le poisson en tant que cellules progénitrices neuronales (Pellegrini et al. 2007). De plus, la forte expression de l'aromatase B, l'enzyme de synthèse de l'œstradiol, dans les cellules gliales radiaires suggère l'existence d'un lien entre l'œstradiol et la forte neurogenèse chez le poisson. Dans le contexte de la perturbation endocrinienne, différentes études ont montré que l'exposition à des œstrogènes naturels ou synthétiques menait à une induction du gène et de la protéine aromatase B (Hinfray et al. 2006; Kazeto et al. 2004). L'aromatase B s'exprimant dans des structures cérébrales impliquées dans la reproduction il est possible qu'une perturbation de l'expression de cette enzyme puisse avoir des conséquences sur le développement et la régulation de la fonction de reproduction. De plus, étant donné la sensibilité du système à GnRH aux hormones stéroïdes, il n'est pas exclu que la perturbation de l'expression de l'aromatase B ait un impact sur le système à GnRH.

L'objectif de ce travail de thèse s'est inscrit dans la problématique générale de l'étude des effets centraux des perturbateurs endocriniens chez le poisson. Le but était de définir si l'exposition aux PE avait un impact sur des cibles neuroendocrines, choisies en fonction de leur implication dans le développement et la régulation de l'axe reproducteur. Plus spécifiquement, nous avons étudié les effets de PE œstrogènes-mimétiques, d'une part sur le système à GnRH et d'autre part sur l'aromatase B chez une espèce modèle de vertébrés, le poisson zèbre (*Danio rerio*). La finalité de ce travail était d'apporter des connaissances nouvelles sur les effets des PE sur le système neuroendocrinien et *in fine* de déterminer la pertinence d'une approche expérimentale consistant à considérer ces effets pour caractériser les dangers potentiels de substances chimiques.

La première partie de ce manuscrit sera consacrée à une synthèse bibliographique posant les bases de ce travail de thèse. Dans un premier temps, la problématique des perturbateurs endocriniens sera présentée de manière concise. Nous rappellerons ensuite la place du système à GnRH dans l'axe hypothalamo-hypophyséogonadique des téléostéens et nous montrerons en quoi ce système constitue une cible des perturbateurs endocriniens. Enfin nous évoquerons l'état des connaissances sur l'aromatase, notamment sa forme cérébrale et nous présenterons les effets des perturbateurs endocriniens sur cette cible du système nerveux central.

Les objectifs précis de ce travail seront ensuite présentés ainsi que la démarche expérimentale retenue pour y répondre. Dans cette partie, les choix méthodologiques seront explicités. Le chapitre « Résultats » s'articule autour d'articles scientifiques rédigés en anglais. Il s'agit d'articles en préparation (Article 1), accepté (Article 2) ou soumis (Article 3). Chacun de ces articles sera précédé d'un résumé en français qui rappellera les objectifs, la démarche et les résultats principaux de ces travaux. Des résultats complémentaires viendront compléter et enrichir les résultats présentés dans les articles publiés ou en cours de publication.

L'ensemble de ces résultats sera ensuite discuté afin de replacer nos travaux dans le contexte de la problématique générale de cette thèse et d'en dégager des perspectives de recherche.

# SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

---



# I. Les perturbateurs endocriniens

## I.1 Généralités

### I.1.1 Définition

Depuis la fin du XX<sup>ème</sup> siècle, la problématique des perturbateurs endocriniens suscite de fortes préoccupations au sein de la communauté scientifique en raison des effets délétères de ces composés sur la santé des organismes. Ces inquiétudes, maintenant largement relayées par les médias, font l'objet d'attentions particulières de la part des gouvernements et des instances de réglementations afin d'évaluer, de contrôler et de prévenir les dangers et les risques associés à ces composés.

Un perturbateur endocrinien (PE) est défini comme un « agent exogène capable d'interférer avec la synthèse, la sécrétion, le transport, la liaison, l'action ou l'élimination des hormones naturelles responsables du maintien de l'homéostasie, de la reproduction, du développement et du comportement » (Kavlock et al. 1996). Plus récemment, l'organisation mondiale de la santé a défini un PE comme « 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 » (WHO 2002). Les PE ne sont donc pas définis par un mécanisme d'action spécifique et ils ne s'apparentent pas à une classe chimique particulière. Ces substances n'ont de commun que leur propriété à induire des modifications de l'homéostasie endocrinienne susceptibles d'avoir des conséquences délétères pour les organismes.

Les PE regroupent des composés de nature variable, pouvant être d'origine naturelle ou synthétique (**Tableau I**). Parmi les substances naturelles, on distingue les phyto-œstrogènes (coumestanes ; lignanes ; flavonoïdes ; stilbènes), les myco-œstrogènes (zéaralénone) et les hormones stéroïdes naturelles. Les composés synthétiques regroupent de nombreuses substances issues de l'industrie chimique (plastifiants, peintures), agrochimique (pesticides), pharmaceutique (hormones de synthèse) ou cosmétique (filtres UV).

**Tableau I** : Exemples de composés perturbateurs endocriniens d'origine naturelle et synthétique.

Famille Chimique	Composés	Sources
Phytoestrogènes	Génistéine, Coumestrol	Végétaux
Hormones naturelles	17 $\alpha$ -œstradiol, œstrone	Stéroïdes sexuels
Pesticides	Atrazine, Lindane, Endosulfan, Dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT)	Agriculture
Alkylphénols	Nonylphénol, Octylphénol	Détergents
Hormones de synthèse	17 $\alpha$ -éthinyloœstradiol, Diéthylstilbestrol, Tamoxifène	Industrie pharmaceutique
Filtres UV	Benzophénones, 4-méthylbenzylidène camphre (4-MBC)	Industrie cosmétique
Phtalates	Phtalate de di-2-éthylhexyle (DEHP), Phtalate de dibutyle (DBP)	Industrie plastique
Dioxines	2,3,7,8-TCDD, 1,2,3,7,8-PeCDD	Sous-produit industriel

Parmi ces composés anthropiques on compte également certains sous-produits industriels, comme les dioxines et les furanes. A ce jour, plusieurs centaines de PE naturels ou anthropiques ont été identifiés et de nouveaux composés viennent continuellement s'ajouter à cette liste.

Dans l'environnement, les sources d'exposition aux PE sont multiples puisqu'ils peuvent être présents dans l'air, dans les sols et également dans l'eau. S'agissant de l'eau, de nombreux composés PE issus de rejets d'activités agricoles, urbaines et industrielles sont disséminés dans les eaux de surfaces. L'ensemble de ces sources de contamination engendre une pollution préoccupante des milieux aquatiques par les PE.

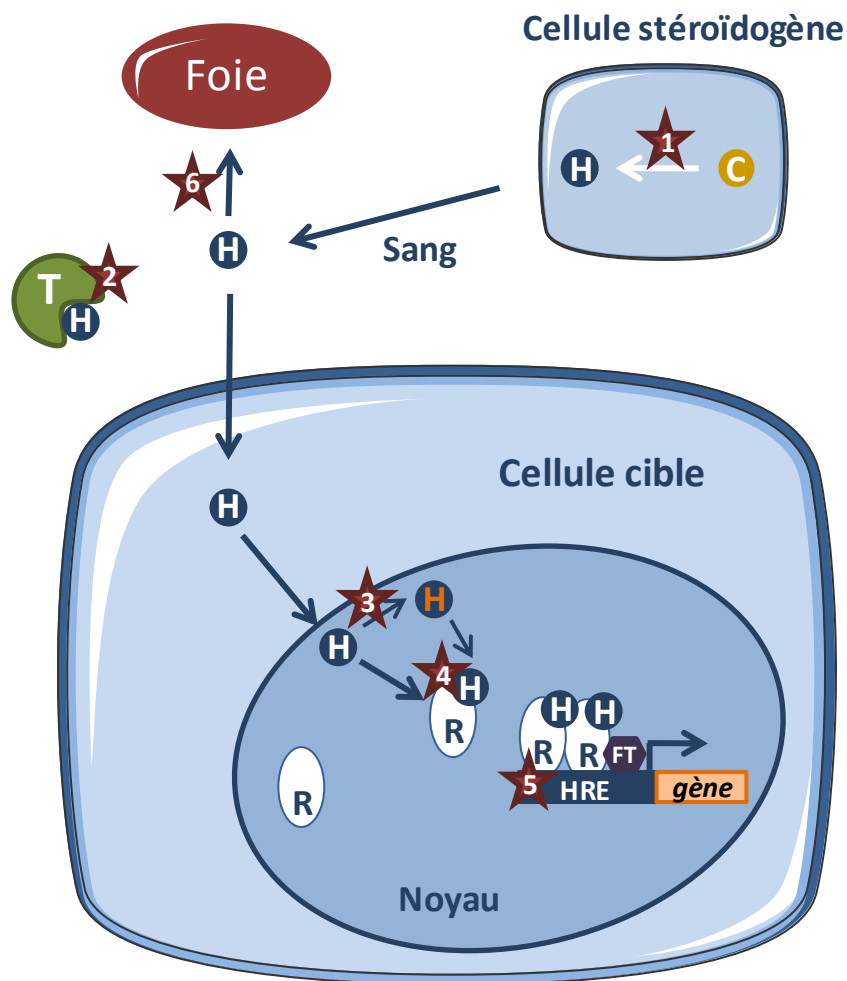
### *1.1.2 Mécanismes d'action*

Les perturbateurs endocriniens peuvent altérer l'homéostasie du système endocrinien par des mécanismes d'action multiples et complexes.

Parmi ces mécanismes, l'un des plus documenté est la capacité de certains PE à interagir avec les récepteurs hormonaux, tels que le récepteur des œstrogènes (ER) ou celui des androgènes (AR). Ces récepteurs nucléaires sont classiquement activés par la fixation du ligand naturel et ils agissent comme facteurs de transcription en se fixant sur leurs éléments de réponses régulant ainsi l'expression de gènes cibles. La fixation d'un PE à la place du ligand endogène est capable de perturber les régulations transcriptionnelles médiées par ces récepteurs. Les PE peuvent interagir avec les récepteurs hormonaux selon deux mécanismes :

- Agoniste : en mimant l'action des hormones naturelles, donc en produisant des effets similaires à ceux de cette hormone,
- Antagoniste : en bloquant, de manière compétitive ou non compétitive, l'action des hormones naturelles sur leurs récepteurs.

L'action des PE ne se limite cependant pas à leur interaction avec les récepteurs hormonaux puisqu'ils sont également capables de modifier la concentration et la biodisponibilité des hormones endogènes en affectant notamment leur synthèse, leur libération, leur transport mais également leur métabolisme ainsi que leur élimination (Kavlock et al. 1996; Vos et al. 2000; WHO 2002). La **figure 1**, adaptée de WHO (2002), résume les principaux sites d'action des PE.



**Figure 1 : Représentation schématique des principaux sites d’actions des perturbateurs endocriniens** (adaptée de WHO 2002). 1. Synthèse hormonale (enzymes de la stéroïdogénèse) ; 2. Transport (protéines de transport) ; 3. Conversion enzymatique ; 4. Récepteur Nucléaire (action agoniste ou antagoniste) ; 5. Liaison du récepteur à l’ADN ; 6. Métabolisme hépatique, élimination. Cholestérol (C), hormone stéroïde (H), récepteurs hormonaux (R), protéine de transport des stéroïdes (T), élément de réponse aux hormones stéroïdes (HRE), co-facteur de transcription (FT).

Les mécanismes d'action des PE sont d'autant plus complexes qu'ils dépendent de nombreux paramètres tels que le sexe, l'âge, l'espèce, mais également de fenêtres critiques d'exposition (Diamanti-Kandarakis et al. 2009).

### *1.1.3 Effets biologiques*

Les effets des perturbateurs endocriniens sont multiples puisqu'ils sont capables d'agir sur l'ensemble des étapes de la régulation endocrine. Ils sont ainsi susceptibles de perturber de nombreuses fonctions physiologiques telles que le développement, la croissance, le métabolisme, l'immunité, le comportement et la reproduction.

Les effets des PE les plus étudiés sont, de loin, ceux concernant le développement et la reproduction. Ils ont initialement été mis en évidence chez les animaux sauvages. Plusieurs études ont ainsi établi un lien entre la présence de PE dans l'environnement et l'apparition de troubles du développement ou de la fonction de reproduction chez certains organismes (pour revue Tyler et al. 1998; Vos et al. 2000). Parmi ces études, on peut citer quelques exemples emblématiques tels que :

- La survenue d'imposex (développement d'organes sexuels mâles) chez les femelles gastéropodes exposées au tributylétain, un agent biocide utilisé dans les peintures anti-salissures (Bryan and Gibbs 1991) ;
- Les anomalies du développement et du fonctionnement de l'appareil reproducteur des alligators mâles exposés au dicofol, un pesticide organochloré (Guillette et al. 2000) ;
- L'altération de la calcification des œufs chez les oiseaux exposés au DDT et à son métabolite DDE (Lundholm 1997).

Chez l'Homme, il y a de fortes suspicions quant à l'implication des PE dans l'incidence croissante de certaines pathologies telles que les cancers hormonaux-dépendants ou le syndrome de dysgénie testiculaire (Safe 2004; Skakkebak et al. 2001). De même, les PE sont incriminés dans les troubles de la fertilité et dans l'apparition de pubertés précoces (Bourguignon et al. 2010; Diamanti-Kandarakis et al. 2009). Cependant, hormis l'exemple tragique du diéthylstilbestrol pour lequel un lien a été clairement établi entre l'exposition et l'apparition de cancer et d'anomalies de la reproduction, il y a de nombreuses controverses et très peu de certitudes quant au lien de causalité entre l'exposition aux PE et les effets observés sur la santé humaine (Safe 2004).

**Tableau II :** Exemples d'études de laboratoires montrant les effets de perturbateurs endocriniens sur la fonction de reproduction de différentes espèces de poissons modèles.

	Composés	Espèces	Effets	Références	
<b>Vitellogénine hépatique (VTG)</b>	17β-œstradiol	Poisson zèbre	Induction de la VTG chez le mâle	(Brion et al. 2004)	
	17α-éthinyloœstradiol			(Segner et al. 2003)	
	Bisphénol A			(Segner et al. 2003)	
	Nonylphénol	Médaka		(Seki et al. 2003)	
	Benzophénone-2	Tête-de-boule		(Weisbrod et al. 2007)	
<b>Maturation sexuelle</b>	17α-éthinyloœstradiol	Poisson zèbre	Retard de maturation sexuelle	(Segner et al. 2003)	
	17β-œstradiol			(Brion et al. 2004)	
<b>Caractères sexuels secondaires (CSS)</b>	Nonylphénol	Médaka	Féminisation des CSS chez les mâles	(Seki et al. 2003)	
	17β-œstradiol	Poisson zèbre		(Brion et al. 2004)	
	Vinclozoline	Guppy	Réduction des CSS mâles	(Bayley et al. 2002)	
<b>Capacités de reproduction</b>	17α-éthinyloœstradiol	Poisson zèbre	Réduction de la production d'œufs	(Segner et al. 2003)	
		Tête-de-boule		(Jobling et al. 2003)	
	Méthoxychlore			(Ankley et al. 2001)	
	TCDD	Poisson zèbre		(King Heiden et al. 2009)	
	p,p'-DDE	Guppy		Réduction du nombre de spermatozoïdes	(Bayley et al. 2002)
	Vinclozoline			(Bayley et al. 2002)	
<b>Histologie de la gonade</b>	17α-éthinyloœstradiol	Poisson zèbre	Altération de la structure gonadique	(Segner et al. 2003)	
	Bisphénol A	Médaka		(Metcalfe et al. 2001)	
	17α-éthinyloœstradiol	Médaka	Intersexualité gonadique	(Metcalfe et al. 2001)	
	Méthyltestostérone	Poisson zèbre		(Örn et al. 2003)	
<b>Comportement</b>	Vinclozoline	Guppy	Altération du comportement sexuel mâle	(Bayley et al. 2002)	
	Flutamide			(Bayley et al. 2002)	
	17α-éthinyloœstradiol	Poisson zèbre		(Segner et al. 2003)	
	Bisphénol A			(Segner et al. 2003)	
	Octylphénol	Médaka		(Gray et al. 1999)	

Espèces de poissons : Médaka (*Oryzias latipes*) ; Poisson zèbre (*Danio rerio*) ; Guppy (*Poecilia reticulata*) ; Tête-de-boule (*Pimephales promelas*).

Chez les espèces aquatiques, notamment chez les poissons, les exemples de perturbation endocrinienne *in situ* sont abondants (pour revue, Vos et al. 2000). Nous rappelons ici, de manière non exhaustive, quelques exemples significatifs.

Plusieurs études ont révélé une élévation du taux plasmatique de vitellogénine (protéine précurseur du vitellus) chez les poissons mâles vivant dans les cours d'eau situés en aval des stations d'épuration (Harries et al. 1996; Larsson et al. 1999; Lye et al. 1997). La vitellogénine est normalement produite par les femelles sous le contrôle des œstrogènes gonadiques, son induction chez les mâles est liée à la présence de substances œstrogénomimétiques dans le milieu. Des phénomènes d'intersexualité (ovotestis), d'inversion sexuelle ainsi que des anomalies du développement gonadique ont également été rapportés chez les populations de poissons vivant dans ces milieux contaminés (Hemming et al. 2001; Jobling et al. 2002; Lye et al. 1997). De même, des études ont montré des retards du développement gonadique et des réductions des taux plasmatiques hormonaux chez les poissons vivants en aval de rejets d'effluents d'usines de pâte à papier (Andersson et al. 1988; Van Der Kraak et al. 1992). L'ensemble de ces données montre que certaines substances présentes dans l'environnement aquatique sont capables d'altérer le développement et la fonction de reproduction des poissons. Cependant, la nature des composés et les mécanismes complexes mis en œuvre n'étant pas entièrement élucidés, il est difficile d'établir un lien de causalité entre l'exposition et les effets observés chez les poissons.

Les travaux menés en laboratoire ont permis de s'affranchir de la complexité de l'analyse *in situ*. Ainsi, de nombreuses études réalisées en conditions contrôlées avec des espèces modèles de poissons ont permis de caractériser précisément les effets des PE sur la fonction de reproduction (pour revue Mills and Chichester 2005).

Les composés PE les plus étudiés sont, de loin, des ceux ayant des effets œstrogéniques (œstrogènes mimétiques), tels que le  $17\beta$ -œstradiol, le  $17\alpha$ -éthinyloœstradiol, le bisphénol A ou encore le nonylphénol. Ces composés produisent une très large gamme d'effets parmi lesquels l'induction de la vitellogénine chez le poisson mâle, la réduction des capacités de reproduction ainsi que l'altération de la gonade et l'apparition de phénomènes d'intersexualité (Brion et al. 2004; Metcalfe et al. 2001; Segner et al. 2003). Les PE anti-androgéniques tels que le flutamide ou la vinclozoline ont, quant à eux, des effets délétères sur le comportement sexuels ainsi que sur les capacités de reproduction (Bayley et al. 2002). Le **tableau II** présente un aperçu non exhaustif des principaux effets des PE observés chez différentes espèces modèles de poissons.

## I.2 Effets neuroendocrines des perturbateurs endocriniens ?

Comme nous venons de l'évoquer, les effets des perturbateurs endocriniens sur la fonction de reproduction ont suscité de nombreuses recherches au cours de ces dernières années. Ces études se sont principalement focalisées sur les organes périphériques, notamment sur la sphère gonadique, laissant, pour ainsi dire, inexploitées d'autres cibles potentielles de l'axe reproducteur.

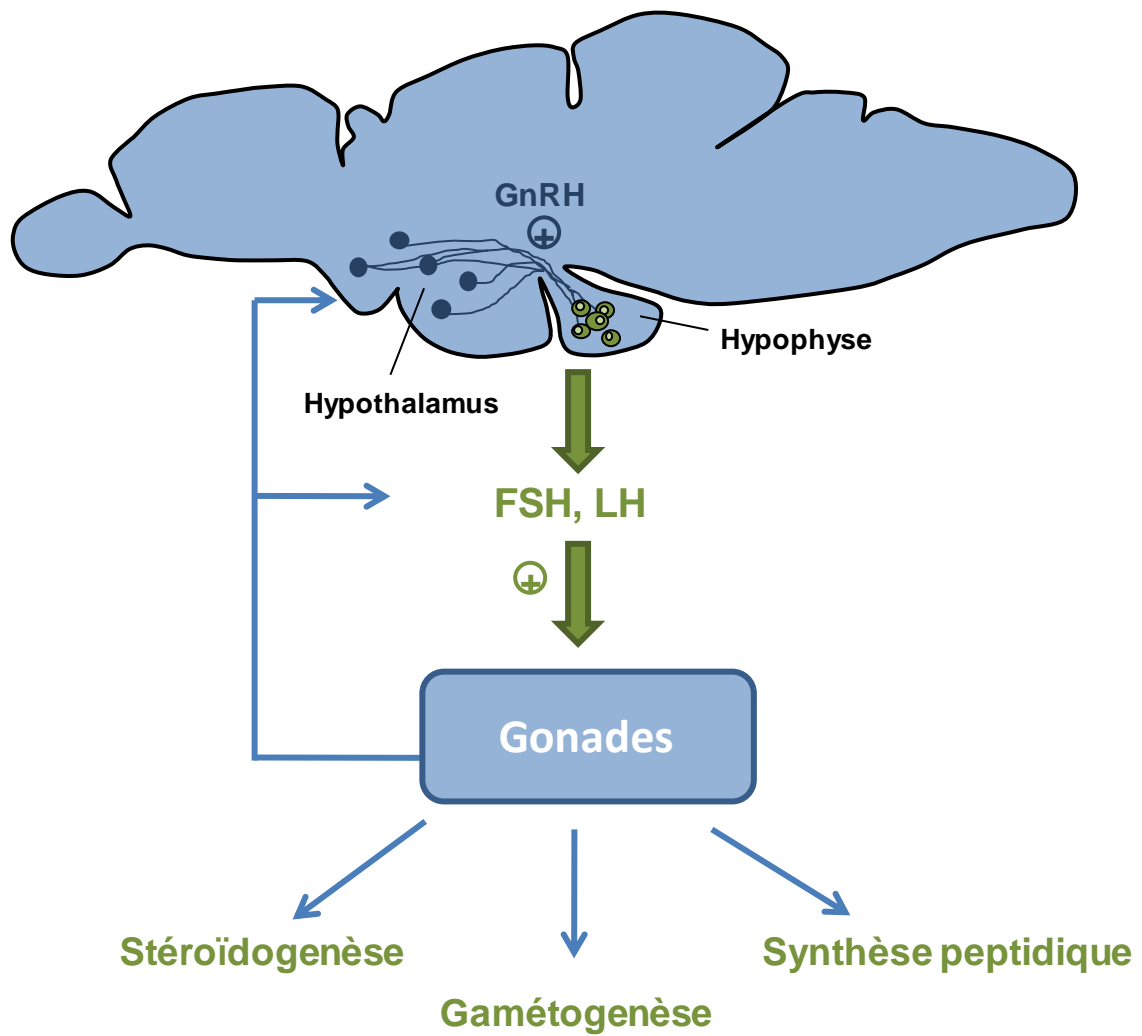
Chez l'ensemble des vertébrés, la fonction gonadique et plus généralement la fonction de reproduction sont dépendantes de régulations issues du système nerveux central. Plus spécifiquement, le cerveau et l'hypophyse constituent un complexe, l'axe hypothalamo-hypophysaire, dont la fonction est d'intégrer les informations de différents facteurs externes (photopériode, nutrition) et internes (signaux hormonaux, peptidiques) et de les retranscrire sous forme de signaux endocriniens afin d'assurer le développement et la régulation de l'axe reproducteur.

Au niveau de l'hypothalamus, de nombreux réseaux neuroendocrines agissent de manière coordonnée pour réguler la fonction hypophysaire. Au cœur de ces réseaux, la GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone) occupe un rôle central. L'hypophyse, quant à elle, intègre les informations d'origine hypothalamique et les relaie sous forme de sécrétion des gonadotropines FSH et LH. Ces gonadotropines hypophysaires jouent un rôle essentiel dans le contrôle des activités gamétogénétiques et endocrines des gonades. Ainsi, l'axe reproducteur étant étroitement régulé par des réseaux neuroendocrines, il était possible que certains des effets délétères des PE sur la fonction de reproduction soient dûs à leur action sur le complexe hypothalamo-hypophysaire.

Bien que de récentes études sur l'impact des PE suggèrent une action centrale de ces composés (Bourguignon et al. 2010; Diamanti-Kandarakis et al. 2009), peu de travaux se sont attachés à étudier les effets neuroendocrines des PE chez les vertébrés. Or, **il apparaît essentiel d'étudier ces effets pour améliorer la connaissance sur les mécanismes d'action de ces substances. De plus, la perturbation des réseaux neuroendocrines n'est pour le moment pas prise en compte dans la réglementation. Il existe donc un besoin réel d'outils et de modèles biologiques pour améliorer les stratégies d'évaluation des dangers et des risques des composés PE pour les organismes.**



Dans la suite de cette synthèse bibliographique nous définirons deux cibles potentielles du système nerveux central, la GnRH et l'aromatase, et nous préciserons les données de la littérature relatives aux effets des PE sur ces cibles.



**Figure 2 : La GnRH dans l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique des poissons téléostéens.**

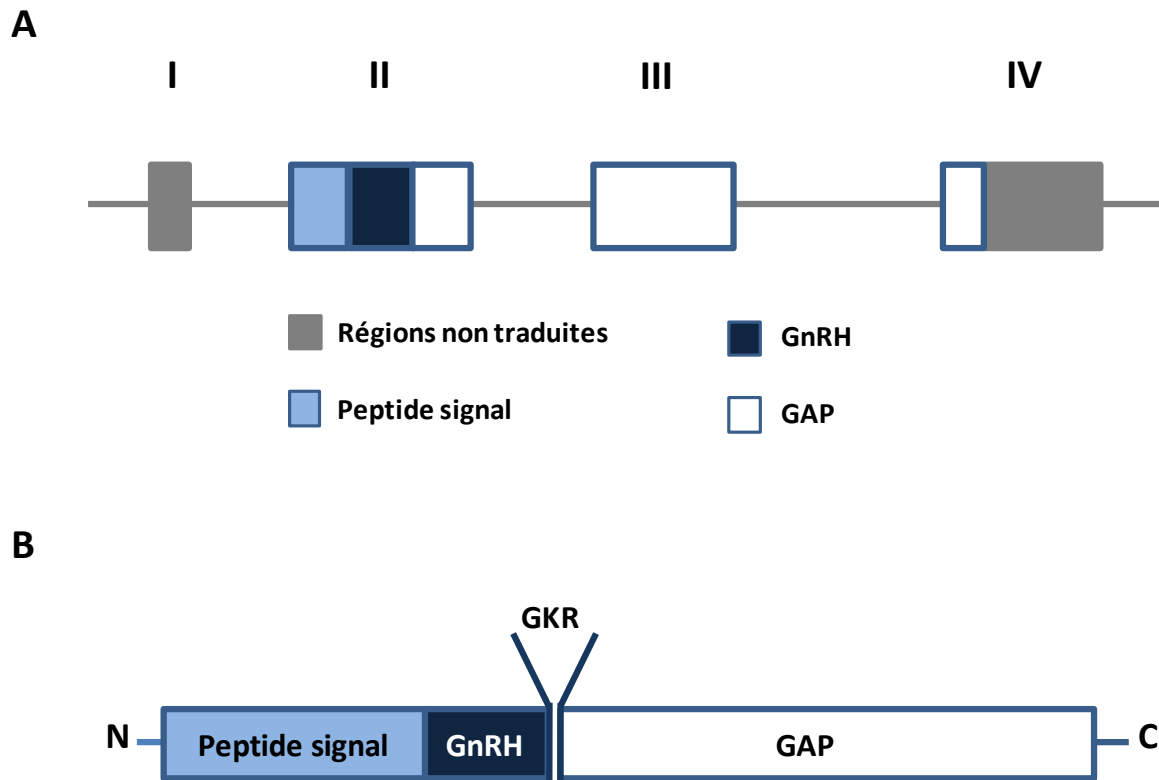
## II. La GnRH dans l'axe hypothalamo-hypophysogonadique des poissons téléostéens

Chez les poissons téléostéens, comme chez tous les vertébrés, la GnRH (Gonadotropin-releasing Hormone) constitue l'élément majeur du contrôle de l'axe hypothalamo-hypophysogonadique (**Figure 2**). Il s'agit d'une neurohormone d'origine peptique synthétisée par des neurones localisés au niveau de l'hypothalamus. Contrairement aux tétrapodes, où la GnRH accède à l'hypophyse via le système porte hypothalamo-hypophysaire de l'éminence médiane, chez les téléostéens les neurones à GnRH innervent directement les cellules gonadotropes hypophysaires. C'est à ce niveau que la GnRH est libérée et se fixe sur des récepteurs spécifiques à sept domaines transmembranaires (GnRH-R) stimulant ainsi la biosynthèse et la libération des hormones gonadotropes FSH et LH. Ces hormones sont libérées dans la circulation générale et agissent sur les gonades en se fixant sur des récepteurs spécifiques. A ce niveau, elles régulent la gamétogenèse d'une part mais également la synthèse et la sécrétion des peptides gonadiques (inhibine, activine, follistatine) et des hormones stéroïdes (androgènes, œstrogènes, progestérone).

### II.1 Les variants de la GnRH

La GnRH a été identifiée pour la première fois chez les mammifères (Amoss et al. 1971; Matsuo et al. 1971), il s'agit d'un décapeptide de séquence **pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>**. A la suite de ces travaux pionniers, plusieurs études ont permis d'identifier différentes formes, très conservées, de la GnRH à travers le règne animal soulignant ainsi son rôle majeur dans la fonction de reproduction (pour revue, Kah et al. 2007; Lethimonier et al. 2004). Chez les poissons téléostéens, la GnRH fut identifiée pour la première fois chez le saumon kéta, *Oncorhynchus keta* (Sherwood et al. 1983).

A ce jour, quatorze variants de la GnRH ont été isolés chez les vertébrés, dont huit chez les poissons téléostéens (**Tableau III**). Ces variants ont d'abord été nommés selon l'espèce dans laquelle ils ont été identifiés pour la première fois. Cependant, afin d'éviter les confusions, une nouvelle classification a été établie sur la base de l'analyse phylogénétique et la distribution neuroanatomique des variants (Fernald and White 1999).



**Figure 3 : Représentation schématique de l'organisation structurale du gène (A) et du précurseur (B) de la GnRH des vertébrés.** A : Gène de la GnRH, les exons sont représentés par des rectangles et numérotés en chiffres romains. Les lignes grises correspondent aux régions introniques. B : Le précurseur prépro-GnRH est constitué du peptide signal, du décapeptide GnRH, du site de clivage GRK (Gly-Lys-Arg) et du GAP (GnRH-associated peptide).

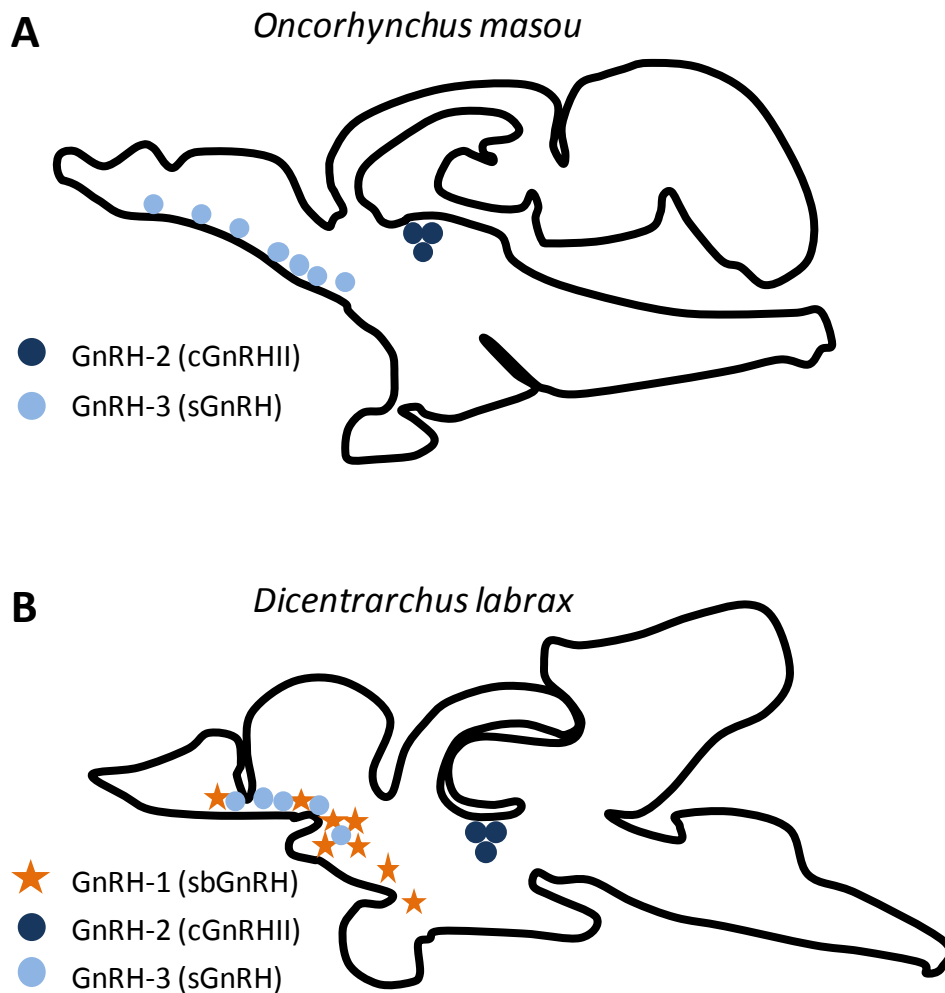
Ainsi, l'ensemble des variants de la GnRH ont été regroupés en trois types de GnRH (GnRH-1, GnRH-2 et GnRH-3).

**Tableau III** : Séquences peptidiques des 14 variants de la GnRH identifiés chez les vertébrés.  
★ : Variants de GnRH des téléostéens.

Variants		Séquences peptidiques										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
mammalian GnRH (mGnRH)	GnRH1	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Arg	Pro	Gly-NH2	★
medaka GnRH (mdGnRH)	GnRH1	pGlu	His	Trp	Ser	Phe	Gly	Leu	Ser	Pro	Gly-NH2	★
seabream GnRH (sbGnRH)	GnRH1	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Ser	Pro	Gly-NH2	★
catfish GnRH (cfGnRH)	GnRH1	pGlu	His	Trp	Ser	His	Gly	Leu	Asn	Pro	Gly-NH2	★
herring GnRH (hrGnRH)	GnRH1	pGlu	His	Trp	Ser	His	Gly	Leu	Ser	Pro	Gly-NH2	★
whitefish GnRH (wfGnRH)	GnRH1	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Met	Asn	Pro	Gly-NH2	★
chicken GnRH-II (cGnRH-II)	GnRH2	pGlu	His	Trp	Ser	His	Gly	Trp	Tyr	Pro	Gly-NH2	★
salmon GnRH (sGnRH)	GnRH3	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Trp	Leu	Pro	Gly-NH2	★
chicken GnRH-I (cGnRH-I)	GnRH1	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Gln	Pro	Gly-NH2	
guinea pig GnRH (gpGnRH)	GnRH1	pGlu	Tyr	Trp	Ser	Tyr	Gly	Val	Arg	Pro	Gly-NH2	
frog GnRH (frGnRH)	GnRH1	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Trp	Pro	Gly-NH2	
dogfish GnRH (dfGnRH)	?	pGlu	His	Trp	Ser	His	Gly	Trp	Leu	Pro	Gly-NH2	
lamprey GnRH-I (lGnRH-I)	?	pGlu	His	Tyr	Ser	Leu	Glu	Trp	Lys	Pro	Gly-NH2	
lamprey GnRH-III (lGnRH-III)	?	pGlu	His	Trp	Ser	His	Asp	Trp	Lys	Pro	Gly-NH2	

## II.2 Gènes et structure de la GnRH

Tous les gènes codant la GnRH possèdent une structure de base commune (**Figure 3, A**) (Seeburg and Adelman 1984). Il s'agit de quatre exons séparés par trois introns codant pour un précurseur appelé prépro-GnRH (**Figure 3, B**). Le premier exon code pour une partie 5' non traduite, le second pour le peptide signal de la GnRH permettant le transfert de la protéine dans le réticulum endoplasmique, ce second exon code également pour le décapeptide de la GnRH, le site de clivage protéolytique G-K-R (glycine, lysine, arginine) et la région amino terminale du peptide associé à la GnRH (GAP, GnRH-associated peptide). Le troisième exon code pour la partie centrale du GAP et le quatrième exon pour la région carboxy terminale du GAP ainsi que la partie 3' non traduite. Lors de la maturation du prépro-GnRH, le peptide signal est éliminé puis la GnRH est séparée du GAP par clivage au niveau du site G-K-R.



**Figure 4 : Représentation schématique de la distribution cérébrale des variants de la GnRH chez deux espèces de poissons téléostéens (Adapté d'après Lethimonier et al. 2004). A : Distribution des variants GnRH-2 et GnRH-3 dans le cerveau du saumon *Oncorhynchus masou*. B : Distribution des variants GnRH-1, GnRH-2 et GnRH-3 dans le cerveau du bar (*Dicentrarchus labrax*).**

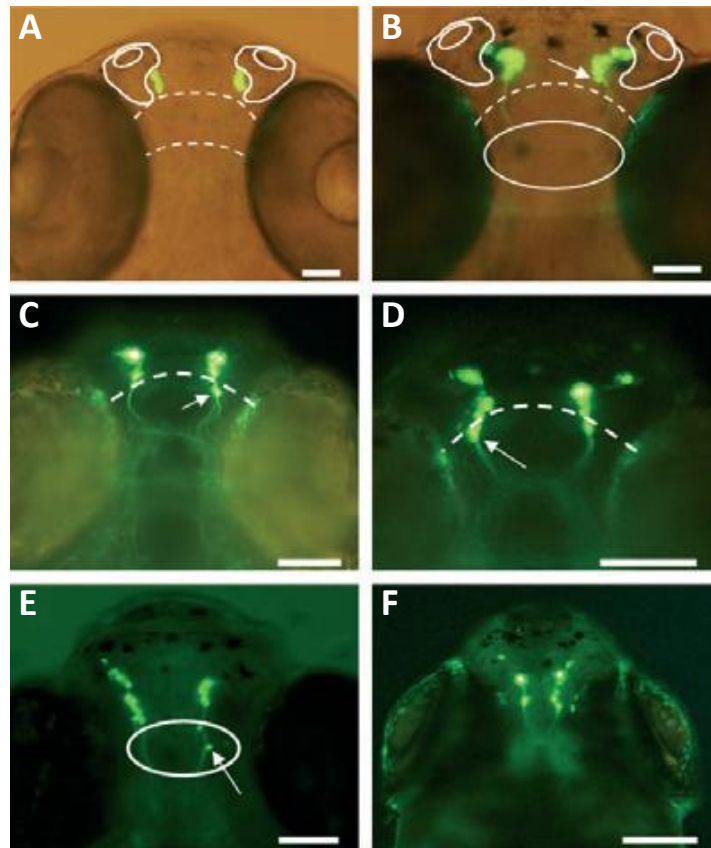
Le décapeptide est ensuite modifié par amidation de la glycine C-terminale et cyclisation de la glutamine N-terminale en pyroglutamate, ces modifications post-traductionnelles lui confèrent une résistance à la dégradation par des protéases. La GnRH et le GAP sont concentrés dans des granules de sécrétion et transportés vers les terminaisons axonales pour être sécrétés (Rangaraju et al. 1991).

### II.3 Distribution et fonction des variants de la GnRH

Chez les téléostéens, suivant l'espèce, deux ou trois variants de la GnRH sont co-exprimés (Amano et al. 1991; Gothilf et al. 1996; Powell et al. 1994). Ces variants sont codés par des gènes distincts, résultats probables de la duplication d'un gène ancestral au cours de l'évolution (Kah et al. 2007). Ils s'expriment dans des régions cérébrales différentes et présentent des fonctions spécifiques.

Ainsi la GnRH de type 1 correspond aux variants de la GnRH localisés principalement dans l'hypothalamus, et est impliquée dans la fonction hypophysiotrope. La GnRH de type 2 correspond à l'unique variant cGnRH-II. Elle est présente chez tous les vertébrés et s'exprime à la frontière entre le diencephale et le mésencéphale. Son rôle est moins connu même si des fonctions dans le comportement sexuel (Volkoff and Peter 1999) et dans la modulation de la fonction pinéale (Servili et al. 2010) lui sont attribuées.

Enfin la GnRH de type 3, présente uniquement chez les téléostéens, correspond à la forme sGnRH. La fonction et la distribution neuroanatomique de la GnRH-3 varie suivant les espèces. Ainsi chez les espèces à deux variants de GnRH, cette forme remplit la fonction hypophysiotrope et s'exprime au niveau du nerf terminal, du télencéphale et de l'hypothalamus (Kobayashi et al. 1997; Steven et al. 2003). En revanche, chez les espèces à trois variants de GnRH, la GnRH-3 s'exprime principalement au niveau du nerf terminal. Dans ce cas la GnRH-3 apparaît moins impliquée dans la fonction hypophysiotrope et pourrait avoir un rôle dans le comportement sexuel (Yamamoto et al. 1997) et l'olfaction (Wirsig-Wiechmann 2001). La **Figure 4** présente la distribution neuroanatomique des variants de la GnRH du saumon *Oncorhynchus masou*, espèce à deux variants de GnRH (**Figure 4, A**), et du bar (*Dicentrarchus labrax*), espèce à trois variants de GnRH (**Figure 4, B**).



**Figure 5 : Développement des neurones à GnRH-3 chez le poisson zèbre Tg *GnRH3:EGFP* (d'après Abraham et al. 2008).** A : A 3 jours post-fécondation (jpf), les neurones sont détectés à proximité des organes olfactifs. B : Les neurones migrent le long du nerf terminal (flèche) en direction du télencéphale (5 jpf). C-D : Les neurones atteignent le télencéphale (flèches) et poursuivent leur migration ventralement (6 jpf et 8 jpf). E : A 12 jpf, les premiers corps cellulaires atteignent la région préoptique et l'hypothalamus (flèche). F : A 30 jpf la migration est terminée, les neurones forment un continuum de la région olfactive à l'hypothalamus. Traits pleins : organes olfactifs ; traits pointillés : bordure de la région télencéphalique ; ellipse : région hypothalamique. Echelle : A-B = 50 $\mu$ m ; C-E = 100 $\mu$ m ; F= 500 $\mu$ m.



## II.4 Ontogenèse des neurones à GnRH

Les différentes populations de neurones à GnRH présentent une origine embryologique distincte. Les neurones qui expriment la GnRH-2 ont une origine cérébrale. Ils apparaissent au niveau du primordium synencéphalique à la transition entre le diencéphale et le mésencéphale (González-Martínez et al. 2002; Palevitch et al. 2007; Pandolfi et al. 2002; Parhar et al. 1998; White and Fernald 1998).

En revanche, les neurones qui expriment la GnRH-1 et GnRH-3 ont une origine tout à fait différente puisqu'ils apparaissent à l'extérieur du cerveau, au niveau de la placode olfactive. Le développement des neurones à GnRH-1 a été largement étudié chez les mammifères (pour revue, Wray 2010). Au cours du développement embryonnaire, ces neurones migrent de la placode olfactive vers le cerveau antérieur le long du nerf voméronasal et du nerf terminal. Ils traversent la lame criblée de l'ethmoïde pour atteindre le télencéphale puis l'aire préoptique et l'hypothalamus. Ces neurones, quelque soit leur localisation finale, projettent des axones en direction de l'éminence médiane où ils accèdent au système porte hypothalamo-hypophysaire. Chez les mammifères, la vitesse de migration de ces neurones est rapide puisqu'elle est comprise entre 13 et 20  $\mu\text{m}$  par heure.

Chez les poissons téléostéens, l'ontogenèse des neurones à GnRH-1 et GnRH-3 a été étudiée chez de nombreuses espèces et révèlent un développement comparable à celui des mammifères (Abraham et al. 2008; Amano et al. 1998; Chiba et al. 1994; González-Martínez et al. 2002; Okubo et al. 2006; Palevitch et al. 2007; Pandolfi et al. 2002).

Chez le poisson zèbre, l'utilisation du modèle transgénique exprimant la protéine fluorescente EGFP (enhanced green fluorescent protein) sous le contrôle du promoteur de la GnRH-3 (*Tg GnRH3:EGFP*) a récemment permis de décrire la migration des neurones à GnRH-3 (Abraham et al. 2008; Palevitch et al. 2007).

Ces neurones sont initialement détectés au niveau des placodes olfactives (**Figure 5, A**), puis ils migrent le long du nerf terminal en direction des bulbes olfactifs (**Figure 5, B**). Les corps cellulaires de ces neurones émettent des projections bilatérales vers le télencéphale qui s'étendent ensuite ipsilatéralement et contralatéralement vers les territoires hypothalamiques (**Figure 5, C**). Les neurones suivent cette voie axonale et atteignent le télencéphale ventral (**Figure 5 C, D**) avant de poursuivre leur migration en direction de la région préoptique et de l'hypothalamus caudal (**Figure 5 E, F**). A la différence des mammifères, ces neurones projettent des axones directement dans l'hypophyse.

Chez le poisson zèbre, la vitesse de migration des neurones à GnRH-3 est beaucoup plus lente que chez les mammifères puisqu'elle atteint au maximum 1  $\mu\text{m}$  par heure (Abraham et al. 2008).

De nombreuses études, principalement menées chez les mammifères, ont montré que le processus de migration des neurones à GnRH est régulé par de multiples facteurs. Parmi ces facteurs figurent des neurotransmetteurs et des neuropeptides tels que la cholécystokine, le glutamate, le GABA, la sérotonine mais également la GnRH elle-même (Cariboni et al. 2007; Tobet and Schwarting 2006; Wray 2010). De nombreux facteurs chimiotactiques tels que la nétrine-1, les sémaphorines, la chimiokine SDF-1 et son récepteur CXCR4, participent également au processus de migration des neurones à GnRH. On compte aussi des protéines d'adhésions (NCAM, anosmine-1), le facteur NELF (nasal embryonic LHRH factor), des facteurs de croissance (FGF) et de nombreux facteurs de transcriptions (Cariboni et al. 2007; Tobet and Schwarting 2006; Wray 2010). La plupart de ces facteurs agissent sur les neurones à GnRH via des voies de transduction impliquant des cascades de phosphorylations ou des canaux calciques voltage-dépendants (Tobet and Schwarting 2006). Ces signaux vont soit réguler la transcription de gènes, soit induire des changements au niveau du cytosquelette qui sont à la base des mouvements de migration cellulaire (Tobet and Schwarting 2006).

Chez les poissons téléostéens il existe pour le moment peu d'information sur les facteurs qui régulent la migration des neurones à GnRH. Chez le poisson zèbre, de récentes études d'inactivations partielles de gènes (par knock-down) ont permis de montrer que le facteur NELF, la protéine d'adhésion anosmine-1a ainsi que la chimiokine *cxc112a* et son récepteur *cxc4b* sont impliqués dans la migration des neurones à GnRH-3 (Palevitch et al. 2009; Palevitch et al. 2010; Whitlock et al. 2005). De même, la GnRH-3 elle-même a été identifiée comme un facteur autocrine important pour la migration (Abraham et al. 2008).

La mutation ou l'inactivation de certains gènes codant pour ces facteurs impliqués dans la migration des neurones à GnRH altère le développement du système GnRH et par conséquent perturbe la fonction de reproduction. Chez l'Homme, le syndrome de Kallmann correspond à un défaut de migration des neurones à GnRH. A ce jour, cinq gènes responsables de ce syndrome ont été identifiés parmi lesquels le gène *KALI* codant pour l'anosmine-1 (Soussi-Yanicostas et al. 1996). Chez le poisson zèbre et le médaka, l'inactivation partielle des gènes orthologues du gène *KALI*, (*kalla* et *kall.1* respectivement) se traduit également par un défaut de migration des neurones à GnRH (Okubo et al. 2006; Whitlock et al. 2005).

Chez l'Homme, le syndrome de Kallmann se traduit par un désordre de la fonction gonadique lié à une déficience en gonadotropines (hypogonadisme hypogonadotrope) (Schwanzel-Fukuda et al. 1989). **Ainsi, le processus de migration des neurones à GnRH est une étape critique du développement embryonnaire dont dépend l'avenir reproducteur de l'individu.**

## II.5 Les récepteurs de la GnRH

Les effets biologiques de la GnRH sur les tissus cibles sont médiés par des récepteurs spécifiques à la GnRH : les GnRH-Rs. Le premier GnRH-R a été cloné chez la souris sur une lignée cellulaire gonadotrope (Reinhart et al. 1992; Tsutsumi et al. 1992) puis ce récepteur a été identifié chez de nombreuses autres espèces de vertébrés. La présence de plusieurs formes de la GnRH laissait préfigurer l'existence de plusieurs formes de GnRH-Rs au sein d'une même espèce. Ainsi chez les téléostéens, deux formes de récepteurs de la GnRH ont été identifiés chez le poisson rouge, *Carassius auratus* (Illing et al. 1999) et le poisson-chat africain, *Clarias gariepinus* (Bogerd et al. 2002), trois chez le médaka, *Oryzias latipes* (Okubo et al. 2003) et le tilapia, *Oreochromis niloticus* (Parhar et al. 2005), quatre chez le poisson zèbre, *Danio rerio* (Tello et al. 2008) et même cinq chez le bar, *Dicentrarchus labrax* (Moncaut et al. 2005).

Les récepteurs de la GnRH appartiennent à la superfamille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G et ils présentent une structure de base commune : un domaine N-terminal extracellulaire, sept domaines transmembranaires en hélice  $\alpha$  reliés par des boucles hydrophiles intra et extracellulaires, un domaine C-terminal cytoplasmique. L'interaction hormone-récepteur est assurée par le domaine extracellulaire et les régions transmembranaires.

Comme pour les variants de la GnRH, les GnRH-Rs ont été classés selon des critères phylogénétiques et structuraux. Ainsi, l'ensemble de ces récepteurs a été regroupé en deux principaux types : le type I correspondant aux récepteurs dépourvus de queue C-terminale intracytoplasmique et le type II regroupant les récepteurs dotés d'une queue C-terminale (Guilgur et al. 2006; Kah et al. 2007). Ces GnRH-Rs possèdent des affinités variables pour les ligands GnRHs avec, de manière surprenante, une plus forte affinité pour la GnRH de type 2 dont le rôle, rappelons-le, ne semble pas lié à la fonction hypophysiotrope (pour revue, Kah et al. 2007).

Chez les téléostéens, les GnRH-Rs s'expriment principalement dans le cerveau et l'hypophyse. Au niveau hypophysaire, ces récepteurs s'expriment dans les cellules gonadotropes mais ils ont également été mis en évidence dans les cellules lactotropes, somatotropes, thyrotropes, corticotropes, mélanotropes et somato-lactotropes (Illing et al. 1999; Pandolfi et al. 2005). De plus, la distribution tissulaire des GnRH-Rs ne se limite pas au système nerveux central et à l'hypophyse. Ainsi, ces récepteurs s'expriment également dans les gonades (Bogerd et al. 2002; Tello et al. 2008) mais aussi au niveau des branchies, des reins (Jodo et al. 2003; Moncaut et al. 2005) et des yeux (Madigou et al. 2000; Tello et al. 2008). Cette expression étendue des récepteurs à la GnRH laisse entrevoir un rôle plus large de la GnRH que sa seule implication dans la régulation de l'axe hypothalamo-hypophysogonadique.

## II.6 Régulations de la synthèse et de la sécrétion de la GnRH

L'activité des neurones à GnRH est régulée par de nombreux facteurs excitateurs et inhibiteurs. Chez les téléostéens, ces mécanismes de régulation sont loin d'être aussi bien élucidés que chez les mammifères mais un certain nombre de facteurs ont été identifiés, notamment grâce à des études réalisées chez le poisson rouge, *Carassius auratus* (pour revue, Trudeau 1997).

Les neurones à GnRH sont en grande partie régulés par des rétrocontrôles exercés par les stéroïdes gonadiques. Chez le poisson, plusieurs travaux ont mis en évidence l'existence de ces rétrocontrôles pouvant être positifs ou négatifs suivant le statut reproducteur des individus. En ce qui concerne le rétrocontrôle négatif, une étude chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) en phase de prévitellogenèse a montré que l'œstradiol diminue l'expression des ARN messagers codant pour la GnRH (Vacher et al. 2002). Plus récemment, une étude similaire a mis en évidence que l'œstradiol mais également la testostérone régulent négativement l'expression du gène *sGnRH* chez la truite arc-en-ciel (Vetillard et al. 2006). De même, chez le mâle tilapia (*Oreochromis niloticus*), la testostérone diminue l'expression des ARN messagers de GnRH dans l'aire préoptique (Soga et al. 1998).

Chez plusieurs espèces de poissons, ces stéroïdes ont également un effet stimulateur sur l'expression de la GnRH (Amano et al. 1994; Breton and Sambroni 1996; Dubois et al. 1998; Trudeau 1997) supportant ainsi l'existence de rétrocontrôles positifs sur les neurones à GnRH.

Ces régulations par les hormones stéroïdes ne semblent pas s'exercer directement sur les neurones à GnRH. En effet, les récepteurs aux hormones stéroïdes, notamment les récepteurs nucléaires des œstrogènes, ne s'expriment pas dans les neurones à GnRH (Navas et al. 1995). Ainsi les rétrocontrôles exercés par des stéroïdes gonadiques impliquent des niveaux de régulation intermédiaires, sensibles aux stéroïdes. Des neurones de types peptidergiques, aminergiques et gabaergique ont été identifiés comme acteurs clés dans la transmission de l'information stéroïdienne aux neurones à GnRH (Peng et al. 1994; Trudeau et al. 1993a; Trudeau et al. 1993b).

Les régulations directes qui s'exercent sur les neurones à GnRH sont médiées principalement par des neuropeptides et des neurotransmetteurs. Chez les poissons, la dopamine (DA) est le seul neurotransmetteur connu pour exercer un effet inhibiteur sur la sécrétion de LH basale et induite par la GnRH (Trudeau 1997). Chez le poisson rouge, la DA inhibe la libération de la GnRH à la fois au niveau de l'hypothalamus en agissant sur les corps cellulaires des neurones à GnRH via les récepteurs D1 et également au niveau de l'hypophyse via les récepteurs D2 présents sur les terminaisons nerveuses à GnRH (Yu and Peter 1990; Yu and Peter 1992). La DA module également la sensibilité hypophysaire à la GnRH en régulant négativement la synthèse des récepteurs à la GnRH (Levavi-Sivan et al. 2004) et la capacité de liaison de la GnRH à ses récepteurs (De Leeuw et al. 1989). La DA est également capable d'inhiber l'action stimulatrice de certains facteurs tel que le GABA (Trudeau 1997) ou le neuropeptide Y (Peng et al. 1993a). Il a été montré que les hormones stéroïdes régulent positivement l'activité de la dopamine (Trudeau et al. 1993b). La DA semble donc constituer un médiateur clé du rétrocontrôle négatif des hormones stéroïdes.

Contrairement à la dopamine, de nombreux neurotransmetteurs et neuropeptides sont connus pour stimuler le système GnRH chez les téléostéens. Ainsi, parmi les neurotransmetteurs excitateurs, la noradrénaline, en plus de stimuler directement la libération de LH par les cellules hypophysaires (Chang et al. 1991; Linard et al. 1995; Senthilkumaran and Joy 1996), agit sur les neurones à GnRH hypothalamiques en stimulant la libération de la GnRH via les récepteurs  $\alpha$ -1-like (Yu and Peter 1992; Yu et al. 1991).

De la même façon, la sérotonine (5-hydroxytryptamine, 5HT) a un effet stimulateur sur la sécrétion de GnRH au niveau de l'hypothalamus et de l'hypophyse chez le poisson rouge, *Carassius auratus* (Yu et al. 1991) et uniquement au niveau hypothalamique chez la dorade japonaise, *Pagrus major* (Senthilkumaran et al. 2001). Ces effets stimulateurs de la 5HT

semblent médiés par les récepteurs 5-HT<sub>2</sub> car ils sont inhibés en présence de kétansérine, antagoniste des récepteurs 5-HT<sub>2</sub> (Senthilkumaran et al. 2001).

Le glutamate et ses dérivés sont également connus pour leur action stimulatrice. Chez la truite arc-en-ciel, une étude a montré que le glutamate stimule la libération de la LH via la stimulation de la libération de la GnRH (Flett et al. 1994). L'action du glutamate sur les neurones à GnRH passe visiblement par les récepteurs NMDA.

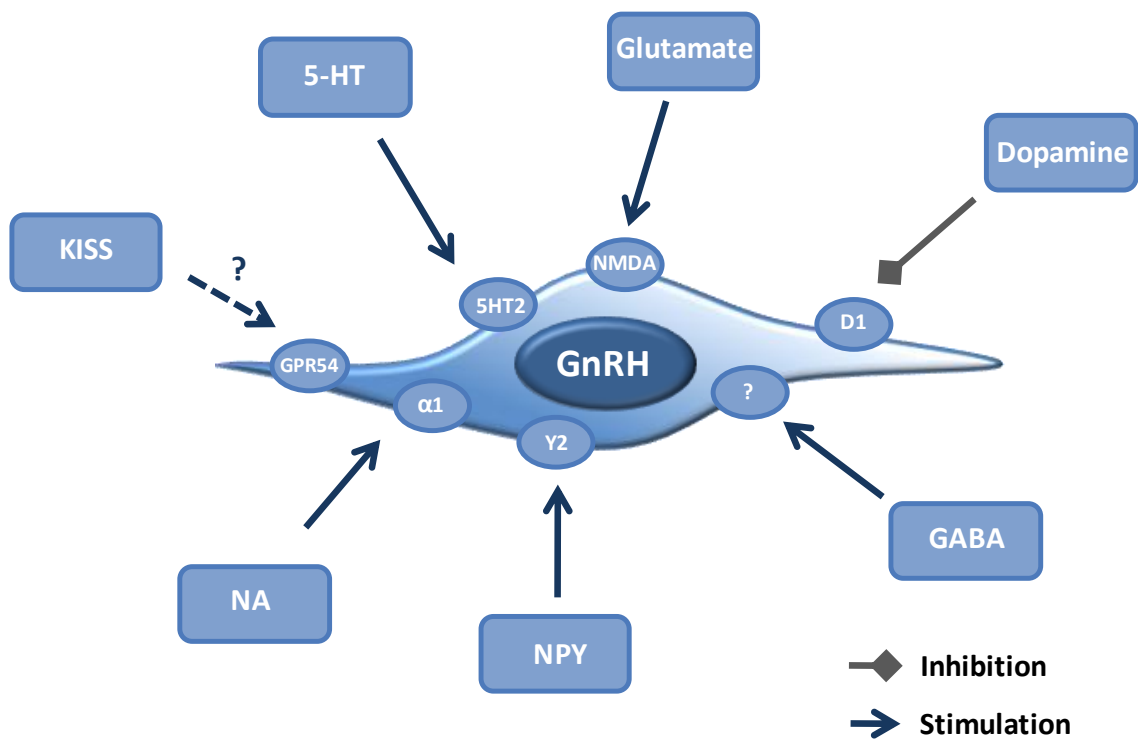
Le neuropeptide Y (NPY) a été identifié depuis longtemps comme étant impliqué dans la régulation la libération de la LH (Breton et al. 1989; Kah et al. 1989). Chez le poisson rouge (*Carassius auratus*), *in vitro*, le NPY stimule la production de LH en agissant à la fois directement sur les cellules gonadotropes hypophysaires et indirectement en stimulant la libération de la GnRH (Peng et al. 1993a). Cette stimulation des neurones à GnRH fait vraisemblablement intervenir les récepteurs de type Y<sub>2</sub> et s'exerce à la fois au niveau des corps cellulaires hypothalamiques et des terminaisons nerveuses hypophysaires (Peng et al. 1993a). De la même manière, une étude *in vitro* menée chez la dorade japonaise (*Pagrus major*) a montré l'effet stimulateur du NPY sur libération de la GnRH au niveau de l'hypothalamus et de l'hypophyse (Senthilkumaran et al. 2001). Il est intéressant de noter que l'action du NPY semble dépendante de l'environnement stéroïdien (Breton et al. 1989; Peng et al. 1993b). Chez le poisson rouge par exemple, elle est potentialisée par la testostérone et l'œstradiol (Peng et al. 1993b). De même, un traitement préalable avec ces deux hormones stéroïdes induit une augmentation du niveau d'expression des ARNm codants pour le NPY dans les neurones préoptiques (Peng et al. 1994). Ces dernières données suggèrent une implication du NPY dans la transmission du rétrocontrôle positif des hormones stéroïdes.

De la même façon, le GABA, acide  $\gamma$ -aminobutyrique, est connu pour stimuler la libération hypophysaire de LH chez plusieurs espèces de téléostéens (Kah et al. 1992; Khan and Thomas 1999; Trudeau et al. 1993a). Chez le poisson rouge, cette stimulation est associée à une augmentation de la libération de la GnRH (Kah et al. 1992). Une autre étude réalisée chez la dorade japonaise a montré que, *in vitro*, le GABA stimule la libération de la sbGnRH au niveau hypothalamique (Senthilkumaran et al. 2001). Chez la truite arc-en-ciel, le GABA a une action stimulatrice sur la sécrétion de LH mais également de FSH qui serait en partie liée à une potentialisation des effets de la sGnRH (Mananos et al. 1999). De façon intéressante, il semblerait que l'action stimulatrice du GABA passe également par la diminution de l'effet inhibiteur de la dopamine (Trudeau et al. 1993a). Les effets du GABA sont variables selon

l'espèce, le statut reproducteur des poissons mais également l'environnement stéroïdien (Kah et al. 1992; Mananos et al. 1999; Trudeau et al. 1993a). A titre d'exemple, chez le poisson rouge en régression gonadique, la testostérone et la progestérone diminuent le niveau de synthèse hypophysaire du GABA et l'œstradiol l'augmente (Trudeau et al. 1993a). Le GABA, de par cette sensibilité aux stéroïdes, semble donc, lui aussi, participer à la transmission des rétrocontrôles stéroïdiens.

Chez les mammifères, de nombreux autres facteurs impliqués dans la régulation des neurones à GnRH ont été identifiés. Parmi eux, des neurotransmetteurs (Dudas and Merchenthaler 2006), des neuropeptides dont la GnRH elle-même (Depaolo et al. 1987), des composés gazeux tel que le monoxyde d'azote (Prevot et al. 1999). De manière intéressante, les cellules gliales (astrocytes, tanocytes) jouent également un rôle important dans la régulation de la GnRH. Ces cellules, sensibles aux hormones stéroïdes, libèrent des facteurs (TGFs, FGF, IGF-I, prostaglandines) qui régulent l'activité des neurones à GnRH (Garcia-Segura and McCarthy 2004; Prevot 2002). Chez les téléostéens, l'implication de ces différents facteurs dans la régulation de l'activité des neurones à GnRH reste à déterminer.

Récemment, un nouvel acteur clé dans la régulation de la GnRH a été identifié : il s'agit du peptide Kiss (Kisspeptine) et de son récepteur GPR54. Chez les mammifères, il est maintenant clairement établi que la voie de signalisation Kiss/GPR54 joue un rôle majeur dans l'initiation de la puberté et la fonction de reproduction en régulant la libération de la GnRH (pour revue, Roa et al. 2008). Plusieurs peptides Kiss ont été identifiés chez les mammifères et ils sont tous issus d'un précurseur codé par le gène *Kiss1*. Ce gène s'exprime principalement dans des neurones hypothalamiques au niveau de l'aire préoptique et du noyau arqué (Kinoshita et al. 2005; Smith et al. 2005). L'expression de Kiss est fortement régulée par les hormones stéroïdes, notamment par l'œstradiol (pour revue, Smith et al. 2006). Les récepteurs des œstrogènes s'expriment dans les neurones Kiss (Franceschini et al. 2006) et de manière intéressante le récepteur GPR54 s'exprime à la surface des neurones à GnRH (Irwig et al. 2004; Messenger et al. 2005). L'ensemble de ces données démontre clairement que le Kiss est un acteur important dans la transmission du signal œstrogénique aux neurones à GnRH.



**Figure 6 : Les régulations de la GnRH chez les poissons téléostéens (Adapté d'après Trudeau et al. 1997).** 5HT : 5-hydroxytryptamine, 5HT2 : récepteur de la 5-hydroxytryptamine de type 2, NA : noradrénaline,  $\alpha 1$  : récepteur noradrénergique de type alpha-1, NPY : neuropeptide Y, Y2 : récepteur du neuropeptide Y de type 2, GABA, acide  $\gamma$ -aminobutyrique, D1 : récepteur de la dopamine de type 1, KISS : Kisspeptine, GPR54 : récepteur du kisspeptine (récepteur couplé aux protéines G).



Chez les poissons téléostéens, le Kiss a été identifié chez plusieurs espèces telles que le poisson zèbre (Biran et al. 2008; van Aerle et al. 2008), le médaka (Kanda et al. 2008), le bar (Felip et al. 2009) et plus récemment, le poisson rouge (Yang et al. 2010).

Contrairement aux mammifères, deux gènes Kiss ont été mis en évidence chez les poissons (Felip et al. 2009; Kitahashi et al. 2009) le gène *Kiss1* codant pour un peptide identique à celui des mammifère et le gène *Kiss2*, résultat de la duplication du gène Kiss, spécifique des vertébrés non-placentaires. L'implication de ces deux Kiss dans le contrôle de la fonction de reproduction a été récemment mise en évidence chez le bar (Felip et al. 2009). Cependant, le lien entre le système Kiss et le système GnRH n'est pas encore démontré même si la présence de GRP54 sur les neurones à GnRH suggère de potentielles interactions (Parhar et al. 2004).

**L'activité des neurones à GnRH est donc finement régulée par de nombreux réseaux du système nerveux central (Figure 6). Ces régulations, qu'elles soient directes ou indirectes, sont cruciales pour assurer le fonctionnement et l'équilibre de l'axe reproducteur.**

## II.7 Perturbateurs endocriniens et GnRH

En raison de la place centrale du système à GnRH dans le contrôle de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique et étant donné les importantes régulations auxquelles sont soumis le développement et l'activité des neurones à GnRH, notamment par les hormones stéroïdes sexuelles, le système à GnRH apparaît comme une cible potentielle des perturbateurs endocriniens. Cependant, l'étude des effets des composés PE sur les neurones à GnRH n'a fait l'objet que de peu de travaux jusqu'à très récemment. Ainsi cette problématique est-elle peu documentée chez les vertébrés, notamment chez les poissons téléostéens.

Des travaux *in vitro*, menés sur la lignée de neurones à GnRH hypothalamique GT1-7 ont montré que les PCBs Aroclor 1221 et Aroclor 1254 (Dickerson et al. 2009; Gore et al. 2002), les pesticides organochlorés tels que le méthoxychlore et le chlorpyrifos (Gore 2002) et les phyto-œstrogènes (Bowe et al. 2003) affectent l'expression du gène de la GnRH, la libération du peptide et également la morphologie des cellules GT1-7. De même, des études réalisées sur des modèles de culture d'explants hypothalamiques de rat ont montrés que le DDT et le bisphénol A stimulent la fréquence de la libération pulsatile de la GnRH (Rasier et al. 2008; Rasier et al. 2007).

**Tableau IV** : Effets des perturbateurs endocriniens sur le système à GnRH chez différentes espèces de mammifères, oiseaux et poissons.

Composés	Espèces	Exposition	Effets	Références
<b>EQ; GEN</b>	Rat	Néonatale	⬇ activation des neurones à GnRH dans l'aire préoptique	(Bateman and Patisaul 2008)
<b>DDT</b>	Rat	Néonatale	↗ fréquence de sécrétion pulsatile de GnRH	(Rasier et al. 2007)
<b>BPA</b>	Rat	Néonatale	↗ fréquence de sécrétion pulsatile de GnRH	(Fernandez et al. 2009)
<b>COU</b>	Rat	Adulte	⬇ fréquence de sécrétion pulsatile de GnRH	(McGarvey et al. 2001)
<b>BPA; MXC</b>	Mouton	Fœtale	⬇ ARNm GnRH	(Mahoney and Padmanabhan 2010)
<b>MIX</b>	Mouton	Fœtale	⬇ ARNm GnRH dans l'hypothalamus ⬇ ARNm GnRH-R	(Bellingham et al. 2010)
<b>TCDD</b>	Rat	Fœtale	↗ du contenu hypothalamique en GnRH ⬇ libération de GnRH (explants hypothalamiques)	(Clements et al. 2009)
<b>VIN</b>	Lapin	Fœtale	⬇ nombre de neurones GnRH-1 dans l' OVLT	(Bisenius et al. 2006)
<b>PCB-126; VIN</b>	Caille	Embryonnaire	⬇ du contenu hypothalamique en GnRH chez le jeune	(Ottinger et al. 2009)
<b>MXC</b>	Caille	Embryonnaire	↗ du contenu hypothalamique en GnRH chez le jeune et l'adulte	(Ottinger et al. 2009)
<b>PCB</b>	Tambour brésilien	Adulte	⬇ du contenu hypothalamique en GnRH	(Khan and Thomas 2001)
<b>NP</b>	Truite	Juvenile	⬇ ARNm GnRH dans l'hypothalamus	(Vetillard and Bailhache 2006)

**EQ**: Equol; **GE**: Génistéine; **DDT**: Dichlorodiphényltrichloroéthane ; **BPA**: Bisphénol A; **COU** : Coumestrol ; **MXC** : Méthoxychlore ; **TCDD** : Tétrachlorodibenzo-para-dioxine ; **VIN** : Vinclozoline ; **NP** : 4-n-Nonylphénol ; **MIX** : mixture de composés présents dans des boues d'épuration ; **PCB** : Aroclor 1254. OVLT : organe vasculaire de la lame terminale.

Tambour brésilien, *Micropogonias undulatus* ; Truite arc-en-ciel, *Oncorhynchus mykiss*.

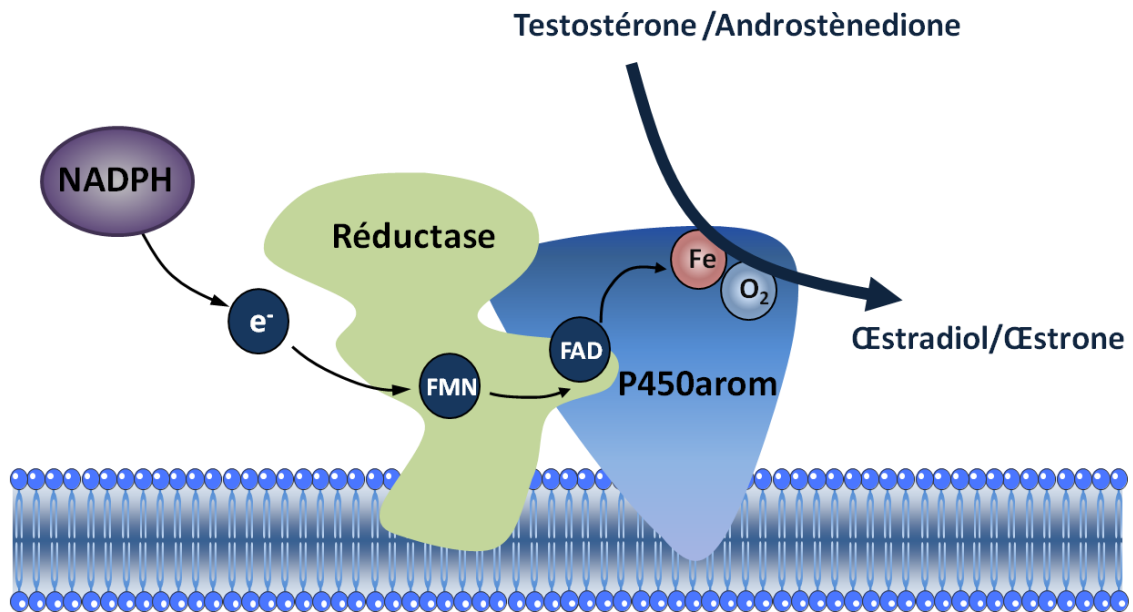
*In vivo*, les effets des PE sur le système à GnRH ont été étudiés chez différentes espèces de mammifères, d'oiseaux et de poissons (**Tableau IV**).

Chez les mammifères, des travaux ont montré que des composés PE tels que des phytoœstrogènes, des contaminants industriels, des pesticides et des fongicides, sont capables d'altérer l'activation des neurones à GnRH (Bateman and Patisaul 2008), la libération de la GnRH (Clements et al. 2009; Fernandez et al. 2009; McGarvey et al. 2001; Rasier et al. 2007), l'expression du gène de la GnRH (Bellingham et al. 2010; Mahoney and Padmanabhan 2010), mais également le nombre de neurones à GnRH (Bisenius et al. 2006).

Chez les oiseaux, des études réalisées chez la caille du Japon ont montré que l'exposition embryonnaire à des composés PE tels que la vinclozoline, le PCB-126 et le méthoxychlore affectent de manière significative le contenu hypothalamique en GnRH chez le jeune et parfois même chez l'adulte (Ottinger et al. 2009).

Chez les poissons téléostéens, les travaux portant sur l'effet des PE sur le système à GnRH sont rares. Une étude menée chez le tambour brésilien a montré que l'exposition à l'aroclor 1254 induit une diminution du contenu hypothalamique en GnRH ainsi qu'une réduction des récepteurs à GnRH hypophysaire (Khan and Thomas 2001).

L'ensemble ces travaux montre clairement que **le système à GnRH est une cible des perturbateurs endocriniens**. Dans la plupart des études *in vivo*, les expositions aux PE ont été menés au cours de stades précoces (embryonnaire, fœtal, néonatal). Ces stades constituent vraisemblablement des fenêtres critiques d'exposition. Cependant, chez les poissons ces périodes développementales n'ont pas été explorées et pourraient s'avérer sensibles notamment pour les espèces ovipares qui sont particulièrement vulnérables aux changements environnementaux. **L'étude des effets des PE sur les neurones à GnRH constitue donc un champ d'investigation important qu'il était urgent d'approfondir, notamment chez les poissons téléostéens.**



**Figure 7 : Représentation schématique du complexe enzymatique cytochrome P450 arom et NADPH cytochrome P450 réductase (Adapté d'après Conley et Hinshelwood, 2001).** Le complexe enzymatique permet la conversion de la testostérone et de l'androstènedione en œstradiol et œstrone respectivement. Réductase : NADPH cytochrome P450 réductase ; P450 arom : cytochrome P450 arom ; NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate ; e<sup>-</sup> : électrons issus de la réduction du NADPH ; FMN: flavine mononucléotide ; FAD: flavine adénine dinucléotide; Fe : Fer ; O<sub>2</sub> ; oxygène.

### III. L'aromatase chez les poissons téléostéens

#### III.1 Le complexe enzymatique

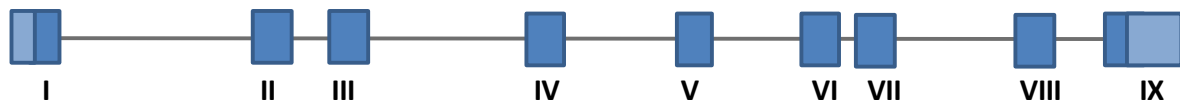
L'aromatase est une enzyme clé de la stéroïdogénèse chez les vertébrés puisqu'elle catalyse l'étape finale de la biosynthèse des œstrogènes à partir des androgènes (Conley and Hinshelwood 2001; Lephart 1996). Il s'agit d'une enzyme appartenant à la superfamille des cytochromes P450 qui forme un complexe enzymatique associant le cytochrome P450 aromatase et une flavoprotéine ubiquiste, la NADPH-cytochrome P450 réductase (**Figure 7**). Ce complexe enzymatique est situé dans le réticulum endoplasmique des cellules stéroïdogènes. L'aromatase résulte de la transformation du noyau A des androgènes C19 (testostérone, androstènedione) en une structure phénolique caractéristique des œstrogènes C18 (œstradiol, œstrone). Cette réaction irréversible implique trois oxydations successives au niveau du carbone 19 des androgènes qui aboutissent à l'élimination du radical méthyle et au réarrangement phénolique du cycle A. Dans cette réaction, la NADPH cytochrome P450 réductase assure le transfert des électrons issus du NADPH au cytochrome P450 aromatase.

#### III.2 Gènes, structures, et régulations de l'aromatase

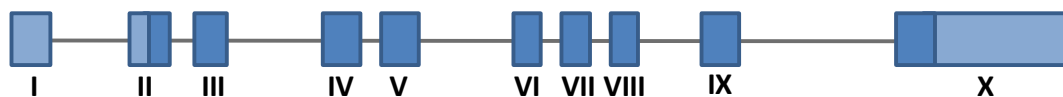
Chez la plupart des vertébrés supérieurs, l'aromatase est le produit d'un seul gène, *cyp19a1* qui s'exprime dans différents tissus, notamment la gonade et le cerveau, par l'emploi de promoteurs tissus-spécifiques (Bulun et al. 2003; Golovine et al. 2003). Le porc constitue une exception taxonomique puisque trois gènes paralogues de l'aromatase ont été décrits chez cet animal (Conley et al. 1997; Graddy et al. 2000).

Chez les poissons téléostéens, en revanche, deux gènes *cyp19a1* codant deux formes distinctes d'aromatase ont été mis en évidence chez de nombreuses espèces (pour revue, Cheshenko et al. 2008), à l'exception possible de certaines espèces d'anguilles (Ijiri et al. 2003; Tzchori et al. 2004). La présence de ces deux gènes est vraisemblablement liée à la duplication "3R" qui s'est produite dans le génome des poissons téléostéens à la fin du Dévonien, il y a 320 millions d'années (Meyer and Van de Peer 2005).

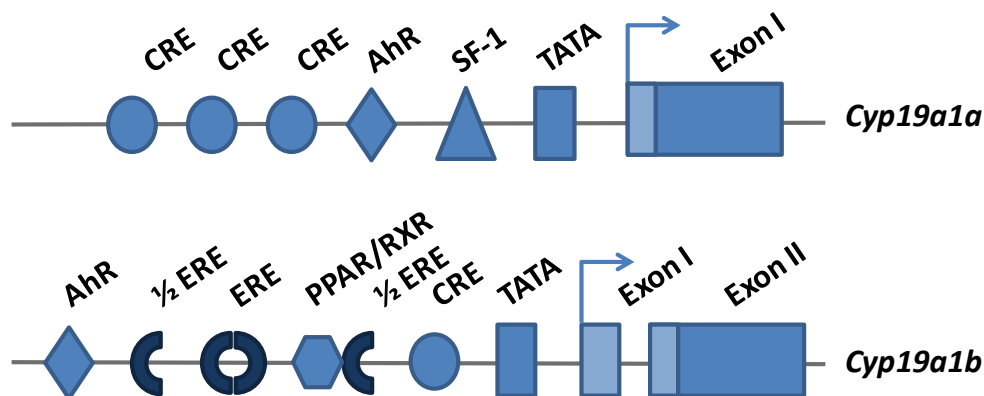
### *Cyp19a1a*



### *Cyp19a1b*



**Figure 8 : Représentation schématique de la structure des gènes *cyp19a1a* et *cyp19a1b* du poisson zèbre.** D'après Zhang *et al.* (2008). Les exons sont représentés par des rectangles bleus foncés (exons traduits) et bleus clairs (exons non traduits) et numérotés en chiffres romains. Les lignes grises correspondent aux régions introniques.



**Figure 9 : Schéma des régions promotrices des gènes de l'aromatase du poisson zèbre.** D'après Kazeto *et al.* (2003). AhR: site de liaison pour le récepteur aux aryl hydrocarbures ; CRE: élément de réponses à l'AMP cyclique ; ERE: élément de réponse aux œstrogènes ; PPAR/RXR : site de liaison pour l'hétérodimère récepteurs  $\alpha$  des proliférateurs de peroxyosomes (PPAR $\alpha$ ) et récepteur  $\alpha$  de l'acide rétinoïque 9-cis (RXR $\alpha$ ) ; SF-1 : site de liaison pour le facteur stéroïdogénique 1 ; TATA : boîte TATA.

Le gène *cyp19a1a* code l'aromatase A dont l'expression est majoritairement gonadique, et le gène *cyp19a1b* code l'aromatase B qui est, quant à elle, exprimée principalement dans le cerveau. La structure des gènes codant les aromatases A et B est bien conservée parmi les poissons. En effet, la comparaison des gènes *cyp19a1a* et *cyp19a1b* du poisson zèbre, du tilapia du Nil, et de l'anguille *Monopterus albus* met en évidence d'importantes similarités structurales (Zhang et al. 2008). La **Figure 8** représente la structure des gènes *cyp19a1a* et *cyp19a1b* du poisson zèbre. Le gène *cyp19a1a* est composé de 9 exons séparés par 8 introns. Le gène *cyp19a1b* est lui constitué de 10 exons, dont le premier est non codant, et de 9 introns.

Au sein d'une même espèce, les séquences peptidiques de l'aromatase A et de l'aromatase B présentent une homologie d'environ 60% (Blazquez and Piferrer 2004; Chiang et al. 2001b; Kishida and Callard 2001), soulignant l'évolution indépendante des gènes codant pour ces deux enzymes. De manière intéressante, la comparaison de ces séquences peptidiques entre différentes espèces révèle de plus fortes homologies. Ainsi, il y a 88% d'identité entre l'aromatase B du poisson zèbre et celle du poisson rouge (Kishida and Callard 2001). Ces homologies sont liées, en partie, à la forte conservation de certains domaines tels que la région de l'hélice I ou le domaine de liaison à l'hème.

Les régions promotrices des gènes *cyp19a1a* et *cyp19a1b* ont été étudiées chez plusieurs espèces de poissons, et révèlent différents sites putatifs de fixation pour des facteurs de transcription. Selon les études et les espèces considérées la nature de ces sites de fixation est variable (Chang et al. 2005; Kazeto et al. 2001; Kuhl et al. 2005; Nocillado et al. 2007; Piferrer and Blazquez 2005; Tong and Chung 2003; Wong et al. 2006).

La **Figure 9** représente les régions promotrices des deux gènes de l'aromatase du poisson zèbre selon Kazeto *et al.* (2003). La région promotrice du gène *cyp19a1a* contient un site de liaison pour le facteur stéroïdogénique 1 (SF-1), un site de liaison pour le récepteur aux aryl hydrocarbonés (AhR) et des éléments de réponses à l'AMP cyclique (CRE). Le promoteur du gène *cyp19a1b* contient un élément de réponse aux œstrogènes (ERE) ainsi que des demi-ERE, un site de liaison pour l'AhR, un CRE et également un site de liaison pour les récepteurs  $\alpha$  des proliférateurs de peroxyosomes (PPAR $\alpha$ ) et le récepteur  $\alpha$  de l'acide rétinoïque 9-cis (RXR $\alpha$ ).

Chez le médaka, la région promotrice du gène *cyp19a1b* contient des éléments de réponse putatifs pour des facteurs impliqués dans le développement cérébral (NBRE), dans le déterminisme sexuel (SRY/SOX) et également des sites putatifs de liaison pour les facteurs

SF-1 et LRH-1, tous deux membres de la super-famille des récepteurs nucléaires orphelins 5A (Kuhl et al. 2005; Ohmuro-Matsuyama et al. 2007).

Les régions promotrices des gènes *cyp19a1a* et *cyp19a1b* présentent donc des sites de fixation pour des facteurs de transcription de natures différentes laissant présumer des régulations différentielles de l'expression de ces deux gènes. Cependant, la fonctionnalité des sites putatifs de liaison des facteurs de transcription présents dans les régions promotrices des gènes *cyp19a1a* et *cyp19a1b* est peu documentée.

Chez le médaka, des travaux suggèrent l'implication du facteur SF-1 dans la régulation de la transcription de l'aromatase dans les follicules ovariens (Watanabe et al. 1999). De même, le facteur LRH-1 semble impliqué dans la régulation de l'expression du gène *cyp19a1b* (Ohmuro-Matsuyama et al. 2007). Les sites de liaisons pour ces facteurs sont donc vraisemblablement fonctionnels.

Chez le poisson zèbre, une étude a démontré que les éléments de réponse putatifs à l'AhR présents dans les régions promotrices des gènes *cyp19a1a* et *cyp19a1b* ne sont pas fonctionnels (Cheshenko et al. 2007). En revanche, plusieurs travaux ont permis d'établir que l'élément de réponse aux œstrogènes (ERE) situé dans le promoteur du gène *cyp19a1b* est fonctionnel. En effet, des études *in vivo* ont montré que l'exposition d'embryons ou de larves de poisson zèbre à des œstrogènes induit une augmentation de l'expression du gène *cyp19a1b* (Hinfray et al. 2006; Kishida and Callard 2001; Menuet et al. 2005). Cette induction est bloquée par un antagoniste pur des récepteurs des œstrogènes, l'ICI 182-780, ce qui suggère l'implication des récepteurs des œstrogènes dans la régulation du gène *cyp19a1b* (Hinfray et al. 2006; Kishida and Callard 2001; Menuet et al. 2005). De manière intéressante, l'exposition à des androgènes aromatisables produit des effets comparables à ceux des œstrogènes (Mouriec et al. 2009a; Trant et al. 2001). D'autres travaux ont également montré l'effet inducteur des œstrogènes sur l'expression du gène *cyp19a1b* au stade adulte chez le poisson zèbre mâle (Kallivretaki et al. 2006) et le vairon tête-de-boule mâle (Halm et al. 2002). Bien que des disparités liées à l'espèce, au sexe ou au stade de développement existent, l'exposition aux œstrogènes induit, de manière générale, une surexpression du gène *cyp19a1b*.

Chez le poisson zèbre, l'utilisation de modèles *in vitro* avec gène rapporteur a permis de montrer que la mutation ou la délétion des régions du promoteur du gène *cyp19a1b* contenant les ERE et ½ ERE abolit l'induction de l'expression du gène rapporteur par les œstrogènes



confirmant ainsi la fonctionnalité de ces éléments de réponse (Menuet et al. 2005). Ces derniers travaux ont également mis en évidence que l'inductibilité du gène est dépendante d'un contexte cellulaire spécifique. En effet, l'induction du gène rapporteur n'est observée que dans des lignées de cellules neurogliales (Le Page et al. 2006; Menuet et al. 2005). Des travaux de délétion et de mutagenèse dirigée ont permis de montrer l'existence d'un élément de réponse spécifique des cellules gliales, le GxRE (élément de réponse au facteur glial x), dont la présence est nécessaire pour l'induction de l'expression du gène rapporteur par les œstrogènes (Le Page et al. 2008). Cet élément de réponse serait un site de fixation pour un facteur spécifique des cellules gliales qui agirait en synergie avec les récepteurs ER conférant au gène *cyp19a1b* une grande sensibilité aux œstrogènes (le page 2008).

Ces approches complémentaires *in vivo* et *in vitro* démontrent que **le gène *cyp19a1b* est soumis à d'importantes régulations œstrogéniques qui nécessitent la coopération de facteurs présents dans un contexte cellulaire bien spécifique.**

### III.3 Distribution tissulaire et cellulaire de l'aromatase

Chez la plupart des vertébrés, l'aromatase est exprimée principalement dans les gonades et le cerveau. Chez l'Homme, cette expression s'étend à la peau, à l'os, au placenta, au tractus digestif mais également aux tissus adipeux et vasculaires (Simpson et al. 2002; Simpson et al. 1994).

Chez les téléostéens, les deux isoformes de l'aromatase présentent une expression préférentiellement gonadique pour l'aromatase A et cérébrale pour l'aromatase B (Callard and Tchoudakova 1997; Chiang et al. 2001a; Kishida and Callard 2001). Cependant, comme chez l'Homme, la distribution tissulaire de ces isoformes ne se restreint pas à ces deux sites. Ainsi, chez certaines espèces, l'aromatase A s'exprime également dans le cerveau, l'hypophyse et occasionnellement dans des tissus tels que les branchies, les yeux, les reins, l'intestin, la rate (Chang et al. 2005; Kobayashi et al. 2010; Wong et al. 2006). De même, la distribution de l'aromatase B s'étend à l'hypophyse, aux gonades et, dans une moindre mesure, à de nombreux autres tissus (Blazquez and Piferrer 2004; Chang et al. 2005; Goto-Kazeto et al. 2004).

Dans l'ovaire, l'activité de l'aromatase est principalement liée à l'expression du gène *cyp19a1a*. Ce gène s'exprime essentiellement dans les cellules de la thèque et de granulosa

des ovocytes vitellogéniques (Chiang et al. 2001a; Goto-Kazeto et al. 2004; Kobayashi et al. 2010; Rodriguez-Mari et al. 2005). A ce niveau, l'aromatase permet la conversion des androgènes, produits par les cellules de la thèque, en œstrogènes. Ces œstrogènes jouent un rôle important dans la différenciation sexuelle (Guiguen et al. 2010), la vitellogénèse et plus généralement dans la régulation de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique.

Au niveau testiculaire, l'expression du gène *cyp19a1a* a été mise en évidence par des techniques de PCR chez plusieurs espèces de poisson (Barney et al. 2008; Blazquez and Piferrer 2004; Chang et al. 2005; Choi et al. 2005; Fenske and Segner 2004; Patil and Gunasekera 2008; Trant et al. 2001). Cependant, à ce jour, l'expression protéique de l'aromatase A n'a pas été mise en évidence dans le testicule (Kobayashi et al. 1998; Kobayashi et al. 2010). Différentes études s'accordent à suggérer que l'inhibition de l'expression du gène *cyp19a1a* chez le mâle soit à l'origine de la différenciation testiculaire (pour revue, Guiguen et al. 2010).

Chez le poisson zèbre, plusieurs études ont montré que l'expression testiculaire du gène *cyp19a1b* est supérieure à celle du gène *cyp19a1a* (Chang et al. 2005; Sawyer et al. 2006). De manière intéressante, des travaux issus de notre laboratoire ont récemment mis en évidence l'expression protéique de l'aromatase B dans le testicule de poisson zèbre (Hinfrey *et al.*, données non publiées). Ces données suggèrent une implication de l'aromatase B dans la fonction testiculaire qu'il sera intéressant d'approfondir.

Au niveau du cerveau, l'activité de l'aromatase est essentiellement liée à l'expression du gène *cyp19a1b*. De manière intéressante, les poissons téléostéens présentent une activité aromatase dans le cerveau 100 à 1000 fois plus importante que les mammifères, leur conférant ainsi une capacité exceptionnelle à convertir les androgènes cérébraux en œstrogènes (Pasmanik and Callard 1985).

L'autre différence majeure des téléostéens par rapport aux tétrapodes est la nature des cellules qui expriment l'aromatase dans le cerveau. Chez les mammifères et les oiseaux, cette enzyme s'exprime dans les neurones au niveau des corps cellulaires, des axones et des terminaisons nerveuses (Balthazart and Ball 1998; Peterson et al. 2005). Ces neurones sont localisés principalement dans le cerveau antérieur, dans des zones impliquées dans la régulation de la fonction de reproduction et du comportement sexuel (Balthazart and Ball 1998). De manière intéressante, dans certaines situations, cette expression peut s'étendre aux cellules gliales. Ainsi dans des conditions physiopathologiques, telles que des lésions

cérébrales, l'expression de l'aromatase est observée dans les astrocytes à proximité de la lésion chez les mammifères (Garcia-Segura et al. 1999) et dans la glie radiaire et les astrocytes entourant la lésion chez les oiseaux (Peterson et al. 2004; Peterson et al. 2001). De même, au cours du développement embryonnaire, l'expression de l'aromatase a été mise en évidence dans les cellules gliales radiaires du cortex de souris (Martinez-Cerdeno et al. 2006).

Chez les poissons téléostéens, l'utilisation de techniques d'hybridation *in situ* et d'immunohistochimie a permis de décrire l'expression de l'aromatase cérébrale chez le poisson crapaud, *Porichthys notatus* (Forlano et al. 2001), la truite, *Oncorhynchus mykiss* (Menuet et al. 2003), le poisson zèbre (Goto-Kazeto et al. 2004; Menuet et al. 2005), le pejerrey, *Odontesthes bonariensis* (Strobl-Mazzulla et al. 2005) et la girelle verte, *Thalassoma bifasciatum* (Marsh et al. 2006). Chez ces poissons, l'aromatase B s'exprime dans des cellules qui possèdent les caractéristiques morphologiques spécifiques des cellules gliales radiaires, à savoir un petit noyau de forme ovale, un corps cellulaire situé en bordure de ventricule, un prolongement cytoplasmique court adjacent au ventricule et un long prolongement qui s'étend à la périphérie du cerveau et se termine par un « pied » (Bentivoglio and Mazzarello 1999; Rakic 2003). Chez le poisson crapaud, cependant, l'aromatase B s'exprime également dans les neurones ganglionnaires du système auditif périphérique (Forlano et al. 2005). Néanmoins, cette expression neuronale de l'aromatase B semble constituer une exception liée à des stratégies de reproduction propres à cette espèce. Ainsi chez les poissons téléostéens, à la différence des vertébrés supérieurs, l'aromatase cérébrale est exprimée de manière *quasi* exclusive dans les cellules gliales radiaires.

D'un point de vue neuroanatomique, l'aromatase B s'exprime principalement dans le cerveau antérieur, notamment dans les zones périventriculaires au niveau des bulbes olfactifs, du télencéphale, de l'aire préoptique, de l'hypothalamus médiobasal et caudal (Forlano et al. 2001; Goto-Kazeto et al. 2004; Marsh et al. 2006; Menuet et al. 2003; Menuet et al. 2005). L'aromatase B s'exprime également de manière intense dans l'hypophyse, dans des cellules dont la nature reste à déterminer (Goto-Kazeto et al. 2004; Menuet et al. 2003). Ainsi, à l'instar des mammifères et des oiseaux, chez les poissons l'aromatase cérébrale s'exprime dans des régions impliquées dans la régulation de la fonction de reproduction ce qui suggère un rôle de cette enzyme dans l'axe reproducteur.

### III.4 Expression de l'aromatase B au cours du développement

Chez les poissons, l'expression de l'aromatase est très précoce au cours du développement embryonnaire. Chez le poisson zèbre, les ARN messagers des gènes *cyp19a1a* et *cyp19a1b* sont même détectés dans les œufs non fécondés, ce qui suggère l'existence d'un transfert maternel de ces transcrits (Kishida and Callard 2001). C'est entre 12 heures et 24 heures post-fécondation (hpf) que l'expression embryonnaire des gènes *cyp19a1a* et *cyp19a1b* débute (Kishida and Callard 2001). Entre 24hpf et 48hpf, l'expression du gène *cyp19a1b* augmente intensément (Kishida and Callard 2001; Mouriec et al. 2009b). De manière intéressante, cette importante augmentation de l'expression du gène *cyp19a1b* est corrélée avec une forte augmentation des ARNm des trois formes des récepteurs des œstrogènes (zfERs) (Mouriec et al. 2009b). L'utilisation d'un antagoniste pur de ces zfERs (ICI 182-780) inhibe l'induction du gène *cyp19a1b* soulignant l'implication des zfERs, notamment la forme zfER $\beta$ , dans l'expression de l'aromatase B (Mouriec et al. 2009b). Ces travaux mettent ainsi en évidence l'existence d'une régulation œstrogénique précoce du gène *cyp19a1b*.

Au cours du développement, l'expression du gène *cyp19a1b* est variable suivant les individus et peut être classée en deux populations suggérant la présence d'un dimorphisme sexuel (Trant et al. 2001). Cette différence est cependant transitoire puisqu'elle disparaît à partir de 30 jours post-fécondation (Kallivretaki et al. 2007).

L'utilisation de technique d'immunohistochimie n'a pas permis de mettre en évidence d'expression protéique de l'aromatase B dans les stades précoces du développement (Menuet et al. 2005). Il est possible que l'ARNm ne soit pas traduit mais il est également probable que la méthode utilisée pour détecter l'expression de la protéine ne soit pas suffisamment sensible. L'amélioration des techniques d'immunohistochimie pourrait donc contribuer à caractériser l'expression précoce de l'aromatase B.

### III.5 Rôles de l'aromatase cérébrale

Chez l'ensemble des vertébrés, l'aromatase cérébrale semble impliquée dans de nombreuses fonctions telles que la différenciation sexuelle, le contrôle de la fonction de reproduction, le comportement mais également la neurogenèse. Ces rôles de l'aromatase sont inévitablement liés aux rôles des œstrogènes qu'elle produit localement. Chez les vertébrés

supérieurs les connaissances sur ce sujet sont abondantes, en revanche, chez les téléostéens elles sont plus éparées et de nombreuses questions restent à élucider (Diotel et al. 2010).

### III.5.1 Différenciation sexuelle

Comme nous l'évoquions précédemment, l'aromatase joue un rôle majeur dans la différenciation sexuelle au niveau gonadique. De manière intéressante, au niveau du système nerveux central, l'aromatase participe également à la différenciation sexuelle. Chez les mammifères, il est maintenant admis qu'au cours du développement embryonnaire, les hormones stéroïdes exercent des effets organisationnels qui engagent le cerveau, de façon irréversible, dans une voie de différenciation de type mâle ou femelle. Chez les rongeurs par exemple, les androgènes sécrétés par les testicules fœtaux sont convertis en œstrogènes par l'aromatase cérébrale. Ces œstrogènes, produits localement, sont impliqués dans l'initiation des processus de masculinisation et de déféminisation du cerveau (Lephart 1996).

Chez les oiseaux, les mécanismes de différenciation sexuelle du cerveau ne sont pas similaires, puisque ce sont les œstrogènes gonadiques qui sont responsables de la démasculinisation du cerveau femelle (Balthazart and Adkins-Regan 2002). Cependant, chez les oiseaux chanteurs, il est probable que l'aromatase de la testostérone en œstrogènes participe à la masculinisation du cerveau en organisant de manière spécifique les structures cérébrales responsables du chant des mâles (Fusani and Gahr 2006).

L'aromatase joue donc un rôle clé dans certains mécanismes de différenciation sexuelle du cerveau des vertébrés supérieurs. Ce dimorphisme sexuel de certaines structures cérébrales est à la base des différences comportementales entre mâles et femelles mais également de leur sensibilité différentielle aux hormones gonadiques observées au stade adulte.

Chez les poissons téléostéens, des processus de sexualisation du cerveau semblent exister mais ils ne sont pas comparables à la situation des vertébrés supérieurs. En effet, à la différence des mammifères où la différenciation sexuelle cérébrale est irréversible, chez les poissons, la présence de multiples stratégies reproductives (gonochorisme, hermaphrodismes) suppose une certaine plasticité de ce phénomène de sexualisation du cerveau. Il est donc possible qu'à l'exemple de la gonade bipotentielle, certains téléostéens possèdent un cerveau sexuellement bipotentiel (Kobayashi et al. 2002). Cependant, l'implication de l'aromatase cérébrale dans la sexualisation du cerveau des poissons est loin d'être élucidée.

Une étude récente menée chez le pagre tête noire (*Acanthopagrus schlegeli*) suggère l'implication du gène *cyp19a1b* dans la différenciation sexuelle (Tomy et al. 2007). En

revanche, chez le poisson zèbre, il a été montré que l'expression du gène *cyp19a1b* n'est pas sexuellement dimorphique au cours de la différenciation sexuelle, il semble donc que ce gène ne soit pas impliqué dans ce processus (Kallivretaki et al. 2007).

### III.5.2 Comportement sexuel

Chez les mammifères et les oiseaux, l'implication de l'aromatase dans le contrôle du comportement reproducteur est clairement établie. Au cours du développement embryonnaire, les processus de différenciation sexuelle du cerveau liés à l'action de l'aromatase que nous évoquions précédemment sont largement impliqués la mise en place du comportement sexuel (Balthazart et al. 2009; Lephart 1996). Au stade adulte, l'aromatase des androgènes testiculaires induit la formation d'œstrogènes au niveau du cerveau qui sont à la base d'effets activationnels (génomiques) ou plus rapides (non génomiques) impliqués dans le contrôle du comportement reproducteur (Balthazart et al. 2009). Plusieurs études ont montré que les inhibiteurs de l'aromatase (ATD, Fadrozole, Vorozole) diminuent voire bloquent les effets activateurs de la testostérone sur le comportement sexuel mâle (pour revue, Balthazart et al. 2004). De même, les modèles expérimentaux de souris déficientes en aromatase (ArKO) présentent d'importantes anomalies du comportement sexuel (Bakker et al. 2004; Honda et al. 1998).

Chez les poissons, plusieurs études s'accordent à suggérer l'implication de l'aromatase cérébrale dans le comportement reproducteur (pour revue, Munakata and Kobayashi 2010). A titre d'exemple, chez le poisson crapaud une étude a montré que les niveaux d'activité de l'aromatase cérébrale sont corrélés avec les tactiques reproductrices des mâles (Schlinger et al. 1999). Ainsi chez les mâles de type 1, l'activité de l'aromatase est faible ce qui semble favoriser l'action de la testostérone sur les structures cérébrales qui contrôlent le chant caractéristique de ces mâles. En revanche, chez les mâles de type 2 et les femelles, l'activité de l'aromatase est plus importante, prévenant ainsi les effets de la testostérone. Plus récemment, une étude réalisée chez le guppy (*Poecilia reticulata*) a mis en évidence que la diminution de l'activité de l'aromatase cérébrale après une exposition au fadrozole produit une réduction de certains comportements de cour chez les mâles (Hallgren et al. 2006).

### III.5.3 Régulations neuroendocrines de l'axe hypothalamo-hypophysaire

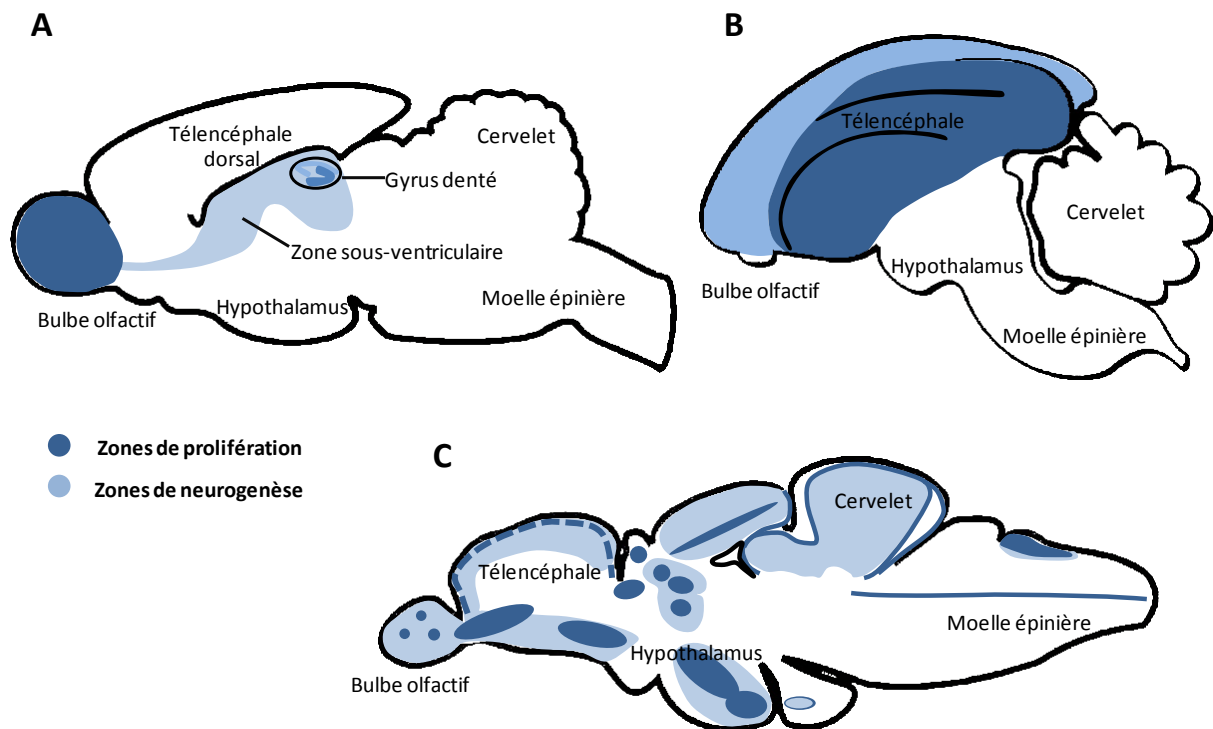
L'implication des hormones stéroïdes gonadiques dans le contrôle central de la fonction de reproduction n'est plus à démontrer. En effet, ces hormones exercent des rétrocontrôles

importants sur le complexe hypothalamo-hypophysaire qui sont essentiels dans la régulation de l'axe reproducteur. De manière intéressante, la production centrale de neuroestrogènes, via l'aromatase des androgènes, semble également contribuer à ces régulations neuroendocrines. Chez la plupart des vertébrés, l'aromatase s'exprime dans des régions cérébrales qui sont impliquées dans le contrôle de la fonction de reproduction telles que l'aire préoptique et l'hypothalamus.

Chez les mammifères, plusieurs études suggèrent l'implication de l'aromatase cérébrale dans la régulation de la sécrétion des gonadotropines. Chez le singe rhésus, l'inhibition de l'activité de l'aromatase par l'ATD a un effet stimulateur sur la sécrétion de LH et de testostérone (Ellinwood et al. 1984). De plus, une étude de microdissection par « punching », menée chez ce primate, a montré que l'activité de l'aromatase est corrélée positivement avec les concentrations en GnRH dans l'hypothalamus médiobasal (Roselli et al. 1987). Il semble donc que l'aromatase cérébrale soit impliquée dans la transmission du rétrocontrôle négatif des androgènes, via leur conversion en œstrogènes, régulant ainsi la sécrétion de la LH et le maintien d'un niveau normal de testostérone chez le mâle. Chez le mouton, l'infusion intracérébroventriculaire de fadrozole induit une augmentation de la pulsativité de la LH chez le mâle confirmant ainsi le rôle important de l'aromatase centrale dans le rétrocontrôle négatif de la testostérone (Sharma et al. 1999).

Chez les poissons, l'aromatase cérébrale semble également impliquée dans la régulation de l'axe reproducteur. Chez le poisson zèbre et la barbue de rivière (*Ictalurus punctatus*) les niveaux de transcrits du gène *cyp19a1b* varient considérablement au cours du cycle reproducteur (Kazeto et al. 2003). De même chez le poisson rouge, le bar (*Dicentrarchus labrax*) et le pagre tête noire, le niveau d'activité de l'aromatase B augmente dans le cerveau lors de la saison de reproduction (González and Piferrer 2003; Lee et al. 2000; Pasmanik and Callard 1988). L'ensemble de ces données supporte l'existence d'un lien entre l'aromatase cérébrale et la fonction de reproduction.

De manière intéressante, l'expression de l'aromatase B est importante dans les régions hypothalamiques où sont localisés les neurones à GnRH. Ces régions sont également riches en récepteurs des œstrogènes (Menuet et al. 2003), suggérant une action possible des neuroestrogènes sur les circuits neuroendocriniens régulant la fonction de reproduction. Chez le poisson-chat africain immature (*Clarias gariepinus*), la testostérone induit une augmentation du nombre de neurones à GnRH 1 alors qu'un androgène non aromatisable, le 11 $\beta$ -hydroxy-androstenedione OHA, n'a pas d'effet comparable (Dubois et al. 1998).



**Figure 10 : Représentation schématique des zones de prolifération et de neurogenèse dans le cerveau adulte des vertébrés.** D'après Kaslin et *al.* (2008). A : cerveau de souris ; B : cerveau d'oiseau chanteur ; C : cerveau de poisson zèbre.



De même, chez le mâle adulte, la testostérone et l'œstradiol augmentent la quantité de GnRH-1 dans le cerveau alors que l'OHA n'a pas d'effet (Dubois et al. 2001). Chez ce poisson, une autre étude a montré que la testostérone produit une augmentation du niveau hypophysaire de LH alors que la 11-kétotestostérone, androgène non aromatisable, n'a aucun effet (Cavaco et al. 2001). Ces données suggèrent que l'action stimulatrice de la testostérone sur la production de GnRH 1 et de LH passe par son aromatisation en œstrogènes. Récemment, une étude chez le saumon de l'Atlantique (*Salmo salar*) a montré que l'utilisation d'inhibiteur de l'aromatase abolit les effets stimulateurs de la testostérone sur la production de LH (Antonopoulou et al. 2009).

Ainsi, comme chez les mammifères, il semble que chez les poissons une partie des rétrocontrôles exercés par les androgènes sur l'axe hypothalamo-hypophysaire soit liés à leur aromatisation. La nature du lien qui existe entre l'aromatase cérébrale et les circuits neuroendocriniens qui contrôlent la reproduction, notamment le système GnRH, reste cependant à déterminer.

#### III.5.4 Neurogenèse

En quelques années, plusieurs découvertes ont contribué à l'effondrement du dogme qui définissait le cerveau adulte comme incapable de générer de nouveaux neurones (Altman and Das 1965; Kaplan 1981; Reynolds and Weiss 1992). Plus récemment, l'émergence de nouvelles techniques pour étudier la prolifération cellulaire, telles que le marquage à la Brdu ou l'immunohistochimie du PCNA, a favorisé considérablement l'avancée des recherches sur la neurogenèse adulte.

Chez les mammifères, il est maintenant admis que dans le cerveau adulte il existe des territoires de prolifération neuronale (pour revue, Lindsey and Tropepe 2006). A ce jour, deux aires télencéphaliques de neurogenèse ont été mise en évidence, la zone sous-ventriculaire qui borde les ventricules latéraux et la zone sous-granulaire du gyrus denté de l'hippocampe (**Figure 10, A**). Les cellules issues de la zone sous-ventriculaire migrent et intègrent les bulbes olfactifs où elles se différencient en interneurones granulaires et périglomérulaires, alors que les cellules formées dans la zone sous-granulaire restent au niveau de l'hippocampe se différencient en neurones granulaires.

Chez les oiseaux, la neurogenèse adulte est, quant à elle, restreinte à la zone sous-ventriculaire des ventricules latéraux (**Figure 10, B**) (Alvarez-Buylla et al. 1990; Goldman and Nottebohm 1983). Dans cette région, l'activité neurogénique est importante et les cellules nouvellement générées s'étendent dans le télencéphale. La nature et la fonction de ces nouveaux neurones n'est pour le moment pas clairement définie.

Le cerveau des poissons téléostéens contraste considérablement avec celui des mammifères et des oiseaux puisque l'activité de prolifération à l'âge adulte ne se limite pas à une ou deux régions mais elle s'étend à de nombreux territoires cérébraux (**Figure 10, C**) (Adolf et al. 2006a; Ekstrom et al. 2001; Grandel et al. 2006; Kuroyanagi et al. 2010; Zupanc et al. 2005). Chez le poisson zèbre par exemple, 16 régions distinctes de prolifération ont été mises en évidence (Grandel et al. 2006). Ces régions sont situées principalement dans des zones périventriculaires du cerveau antérieur au niveau des bulbes olfactifs, du télencéphale, du thalamus, de la région préoptique et de l'hypothalamus. Des territoires de prolifération ont également été mis en évidence dans le cervelet, le rhombencéphale et la moelle épinière. Comme chez les vertébrés supérieurs, la plupart des cellules générées dans ces zones prolifératives se différencient en neurones (Adolf et al. 2006b; Grandel et al. 2006; Zupanc 2006; Zupanc 2001).

L'utilisation de marqueurs cellulaires associés à des marqueurs de prolifération a permis de définir la nature des cellules progénitrices de ces neurones. Ainsi, ces cellules ont été identifiées comme étant des cellules gliales radiaires. Chez les mammifères, les cellules gliales radiaires sont depuis longtemps connues pour leur rôle essentiel dans la neurogenèse embryonnaire. En effet, en plus de constituer un support de migration pour les nouveaux neurones, il est maintenant admis qu'elles sont des cellules progénitrices neuronales (Götz and Barde 2005; Malatesta et al. 2000; Mori et al. 2005; Noctor et al. 2001). Chez les mammifères, ces cellules se différencient en astrocytes à la fin de la période de neurogenèse embryonnaire. En revanche, dans le cerveau des oiseaux et des poissons, ces cellules gliales radiaires persistent à l'âge adulte (Alvarez-Buylla et al. 1987; Onteniente et al. 1983).

De manière intéressante, chez les poissons, la plupart des cellules gliales radiaires identifiées comme progénitrices expriment l'aromatase B (Pellegrini et al. 2007). Ces cellules ont donc une capacité à produire localement des œstrogènes dans le cerveau. Or, chez les mammifères, les œstrogènes, en plus de leur rôle dans la régulation de la fonction de

reproduction, sont maintenant connus pour leur rôles neurotrophiques et neuroprotecteurs (Garcia-Segura et al. 2001; Suzuki et al. 2006).

De plus, l'aromatase semble impliquée dans les mécanismes de réparation du tissu nerveux. En effet, à la suite d'une lésion cérébrale, l'expression de l'aromatase a été mise en évidence dans les astrocytes avoisinants la lésion chez les mammifères (Garcia-Segura et al. 1999) et dans la glie radiaire et les astrocytes à proximité de la lésion chez les oiseaux (Peterson et al. 2007; Peterson et al. 2004). Parallèlement à cette expression de l'aromatase, une augmentation de la prolifération cellulaire est observée ce qui laisse supposer l'existence d'un lien entre l'expression de l'aromatase et l'activité de neurogenèse réparatrice.

Ainsi, l'ensemble de ces données suggère l'implication de l'aromatase cérébrale, et des œstrogènes localement produits, dans la prodigieuse capacité de neurogenèse observée dans le cerveau des poissons téléostéens adultes.

### III.6 Perturbateurs endocriniens et Aromatase B

Comme nous l'avons évoqué précédemment, le gène *cyp19a1b* est régulé positivement par les œstrogènes en raison, notamment, de la présence d'un élément de réponse aux œstrogènes (ERE) fonctionnel situé dans la région promotrice du gène (Menuet et al. 2005). Ainsi, dès les stades précoces du développement embryonnaire le gène *cyp19a1b* présente une sensibilité accrue aux œstrogènes. Ce gène apparaît donc comme une cible probable des composés perturbateurs endocriniens.

Chez le poisson zèbre, l'utilisation de modèles *in vitro* avec gène rapporteur a permis de montrer que l'œstradiol, l'éthinylœstradiol, l'œstrone, la génistéine et l' $\alpha$ -zearalénol sont capables d'induire l'expression du gène rapporteur *cyp19a1b*-luciférase (Le Page et al. 2006). De manière intéressante, des composés de type androgéniques, aromatisables (testostérone) et non aromatisables (dihydrotestostérone, DHT), régulent également positivement l'expression du gène rapporteur (Mouriec et al. 2009a). Il semblerait, dans le cas de la DHT, que l'induction du gène rapporteur soit liée à sa conversion en  $\beta$ -diol qui présente une forte affinité pour les récepteurs œstrogéniques (Mouriec et al. 2009a).

Ainsi, ces travaux *in vitro* montrent que les effets des composés PE sur l'induction de l'expression de l'aromatase sont liés à leur interaction avec les récepteurs œstrogéniques qui régulent la transcription du gène via l'élément de réponse ERE.

**Tableau V :** Effets de composés perturbateurs endocriniens sur l'expression du gène *cyp19a1b*, l'expression de la protéine aromatasase B et l'activité enzymatique de l'aromatase cérébrale chez différentes espèces de poissons.

Composés	Espèces	Exposition	Effets	Références
<b>E2</b>	Poisson zèbre	LVR	↗ ARNm <i>cyp19a1b</i>	(Cheshenko et al. 2007; Hinfray et al. 2006; Menuet et al. 2005)
		LVR	↗ expression de la protéine AroB	(Cheshenko et al. 2007; Menuet et al. 2005)
<b>EE2</b>	Poisson zèbre	LVR	↗ ARNm <i>cyp19a1b</i>	(Kazeto et al. 2003; Kazeto et al. 2004)
	Médaka	A	↗ Activité aromatasase cérébrale	(Contractor et al. 2004)
	Chevaine	A	↗ Activité aromatasase cérébrale	(Hinfray et al. 2010)
<b>NP</b>	Poisson zèbre	LVR	↗ ARNm <i>cyp19a1b</i>	(Kazeto et al. 2003; Kazeto et al. 2004)
<b>GEN, ZEA</b>	Poisson zèbre	LVR	↗ ARNm <i>cyp19a1b</i>	(Le Page et al. 2006)
<b>T, DHT</b>	Poisson zèbre	EMBR	↗ expression du gène <i>cyp19a1b</i> et de la protéine AroB	(Mouriec et al. 2009a)
<b>FLU</b>	Poisson zèbre	A	↗ Activité aromatasase cérébrale	(Andersen et al. 2003)
<b>FAD</b>	Tête-de-boule	A	↘ Activité aromatasase cérébrale	(Ankley et al. 2002)
	Médaka	A	↘ expression du gène <i>cyp19a1b</i>	(Zhang et al. 2008)
<b>ATD</b>	Poisson zèbre	A	↘ Activité aromatasase cérébrale	(Hinfray et al. 2006)
	Poisson rouge	A	↘ expression du gène <i>cyp19a1b</i>	(Gelinas et al. 1998)

**E2:** œstradiol ; **EE2:** éthinyloœstradiol ; **NP:** *Para*-nonylphénol ; **GEN:** génistéine ; **ZEA:**  $\alpha$ -zearalénol ; **T:** testostérone ; **DHT:** dihydrotestostérone ; **FLU:** flutamide ; **FAD :** fadrozole ; **ATD :** androstatrienedione. **A:** stade adulte ; **LVR:** stade larvaire ; **EMBR:** stade embryonnaire.

Espèces de poissons : Poisson zèbre (*Danio rerio*) ; Médaka (*Oryzias latipes*) ; Tête-de-boule (*Pimephales promela*) ; Chevaine : *Leuciscus cephalus* Poisson rouge ; *Carassius auratus*.

De nombreuses études, menées *in vivo*, ont également démontré que l'aromatase B est incontestablement une cible de PE. Le **tableau V** présente, de manière non exhaustive, quelques exemples de composés pouvant affecter l'expression et/ou l'activité de l'aromatase cérébrale chez différentes espèces de poissons.

De manière générale les composés œstrogène-mimétiques tels que l'œstradiol, l'éthinylœstradiol, le *para*-nonylphenol ou encore la génistéine induisent l'expression du gène *cyp19a1b* et parfois de la protéine aromatase B dans les stades précoces du développement (Cheshenko et al. 2007; Hinfray et al. 2006; Kazeto et al. 2003; Kazeto et al. 2004; Le Page et al. 2006; Menuet et al. 2005). L'effet de ces composés implique vraisemblablement les récepteurs œstrogéniques car la co-exposition de l'œstradiol avec un antagoniste pur de ces récepteurs, l'ICI 182-780, abolit la surexpression de l'aromatase B (Hinfray et al. 2006; Menuet et al. 2005).

Les composés de type androgéniques sont également capables d'induire l'expression du gène *cyp19a1b* et de la protéine aromatase B chez l'embryon de poisson zèbre (Mouriec et al. 2009a). L'effet de ces composés passe très certainement par leur métabolisation en composés capables d'agir sur les récepteurs œstrogéniques (Mouriec et al. 2009a).

Au stade adulte, les œstrogène-mimétiques sont capable d'induire l'activité enzymatique de l'aromatase cérébrale (Contractor et al. 2004; Hinfray et al. 2010). En revanche cette activité enzymatique est inhibée par l'androstatrienedione ou le fadrozole (Ankley et al. 2002; Hinfray et al. 2006). Ces deux molécules inhibent également l'expression du gène *cyp19a1b* chez le poisson rouge et le médaka (Gelinas et al. 1998; Zhang et al. 2008).

La présence d'éléments de réponse putatifs à l'AhR dans la région promotrice du gène *cyp19a1b* laissait présumer une action possible des PE de type dioxine. Cependant l'exposition de larve de poissons zèbre à la TCDD n'a pas d'effets sur l'expression du gène *cyp19a1b* (Cheshenko et al. 2007). De plus, des travaux *in vitro* ont montré que les éléments de réponses à l'AhR n'étaient pas fonctionnels (Cheshenko et al. 2007).

En revanche, *in vivo*, la TCDD a un effet inhibiteur de l'induction de l'expression de *cyp19a1b* par l'œstradiol. En effet l'œstradiol seul induit classiquement l'expression de ce gène, mais la co-exposition TCDD-œstradiol réduit l'expression du gène *cyp19a1b* induite par l'œstradiol. Il semblerait que cet effet inhibiteur soit lié à des interactions négatives des récepteurs AhR sur les voies de signalisation des récepteurs des œstrogènes (Cheshenko et al. 2007).

L'ensemble de ces données montre que **l'aromatase cérébrale est une cible avérée des composés PE chez les poissons notamment au cours des stades précoces du développement**. L'aromatase constitue donc un marqueur biologique fiable de l'exposition des poissons aux PE, en particulier aux xéno-œstrogènes.

D'un point de vu fonctionnel, la perturbation de l'expression de l'aromatase B entraîne très probablement des modifications de la production centrale d'œstrogènes. Or, comme nous l'avons précédemment évoqué, ces œstrogènes sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques liés, notamment, à la fonction de reproduction. Ainsi, la perturbation de l'expression de l'aromatase cérébrale, et *in fine* la perturbation de la synthèse d'œstrogènes, est susceptible d'affecter l'ensemble de l'axe gonadotrope.

## OBJECTIFS DE LA THESE

---

L'impact des perturbateurs endocriniens sur la fonction de reproduction des organismes n'est maintenant plus à démontrer. Bien que la plupart des études sur les effets des PE se soient focalisées sur les organes périphériques, de nombreux arguments suggèrent que les circuits centraux impliqués dans le développement et la régulation de la fonction de reproduction sont des cibles potentielles des PE.

Ce travail de thèse s'inscrit dans la problématique générale de l'étude des effets neuroendocrines des PE chez le poisson. Plus spécifiquement notre travail s'est organisé autour d'une question centrale :

**Le système à GnRH est-il une cible des PE œstrogènes mimétiques  
chez le poisson zèbre (*Danio rerio*)?**

Pour répondre à cette question, nos objectifs ont consisté à :

- étudier précisément le système à GnRH du poisson zèbre aux stades adulte et embryonnaire chez des poissons non contaminés et exposés à des xéno-œstrogènes afin d'évaluer l'effet de ces composés sur ce circuit central aux stades adulte et embryonnaire.
- étudier l'effet des xéno-œstrogènes sur l'expression protéique de l'aromatase B, l'enzyme clé de la biosynthèse des œstrogènes connue pour être œstrogène-régulée.
- déterminer les mécanismes impliqués dans les effets induits par les xéno-œstrogènes notamment en s'interrogeant sur l'implication des récepteurs des œstrogènes

L'intention de ce travail était à la fois d'apporter des connaissances nouvelles sur ces réseaux centraux et également de déterminer leur sensibilité vis-à-vis des composés PE œstrogènes mimétiques afin de définir la pertinence d'étudier ces cibles du système nerveux central dans la compréhension des modes d'action des PE ainsi que dans le contexte de l'évaluation des dangers des substances chimiques chez le poisson.

Les choix méthodologiques qui ont été fait pour mener à bien ce travail sont explicités ci-après.



# CHOIX METHODOLOGIQUES

---

# I. Modèle biologique : le poisson zèbre (*Danio rerio*)

## I.1 Généralités

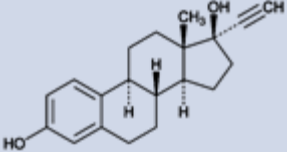
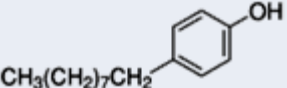
Le poisson zèbre *Danio rerio* est un vertébré Téléostéen de la famille des Cyprinidés, la plus grande famille de poisson d'eau douce. C'est un poisson tropical dont l'habitat naturel se situe dans les régions nord-est de l'Inde.

Le poisson zèbre est maintenant largement utilisé en tant qu'espèce modèle de vertébré dans de nombreux domaines tels que la génétique, la biologie du développement et également dans le domaine médical (cancérologie, pharmacologie, toxicologie). En effet, il présente de nombreux avantages qui en font un excellent modèle de laboratoire. C'est un poisson qui s'élève facilement et de façon peu encombrante du fait de sa petite taille (4-5 cm de long). Il possède un cycle de vie court et atteint sa maturité sexuelle en deux à trois mois. De plus, c'est un animal ovipare à reproduction externe dont les embryons ont l'avantage de posséder un chorion transparent. Les processus du développement embryonnaire précoce sont ainsi beaucoup plus accessibles chez le poisson zèbre que chez la souris, par exemple, dont le développement est intra-utérin. Les femelles poisson zèbre présentent un cycle reproducteur asynchrone et continu qui assure une production d'œufs permanente au sein d'un élevage. De plus, le nombre d'œufs produits par femelle est important offrant ainsi la possibilité de mener des expérimentations sur de grands effectifs. Par ailleurs, le séquençage du génome du poisson zèbre est en passe d'être terminé et de nombreuses informations de séquences sont d'ores et déjà disponibles facilitant ainsi l'étude des gènes et de leur expression.

Le poisson zèbre est recommandé dans les tests réglementaires d'écotoxicité aquatique. De plus, c'est une espèce modèle reconnue dans le contexte de la perturbation endocrinienne (Segner 2009). En effet, il est utilisé à la fois pour le criblage des substances à activité endocrine mais également pour l'identification de leurs effets et l'étude de leurs mécanismes d'action à différents niveaux d'organisation biologique (Segner 2009).

Il subsiste certaines lacunes concernant la biologie et la physiologie de la reproduction du poisson zèbre, mais l'amélioration constante des connaissances physiologiques sur ce modèle participe à consolider son statut d'espèce modèle de vertébré.

**Tableaux VI : Caractéristiques principales du 17 $\alpha$ -éthinyloestradiol et du Nonylphénol.**

Composé	Formule chimique	Numéro de CAS	Masse molaire (g/mol)	Log de Kow	Potentiel œstrogénique relatif à l'œstradiol	Données environnementales
<b>17<math>\alpha</math>-Ethinylestradiol (EE2)</b>		<b>57-63-6</b>	<b>296,40</b>	<b>3,67</b>	<b>1,39 - 5</b> (Cosnefroy et al. 2009, Pillon et al. 2005, Legler et al. 2002)	<b><u>Eaux de surfaces</u></b> <b>0 ng/l - 15 ng/l</b> (Cargouet et al. 2004; Desbrow et al. 1998)  <b><u>Bioaccumulation</u></b> <b>1,4-1,6 ng/g (poisson)</b> (Al Ansari et al., 2010)
<b>Nonylphénol (NP)</b>		<b>104-40-5</b>	<b>220,35</b>	<b>5,71</b>	<b>9E-4 - 5,3E-5</b> (Cosnefroy et al. 2009, Pillon et al. 2005, Legler et al. 2002)	<b><u>Eaux de surfaces</u></b> <b>0 µg/l - 10 µg/l</b> (Soares et al. 2008)  <b><u>Bioaccumulation</u></b> <b>0,03 – 1,59 mg/kg (poisson)</b> (Ahel 1993)

Log Kow : coefficient de partage ; Potentiel œstrogénique relatif à l'œstradiol : EC50 œstradiol / EC50 composé

## I.2 Le poisson zèbre sauvage et lignée transgénique *cyp19a1b*-GFP

A l'INERIS nous disposons, depuis plusieurs années, d'un élevage de poisson zèbre de souche AB. La maîtrise de la reproduction de cette espèce nous permet de mener des expérimentations à des stades de développement bien précis en conditions contrôlées.

Nous disposons également, depuis peu, d'un modèle de poisson zèbre transgénique *cyp19a1b*-GFP développé par l'équipe du professeur Chung (Tong et al. 2009). La lignée a été obtenue par micro-injection, au stade 1-2 cellules, d'une construction de 4 kilobases mettant l'expression de la protéine GFP (Green Fluorescent Protein) sous le contrôle d'une partie du promoteur du gène *cyp19a1b* contenant l'élément de réponse aux œstrogènes et l'exon I. Cette lignée de poisson zèbre transgénique a été caractérisée et validée (Tong et al. 2009) et constitue un excellent modèle notamment pour l'étude *in vivo* des régulations œstrogéniques du gène *cyp19a1b*.

## II. Choix des molécules

Dans le cadre de ce travail de thèse nous avons choisi d'étudier les effets de composés œstrogènes mimétiques. Ces substances sont des perturbateurs endocriniens capables d'interférer avec la signalisation œstrogénique endogène et de nombreux travaux ont montré qu'elles avaient des effets délétères sur la fonction de reproduction des organismes (Brion et al. 2004; Lange et al. 2008; Nash et al. 2004; Schafers et al. 2007). De plus les substances œstrogènes mimétiques constituent une classe de PE largement répandue dans l'environnement aquatique.

Nous avons plus spécifiquement sélectionné deux xéno-œstrogènes modèles présentant des affinités différentes pour les récepteurs des œstrogènes (ER) :

- Le 17 $\alpha$ -éthinyloestradiol, un œstrogène de synthèse de forte affinité pour les ERs
- Le nonylphénol, un alkylphénol de faible affinité pour les ERs

Les caractéristiques de ces deux composés sont présentées synthétiquement dans le **tableau VI** et développées dans les paragraphes ci-après.

## II.1 Le 17 $\alpha$ -éthinyloestradiol

Le 17 $\alpha$ -éthinyloestradiol (EE2) est une hormone stéroïde de synthèse utilisé principalement dans les contraceptifs hormonaux mais également dans l'hormonothérapie substitutive.

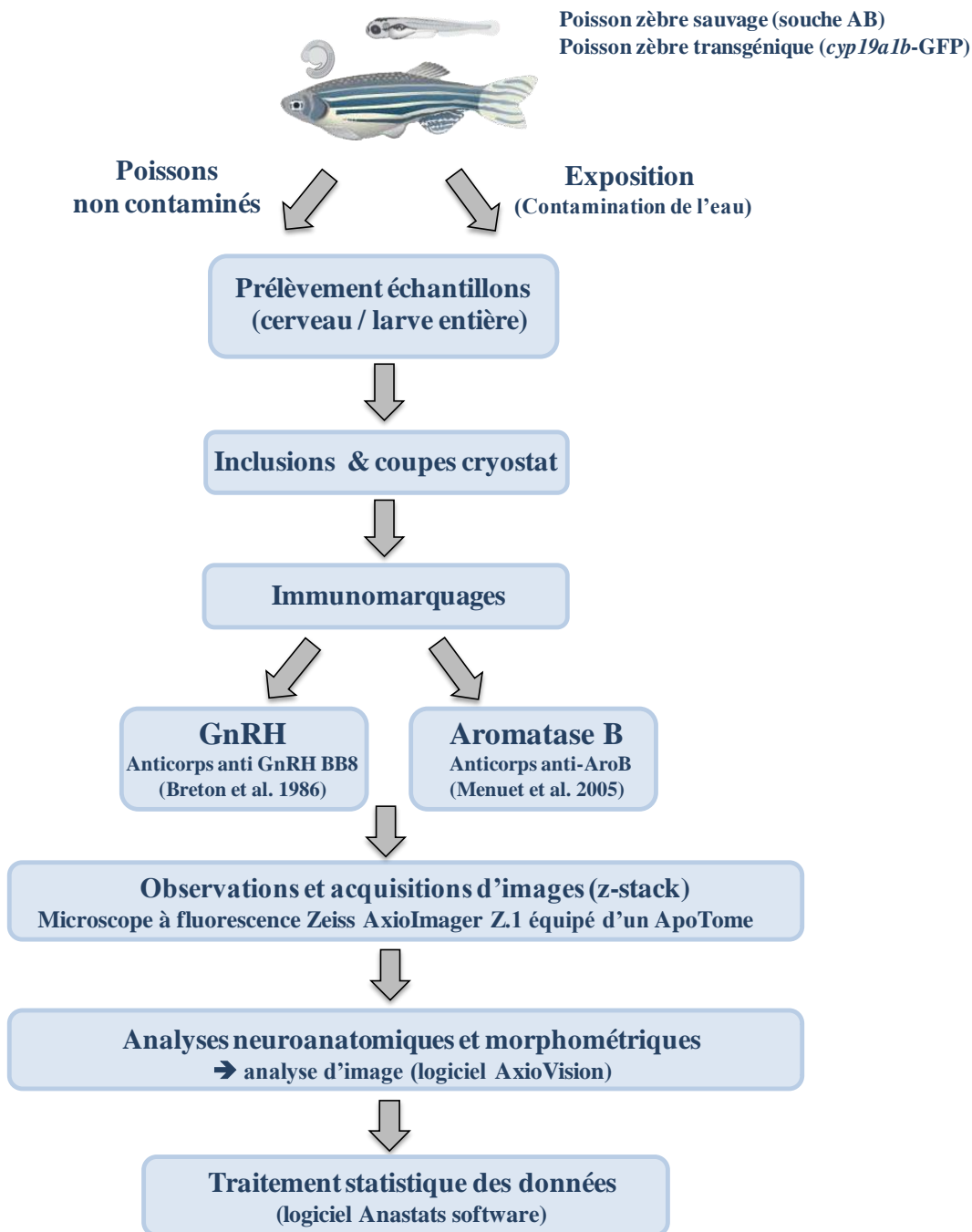
Une fois excrété, l'EE2 n'est pas éliminé dans les stations d'épuration. Ce composé est donc évacué dans les effluents des stations d'épuration et libéré dans le milieu aquatique. L'EE2 a été mesuré dans les eaux de surfaces à des concentrations comprises entre 0 ng/l et 15 ng/l (Cargouet et al. 2004; Desbrow et al. 1998; Ternes et al. 1999) et pouvant atteindre exceptionnellement des concentrations supérieures à 40 ng/l (Ternes et al. 1999). De plus, plusieurs travaux suggèrent que l'EE2 est capable de se bioaccumuler dans les organismes (Al-Ansari et al. 2010; Lai et al. 2002).

*In vitro*, l'EE2 est plus puissant que l'œstradiol pour activer les récepteurs des œstrogènes dans différent modèle cellulaires mammifères et poissons (Cosnefroy et al. 2009; Legler et al. 2002). *In vivo*, de très nombreux travaux ont montré les effets délétères de faibles concentrations d'EE2 sur le développement et la reproduction des poissons. Ainsi l'exposition à l'EE2 est capable d'induire la production de vitellogénine chez les mâles et les juvéniles, d'altérer la différenciation sexuelle, de retarder le développement gonadique mais également de perturber la fertilité des poissons (Lange et al. 2008; Nash et al. 2004; Schafers et al. 2007; Segner et al. 2003; Xu et al. 2008). Récemment, des travaux chez le poisson zèbre ont montré l'effet inducteur de l'EE2 sur l'expression du gène *cyp19a1b* codant pour l'aromatase B (Hinfray et al. 2006; Kazeto et al. 2004).

Ainsi l'EE2 est largement présent dans l'environnement aquatique, à des concentrations relativement faibles mais qui sont suffisantes pour perturber le développement et la reproduction des organismes à différents niveaux incluant le système nerveux central.

## II.2 Le nonylphénol

Le nonylphénol (NP) est un alkylphénol polyéthoxylé qui appartient à une famille de composés chimiques largement utilisés dans les peintures, les résines, les produits phytopharmaceutiques (biocides) et les détergents. Il représente l'un des agents actifs de surface (surfactants) les plus couramment utilisés.



**Figure 11 : Schéma de la démarche expérimentale générale**

Les activités anthropiques sont les seules responsables de la présence du NP dans l'environnement. Au niveau des écosystèmes aquatiques le nonylphénol est présent dans les eaux de surfaces (rivière, lac, océan) à des concentrations comprises entre  $< 1 \mu\text{g/l}$  et  $15 \mu\text{g/l}$  (pour revue, Soares et al. 2008) et de manière exceptionnelle à des concentrations atteignant  $600 \mu\text{g/l}$  (Sole et al. 2000). Le NP est également présent dans les sédiments en quantité importante comprises entre  $< 1 \text{mg/kg}$  et  $50 \text{mg/kg}$  (pour revue, Soares et al. 2008). Au-delà de l'environnement aquatique, le nonylphénol est également présent dans le sol et dans l'air (Dachs et al. 1999; Soares et al. 2008). De manière inquiétante, plusieurs études ont montré que ce composé était capable de se bioaccumuler à de fortes concentrations dans les organismes aquatiques (Ahel et al. 1993; Soares et al. 2008).

De nombreux travaux *in vitro* ont démontré la capacité du nonylphénol à se fixer sur le récepteur des œstrogènes et d'induire des effets œstrogéniques dans différents modèles cellulaire mammifères et poissons (Cosnefroy et al. 2009; Legler et al. 2002; Soares et al. 2008). En comparaison avec l'œstradiol ou l'EE2, le nonylphénol est un composé de faible œstrogénicité. *In vivo*, le NP induit la production de la vitellogénine chez le poisson mâle, altère la morphologie gonadique, la production d'œufs et la fertilité (Jobling et al. 1996; Kinnberg et al. 2000; Soares et al. 2008). Des études récentes ont montré que, comme l'EE2, le NP est capable d'induire l'expression du gène *cyp19a1b* chez la larve de poisson zèbre (Hinfray et al. 2008; Kazeto et al. 2004).

Le NP est donc très présent dans le milieu aquatique et bien que faiblement œstrogénique, ce composé est capable de perturber la physiologie des organismes à différents niveaux incluant le système nerveux central.

### III. Démarche expérimentale

#### III.1 Démarche expérimentale générale

La démarche expérimentale générale que nous avons adoptée est présentée très synthétiquement dans la **figure 11**. Cette approche a été entreprise à l'occasion de différentes expérimentations qui sont résumées dans le **tableau VII** et qui soulignent la structuration de notre démarche et des travaux présentés dans la partie « Résultats » de ce manuscrit.

**Tableau VII : Récapitulatif de l'ensemble des expérimentations et des paramètres biologiques étudiés au cours des travaux présentés dans la partie « Résultats ».**

	Chapitre 1	Chapitre 2			Chapitre 3			
Stade de développement	Adulte	Embryon/Larve		Embryon/Larve <i>cyp191ab</i> -GFP	Embryon/Larve		Embryon/Larve	
Conditions d'expositions	<b>EE2</b> 1nM	<b>EE2</b> 0,02 /0,1 /0,5nM		<b>EE2</b> 0,02 /0,1 /0,5nM	<b>EE2</b> 0,5nM <b>NP</b> 0,125/ 0,25/ 0,5 µM		<b>EE2</b> 0,5nM/ <b>NP</b> 0,5 µM ± ICI 182-780 1µM	
Durée d'exposition	7 jours	1 - 30 jpf (Prélèvement 5, 10, 20 jpf)		1-5 jpf	0- 7 jpf		0-5 jpf	
Paramètres biologiques	GnRH	GnRH	AroB	GnRH/GFP	GnRH	AroB	GnRH	AroB
Analyses	Distribution, nombre et taille des neurones à GnRH-ir	Distribution, nombre et taille des neurones à GnRH-ir	Expression cérébrale et hypophysaire	Etude des relations neuro-anatomiques GnRH/GFP	Nombre de neurones à GnRH-ir	Expression cérébrale et hypophysaire	Nombre de neurones à GnRH-ir	Expression cérébrale et hypophysaire



Les réseaux neuroendocrines étant très régionalisés il a été très important d'utiliser une approche expérimentale permettant de tenir compte de la distribution de ces systèmes dans le cerveau. Ainsi, pour réaliser ce travail nous avons utilisé l'immunohistochimie, qui constitue la technique la plus couramment utilisée dans les études de neuroanatomie puisqu'elle apporte à la fois des données spatiales et quantitatives lorsqu'elle est couplée à des analyses morphométriques. Plus spécifiquement, nous avons opté pour l'immunofluorescence qui est l'une des techniques les plus sensibles dans les méthodes d'immunohistochimie.

### **III.2 Etude du système à GnRH**

L'analyse de l'effet de substances œstrogènes-mimétiques sur le système à GnRH exige une bonne connaissance de ce réseau neuroendocrine. Ainsi la première étape de ce travail a été de caractériser la distribution neuroanatomique du système GnRH chez le poisson zèbre adulte mâle et femelle. Ensuite, une courte exposition à l'EE2 (1 nM) a été réalisée chez le poisson zèbre mâle afin de définir l'effet potentiel de ce xéno-œstrogène sur le système GnRH de l'adulte.

Dans un second temps, nous avons étudié précisément l'ontogenèse des neurones à GnRH au cours du développement précoce de poisson zèbre (entre 1 et 30 jpf) et nous avons évalué l'effet de l'exposition à l'EE2 (0.02 nM, 0.1nM et 0.5nM) sur le développement de ces neurones. Plus spécifiquement nous avons étudié l'effet de l'EE2 sur le nombre et la taille de ces neurones, mais également sur leur profil de migration.

Nous avons ensuite comparé l'effet de l'exposition à l'EE2 (0.5 nM) et au nonylphénol (0.125 µM, 0.25 µM, 0.5 µM) sur le nombre de neurones à GnRH dans les stades précoces du développement (entre 0 et 7 jpf) afin d'évaluer les effets de composés présentant des œstrogénicités différentes.

Enfin, dans l'optique d'étudier l'implication des récepteurs des œstrogènes dans les effets des xéno-œstrogènes sur le système à GnRH nous avons réalisé des co-expositions avec un agoniste pur des récepteurs des œstrogènes, l'ICI 182-780.

### III.3 Etude de l'expression de l'aromatase B

L'aromatase B est une cible avérée des xéno-œstrogènes (Cheshenko et al. 2007; Hinfray et al. 2008; Kazeto et al. 2004) c'est pour cela que nous avons étudié son expression en parallèle de tous nos travaux d'exposition à l'EE2 et au NP. L'induction de l'expression de l'aromatase B est en effet un indicateur fiable de la perturbation de la signalisation œstrogénique au niveau du système nerveux central.

Au-delà de sa simple utilisation comme biomarqueur d'exposition à des xéno-œstrogènes, nous avons étudié l'expression de l'aromatase B dans l'ensemble du cerveau du poisson zèbre au cours du développement embryon-larvaire (entre 1 et 30 dpf) puis nous avons analysé l'effet de l'exposition de concentrations croissantes d'EE2 (0.02 nM, 0.1nM et 0.5nM) sur cette expression.

Enfin, nous avons utilisé le modèle de poisson zèbre *cyp19a1b*-GFP afin d'étudier les relations neuroanatomiques entre les cellules gliales radiaires qui expriment la GFP et les neurones à GnRH en condition contrôle et exposé à l'EE2.

# RESULTATS

---

# **Chapitre I**

*Caractérisation neuroanatomique du système  
à GnRH du poisson zèbre*

### ***Contexte***

Le système à GnRH a été largement étudié chez les vertébrés en raison de sa place centrale dans l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique. Chez les téléostéens, selon l'espèce considérée, deux ou trois formes de GnRH sont exprimées dans des populations neuronales distinctes. Chez le poisson zèbre, deux variants de la GnRH ont été caractérisés, la GnRH-2 (chicken GnRH-II) et la GnRH-3 (salmon GnRH). La distribution de l'expression des gènes codant pour ces variants de la GnRH a été déterminée par hybridation *in situ* (Steven et al. 2003). Hormis cette étude, les données relatives à la caractérisation neuroanatomique du système à GnRH chez cette espèce étaient inexistantes. Enfin, les effets potentiels de traitements hormonaux sur ce réseau neuroendocrine n'étaient pas renseignés.

### ***Objectifs et démarche expérimentale***

Dans ce contexte, la première étape de ce travail a eu pour objectifs (i) d'acquérir, à l'aide de marquages immunohistochimiques, des données neuroanatomiques précises sur le système à GnRH chez le poisson zèbre adultes mâle et femelle et (ii) d'évaluer les effets d'une exposition à un œstrogène sur le système à GnRH.

### ***Résultats principaux***

Ce travail a fait l'objet d'un manuscrit (Article 1) rédigé en anglais et présenté ci-après.

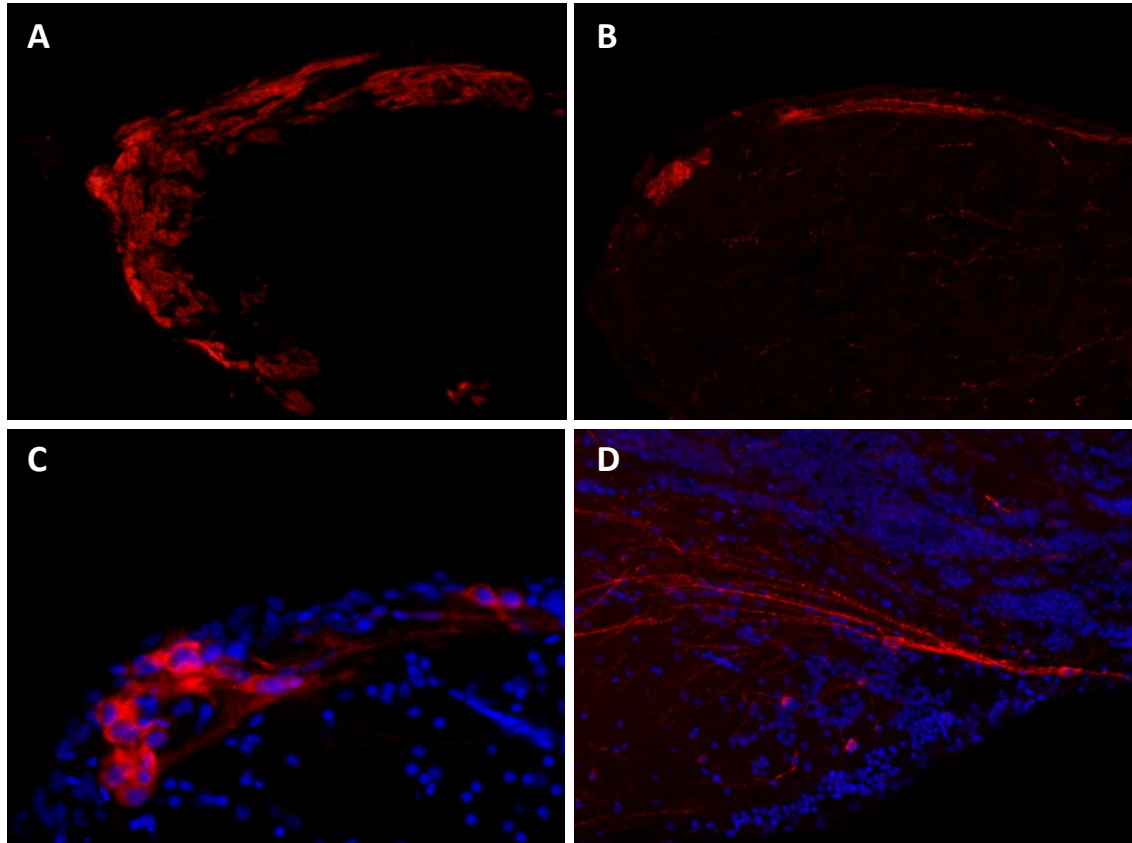
**Neuroanatomical characterization of the GnRH systems in the zebrafish (*Danio rerio*) and study of potential effect of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol**

*Mélanie Vosges, Olivier Kah, Benjamin Piccini, Jean-Marc Porcher and François Brion*

Afin de répondre à ces objectifs, une analyse comparative a été préalablement menée afin de sélectionner un anticorps permettant d'étudier par immunohistochimie l'expression de la GnRH dans le cerveau du poisson zèbre. Parmi les trois anticorps testés<sup>1</sup>, seul l'anticorps anti-sGnRH BB8 (Breton et al. 1986) s'est avéré adapté à notre étude en termes de sensibilité et de

---

<sup>1</sup> Anticorps polyclonal anti-GnRH commercial (SIGMA, Réf. : G8294),  
Anticorps polyclonal anti-2-10 GnRH (N°19900) généreusement fourni par A. Duittoz (INRA, Nouzilly),  
Anticorps polyclonal anti-sGnRH (BB8) généreusement fourni par l'INRA SCRIBE, Rennes.



**Figure 12 : Immunodétection de la GnRH (rouge) sur coupes sagittales de cerveaux de poisson zèbre adulte. A:** Immunomarquage non spécifique au niveau des bulbes olfactifs avec l'anticorps polyclonal anti-GnRH commercial SIGMA (x200). **B:** Immunomarquage spécifique avec l'anticorps polyclonal anti-GnRH 19900 au niveau du bulbe olfactif (x200). **C, D:** Immunomarcages spécifiques et sensibles avec l'anticorps polyclonal anti-GnRH BB8 au niveau du bulbe olfactif (**C** ; x400) et du faisceau olfactif médian (**D** ; x200). Bleu : Immunomarquage DAPI.

spécificité (**Figure 12**), Cet anticorps a donc été sélectionné pour mener l'ensemble des analyses immunohistochimiques.

La caractérisation neuroanatomique du système à GnRH du poisson zèbre a été réalisée chez des poissons adultes mâles et femelles. Tout d'abord la distribution de l'expression de la GnRH a été analysée dans l'ensemble du cerveau, révélant la présence de neurones GnRH-immunoréactifs (ir) au niveau des bulbes olfactifs, du télencéphale ventral et de l'aire préoptique. Dans la région mésencéphalique, une population de larges corps cellulaires GnRH-ir a également été mise en évidence. De nombreuses fibres immunoréactives, issues de l'ensemble des corps cellulaires GnRH-ir, ont été observées essentiellement au niveau du cerveau antérieur. L'ensemble de ces données nous a permis de réaliser une cartographie précise de la répartition de l'expression de la GnRH dans le cerveau de poisson zèbre.

En outre, l'analyse morphométrique des neurones à GnRH-ir a permis d'acquérir des données quantitatives originales sur leur nombre moyen et sur leur surface moyenne en fonction des régions cérébrales et du sexe des poissons. De manière intéressante, quelque soit le paramètre étudié (distribution, nombre, taille), aucun dimorphisme sexuel n'a été mis en évidence.

Enfin, nous montrons qu'une exposition de 7 jours à 1 nM d'EE2 n'affecte aucun des paramètres morphométriques analysés (distribution, taille et nombre moyens de neurones à GnRH-ir) chez le poisson zèbre adulte mâle, démontrant la relative insensibilité du système à GnRH sur les paramètres étudiés dans nos conditions expérimentales.

### ***Conclusions***

L'ensemble des résultats de ce premier chapitre nous a permis d'acquérir des informations nouvelles sur le système à GnRH du poisson zèbre adulte. Cette étape de caractérisation nous est apparue pré-requise pour entreprendre l'étude de la perturbation de ce système neuroendocrinien. En raison de l'absence d'effet significatif de l'EE2 sur les caractéristiques neuroanatomiques et morphométriques du système à GnRH au stade adulte, nos travaux se sont orientés vers l'étude des stades précoces de développement durant lesquels le système à GnRH se met en place.

# **Neuroanatomical characterization of the GnRH systems in the zebrafish (*Danio rerio*) and study of potential effect of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol**

**Vosges M.<sup>1</sup>, Kah O.<sup>2</sup>, Piccini B.<sup>1</sup>, Porcher J-M.<sup>1</sup>, Brion F.<sup>1,\*</sup>**

<sup>1</sup> *Unité d'évaluation des risques écotoxicologiques, Direction des Risques Chroniques, Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS), BP 2. F-60550 Verneuil-en-Halatte, France.*

<sup>2</sup> *Neurogenesis and Oestrogens, Université de Rennes 1, UMR CNRS 6026, IFR140, Campus de Beaulieu, 35042 Rennes cedex, France.*

\* Corresponding author:

François Brion:

Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS),

Direction des Risques Chroniques, Unité d'évaluation des risques écotoxicologiques,

BP 2, F-60550 Verneuil-en-Halatte, France.

Tel.: +(33) 3 44 55 65 12; Fax: +(33) 3 44 55 67 67.

E-mail: francois.brion@ineris.fr

**Keywords:** Gonadotropin-releasing-hormone (GnRH), zebrafish (*Danio rerio*), 17 $\alpha$ -ethinylestradiol (EE2).



## **Abstract**

In vertebrates, gonadotropin-releasing hormone (GnRH) is the key factor controlling the activity of the reproductive axis. In the present study, we characterized, by mean of immunohistochemistry, the neuroanatomical distribution of GnRH systems in the brain of a model fish species, the zebrafish (*Danio rerio*). GnRH-immunoreactive (GnRH-ir) neurons were found in olfactory bulb, the ventral telencephalon, the preoptic area and the ventral periventricular hypothalamus. In the midbrain, large GnRH-ir cell bodies were observed at the level of the medial longitudinal fascicle. All these GnRH-ir cell bodies projected fibers primarily in the forebrain and the midbrain. Additionally, morphometric parameters of GnRH neurons were investigated in both male and female to determine whether sex differences exist. Our results indicate that the distribution, the number and the size of GnRH-immunoreactive (GnRH-ir) neurons are not sexually dimorphic.

The development and functioning of GnRH neurons are finely tuned by a series of factors, notably sex steroids. Given the lack of information on their potential effect in the zebrafish, we explored the effect of short-term exposure of adult zebrafish to the potent synthetic estrogen EE2. We report that neither the distribution pattern of GnRH-ir neurons nor the GnRH-ir neuronal number and size are affected by EE2 under our experimental conditions.

Cumulatively, these results provide an improved understanding of the GnRH systems and its sensitivity to an estrogenic compound in adult zebrafish.

# 1. Introduction

In vertebrates, reproductive function is under endocrine control of the hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis. The gonadotropin-releasing hormone (GnRH) is a decapeptide neurohormone which exerts a key role in the HPG axis by controlling synthesis and release of the pituitary gonadotropins LH (luteinizing hormone) and FSH (follicle-stimulating hormone). In turn, these two hormones regulated gametogenesis and steroidogenesis in the gonads. In agreement with its pivotal role in the reproductive axis, the GnRH has been highly conserved throughout evolution (Kah et al., 2007). In teleost fish, depending on the species, two or three different variants of GnRH are expressed in the brain (Gothilf et al., 1995; Powell et al., 1994). In zebrafish (*Danio rerio*), a popular teleost model, two GnRH variants have been identified (Powell et al., 1996) and characterized (Steven et al., 2003): GnRH2 (corresponding to the chicken GnRH-II variant) that is synthesized in large neurons of the synencephalon and GnRH3, corresponding to the salmon GnRH variant which is expressed in a continuum of neurons extending from the olfactory bulbs to the anterior hypothalamus (Kah et al., 1986; Lethimonier et al., 2004). The GnRH3 decapeptide corresponds to the hypophysiotrophic variant that controls gonadotropins release (Steven et al., 2003), while the function of GnRH2 is less clear although in fish its roles in sexual behavior (Volkoff and Peter, 1999) and in modulation of pineal function (Servili et al., 2010) are documented.

The zebrafish GnRH systems have been well characterized by *in situ* hybridization techniques (Steven et al., 2003) and also by the transgenic GnRH3: EGFP zebrafish line (Abraham et al., 2009) but information about spatial and quantitative expression of GnRH network at the protein level are lacking. Moreover, little is known about sex differences in GnRH neuronal population in the brain of zebrafish.

The activity of GnRH neurons is subject to complex regulations which imply a series of internal and external factors, among them important feedbacks from gonadal sex steroids (Herbison, 2009). However data on the effect of estrogens on GnRH system have not reported in the zebrafish.

In light of this context, the present study aimed to characterize, by immunohistochemistry, the neuroanatomical distribution of GnRH systems in the brain of zebrafish. In addition, morphometric parameters of GnRH neurons were investigated in both male and female to determine whether sex differences exist. Finally, the effect of a short-term exposure to a synthetic estrogen,  $17\alpha$ -ethinylestradiol, on the GnRH neuronal population was investigated in male zebrafish. Together, results from this study should provide an improved understanding of the GnRH systems and its potential vulnerability to a synthetic estrogen in zebrafish.

## **2. Materials and methods**

### ***2.1 Animals maintenance***

All animal protocols in this study were approved by the ethical committee of the National Institute of Industrial Environment and Risks. Sexually mature wild type male and female zebrafish (*Danio rerio*, AB strain) were used for this study. Fish were raised in a recirculated water system at 27°C under a controlled photoperiod (14h light/ 10h dark cycle). They were fed daily with TetraMin fish flake and live brine shrimp (*Artemia* spp.; Ocean Nutrition).

### ***2.2 Male short-term exposure to 17 $\alpha$ -ethinylestradiol***

Adult male zebrafish were exposed for 7 days to 17 $\alpha$ -ethinylestradiol (EE2, Sigma-Aldrich) at nominal concentrations of 1nM or to solvent control (DMSO; 0.0005 % v/v). Exposures were performed in 4-L tanks under semi-static conditions with a total renewal of the water every day. The temperature in the tanks was maintained at 27°C and the water was permanently aerated.

### ***2.3 Immunohistochemistry***

#### ***2.3.1 Tissue processing***

Animals were euthanized in tricaine methane sulfonate (MS222; Sigma-Aldrich, France). Brains were collected and fixed 48h at 4°C in 4% paraformaldehyde in saline phosphate buffer (PBS). After rinsing in PBS, samples were successively transferred to 10%, 20% and

30 % sucrose-PBS solution at 4°C. Brains were then embedded in O.C.T compound (Tissue Tek. Sakura Finetek). Frozen-sections of the entire brain were performed at a thickness of 12µm and stored at -20°C until used.

### *2.3.2 Antibodies*

The GnRH antibody, BB8, (Breton et al., 1986) used for this study was raised in rabbit against sGnRH, BB8 was used at a dilution of 1:2000. Alexa Fluor 594-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:200, Invitrogen. France) was used as secondary antibody to detect GnRH immunoreactivity. To control the specificity of the staining, sections were processed without the primary antibody.

### *2.3.3 Immunofluorescence staining*

Frozen sections were rinsed 2 times in PBS for 5 minutes at room temperature and then they were incubated for 1 hour in a PBS solution containing 0.2% Triton X-100 and 0.5% milk powder. Incubation with the primary antibody BB8 was performed overnight in 0.5% milk powder in PBS. Sections were then washed three times in PBS solution containing 0.2% Triton X-100 (10min/wash) before being incubated for 2h with the secondary antibody. The sections were washed in PBS (3x10min) and coverslipped using Vectashield mounting medium with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Vector Laboratories).

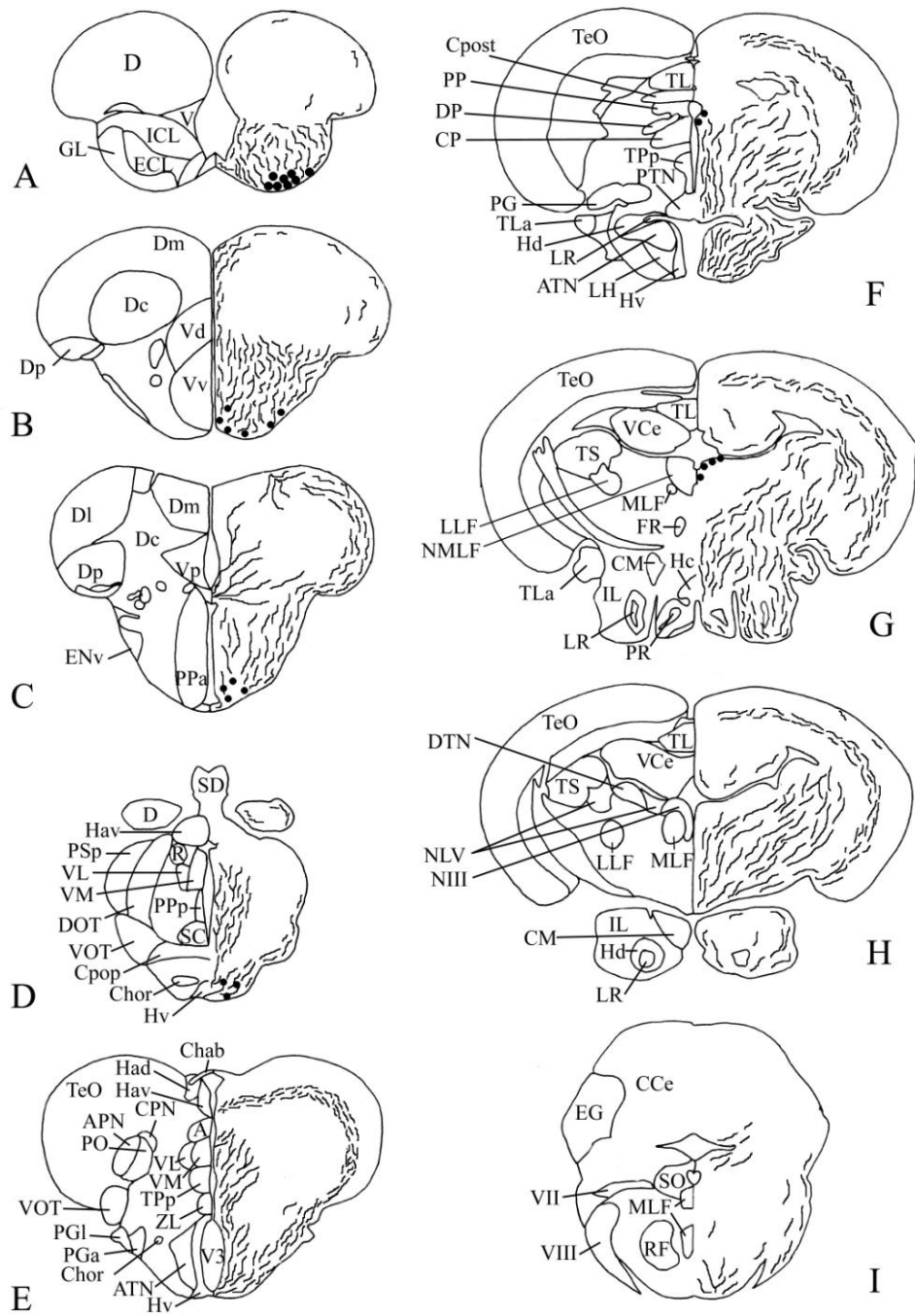
### *2.3.4 Analysis*

GnRH immunostaining was analyzed on each brain section of fish using a Zeiss AxioImager.Z1 fluorescence microscope combined with an ApoTome (Zeiss GmbH, Göttingen, Germany). Every field containing GnRH-immunopositive neurons was photographed with 40x and 63x objectives. Series of optical sections along the z-axis were acquired at 0.3-0.5µm intervals and projected in a single image (maximum-intensity

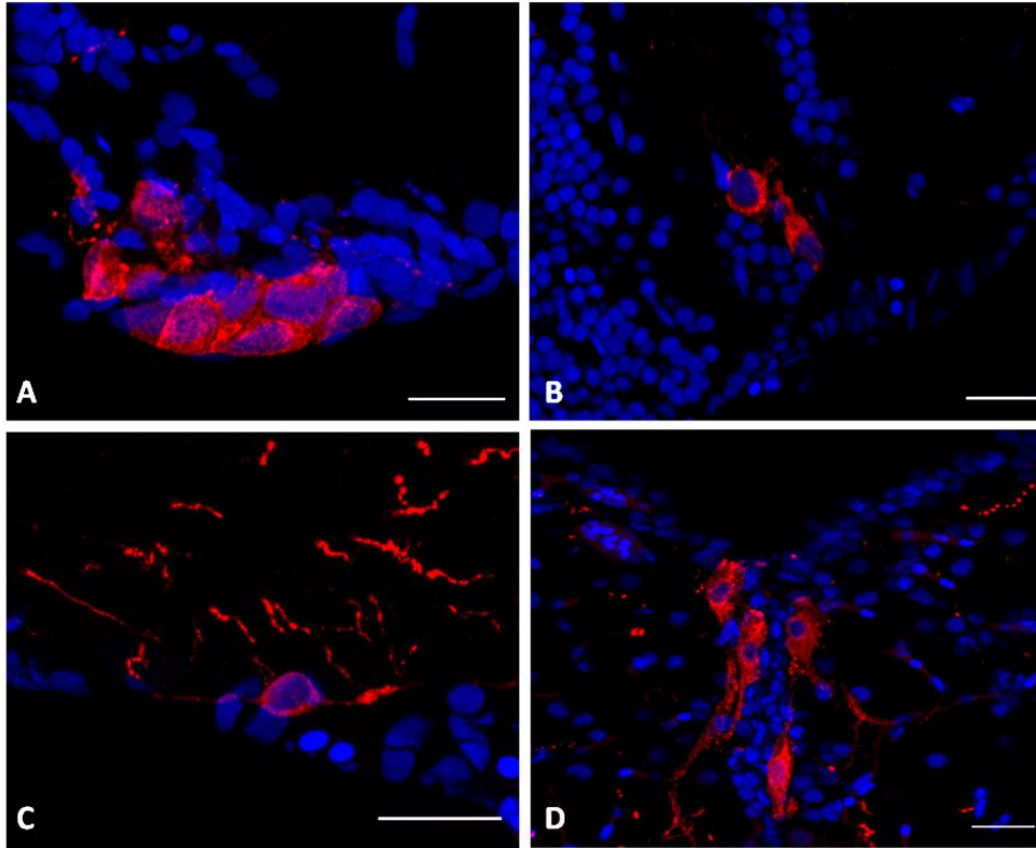
projection). These digitized images were then used to determine the total number of GnRH cell bodies by manually counting every nucleated GnRH-ir neurons. The GnRH soma area was quantified by analyzing the perimeter of GnRH-immunoreactive neurons (25 neurons randomly selected per fish) with the outline spline tool of the Axiovision Imaging software. All these morphometric data were blindly performed without a priori knowledge of the specimen identity. Neuroanatomical localization and nomenclature of brain nuclei follows that of Wullimann et al. (1996).

#### ***2.4 Statistical analysis***

The total number of GnRH-ir cell bodies as well as the surface of GnRH-ir soma were expressed as means  $\pm$  standard error of the mean (S.E.M) of n independent observations. Data were statistically analyzed using the Mann-Whitney U-test (Anastats software). A p value of less than 0.05 was considered to be statistically significant.



**Figure 1: Distribution of GnRH-immunoreactive structures on representative transverse sections of the brain of zebrafish taken from the atlas by Wullmann et al. (1996). See Annex 1 for nomenclature of brain nuclei.**



**Figure 2: Microphotographs of GnRH-immunoreactive structures on brain cross sections of adult zebrafish.** **A:** Section at the level of the ventral olfactory bulbs (OB) showing a cluster of GnRH-ir cell bodies. **B:** GnRH-ir perikarya in the ventral telencephalon. **C:** Cross section at the level of preoptic area illustrating a characteristic bipolar GnRH-ir neuron surrounded by varicose fibers. **D:** Transversal section at the level of the midbrain tegmentum showing a group of large GnRH-ir neurons in the nucleus of the medial longitudinal fascicle (nMLF). Red: GnRH immunostaining. Blue: DAPI. Scale bar = 20 $\mu$ m



### 3. Results

#### 3.1 Neuroanatomical distribution of GnRH systems

GnRH immunoreactivity was examined in the entire brain of male (n=10) and female (n=10) zebrafish. The distribution of GnRH-immunoreactive (ir) cell bodies and fibers is schematically represented on **figure 1**. Dense clusters of GnRH-ir cell bodies were identified in the ventromedial part of the olfactory bulbs (**Fig. 1A** and **Fig. 2A**) and formed a continuum of labeled cells along the terminal nerve. These GnRH-ir cells consisted of spherical or ovoid-shaped perikarya. More caudally, GnRH-ir cell bodies were detected in the ventral telencephalic area (**Fig.1B** and **Fig. 2B**), in the preoptic area (POA) at the level of the parvocellular preoptic nucleus (**Fig. 1C** and **Fig. 2C**) and in the ventral periventricular hypothalamus (**Fig. 1D**). At these levels, the GnRH-ir cells were smaller with fusiform-shaped soma. In the midbrain tegmentum, a population of large GnRH-ir perikarya was found at the level of the medial longitudinal fascicle (**Fig. 1F** and **G** and **Fig. 2D**).

All these GnRH-ir cell bodies projected varicose fibers mainly in the forebrain and the midbrain forming a dense network. GnRH-ir fibers were found in the ventral part of olfactory bulbs and in the telencephalon, at this level some fibers get into the optic tectum. More posteriorly, the preoptic area and the mediobasal hypothalamus were abundantly innervated by GnRH-ir fibers. In the forebrain, some of these fibers were organized in intense bundles connecting the different brain regions. Further caudally, scattered GnRH-ir fibers innervated the hindbrain especially in the facial lobe. This distribution pattern revealed no inter-individual or inter-sexual difference.

**Table I :** Average number of GnRH-ir cells bodies in the terminal nerve, the ventral telencephalon/ preoptic area (POA), the midbrain tegmentum and average soma size of POA GnRH-ir cells ( $\mu\text{m}^2$ ) in whole sectioned brains of adult male (n=4) and female (n=4) zebrafish. The values are expressed as means  $\pm$  SEM.

	Average number of cell bodies				Average cell soma size ( $\mu\text{m}^2$ )
	Terminal Nerve	Ventral Telencephalon & Preoptic Area	Midbrain Tegmentum	<b>Total</b>	Preoptic Area
Male	76 $\pm$ 6,65	115,25 $\pm$ 18,57	17,75 $\pm$ 2,95	<b>209 <math>\pm</math> 22,2</b>	43,08 $\pm$ 1,3
Female	72 $\pm$ 6,9	167,25 $\pm$ 17,44	23,50 $\pm$ 3,57	<b>262,75 <math>\pm</math> 21,3</b>	43,18 $\pm$ 2,2

**Table II:** Average number of GnRH-ir cells bodies in the terminal nerve, the ventral telencephalon/ preoptic area (POA), the midbrain tegmentum and average soma size of POA GnRH-ir cells ( $\mu\text{m}^2$ ) whole sectioned brains of zebrafish control (n=4) and exposed to 1nM of EE2 (n=4). The values are expressed as means  $\pm$  SEM.

	Average number of GnRH-ir cell bodies				Average cell soma size ( $\mu\text{m}^2$ )
	Terminal Nerve	Ventral Telencephalon & Preoptic Area	Midbrain Tegmentum	<b>Total</b>	Preoptic Area
Control	76 $\pm$ 6,9	115,25 $\pm$ 18,57	17,75 $\pm$ 2,95	<b>209 <math>\pm</math> 22,2</b>	43,09 $\pm$ 1,3
EE2 1nM	70,25 $\pm$ 7,56	115 $\pm$ 16,48	21,75 $\pm$ 2,95	<b>204,5 <math>\pm</math> 16,2</b>	44,03 $\pm$ 0,5

### **3.2 Quantitative characterization of GnRH systems**

Quantitative analysis of the GnRH-ir cell bodies was performed in the entire brain of male (n=4) and female (n=4) zebrafish. The total number of GnRH-ir perikarya was thoroughly analyzed (**Table I**) and revealed no significant difference between male ( $209 \pm 22.2$ ) and female ( $262.7 \pm 21.3$ ). To avoid omitting subtle differences in the number of cell bodies, the three main regions of location of GnRH-ir neurons (terminal nerve, ventral telencephalon/preoptic area and midbrain tegmentum) have been analyzed separately (**Table I**). Whatever the region, no sexual dimorphism was observed in number of GnRH-ir neurons. Similarly, the GnRH-ir cell body size was analyzed in the POA (**Table I**) and revealed no difference between male ( $43.08 \pm 2.58 \mu\text{m}^2$ ) and female ( $43.18 \pm 3.87 \mu\text{m}^2$ ).

### **3.3 Short-term exposure to 17 $\alpha$ -ethinylestradiol in male zebrafish**

GnRH immunoreactivity was investigated in the whole brain of male zebrafish control (n=4) and exposed to 1nM of EE2 (n=4) during 7 days. There were no apparent difference in the distribution pattern of GnRH-ir cell bodies between control and EE2-exposed fish. In all fish, GnRH-ir cells were found in the locations previously described (**Fig. 1**).

Quantitative analysis revealed no change in the number of GnRH-ir neurons between control and EE2-exposed fish, and this, whatever the brain region observed (**Table II**). Likewise, the study of GnRH-ir cell body size showed no difference between control and EE2-exposed fish (**Table II**).

## 4. Discussion

In the present study, we characterized the distribution of GnRH systems using an antibody which recognize the two forms of zebrafish GnRHs (GnRH3 and GnRH2). This neuroanatomical distribution of GnRH neurons is in agreement with these previously described in zebrafish by means of *in situ* hybridization (Steven et al., 2003). According to this study, GnRH-ir cells identified in the olfactory bulbs, the terminal nerve, the ventral telencephalon until the hypothalamus corresponds to GnRH3-expressing neurons, while the population of large GnRH-ir cells found in the midbrain tegmentum corresponds to GnRH2-expressing neurons. However, in our study no cell bodies were observed in the facial lobe structure which contrasts with previously reported data by Steven *et al.* (2003) and also Abraham *et al.* (2009) in the transgenic GnRH3: EGFP zebrafish line. The reason for this discrepancy remains unknown.

The distribution of GnRH-ir neurons was studied in male and female and revealed no sexually dimorphic pattern. In addition to the neuroanatomical distribution of GnRH-ir neurons, a relevant aspect of this study is to provide a quantitative analysis of GnRH-ir cell bodies in both male and female zebrafish. The number of GnRH-ir cell bodies was quantified and showed no difference between male and female whatever the population of GnRH-ir neurons considered. Similarly, the analysis of the size of POA GnRH-ir cell bodies revealed no inter-sexual difference. In several other teleost fish, the sexual dimorphism of GnRH neurons has been studied and revealed differences according to the species studied and their reproductive strategies. In several sex-changing fish, such as the protandrous dusky anemonefish (*Amphiprion melanopus*), the protogynous ballan wrasse (*Latrus berggylta*) and the bluehead wrasse (*Thalassoma bifasciatum*), the number and/or the size of GnRH-containing neurons was shown to significantly differ between male and female especially in the POA (Elofsson et

al., 1997; Elofsson et al., 1999; Grober and Bass, 1991). Conversely, in the cichlid fish *Cichlasoma dimerus*, a gonochoristic species, no inter-sexual differences in term of GnRH neurons number or soma size was found (Pandolfi et al., 2005) which is consistent with the absence of GnRH sexual dimorphism found in our study in zebrafish. However, in another gonochoristic fish species, the goldfish (*Carassius auratus*), sex differences were evidenced concerning the size of GnRH cell bodies in POA while no sexual dimorphism was revealed regarding the number of GnRH cells (Parhar et al., 2001). All together, these data indicate that anatomical differences of GnRH neurons exists in fish and is most obvious in sex-changing species in which the GnRH neuronal plasticity is correlated with their sexual plasticity (Foran and Bass, 1999).

In this study we also reported that a short-term exposure of male zebrafish to the synthetic estrogen EE2 had no effect either on the distribution pattern of GnRH-ir neurons or on the number and size (in POA) of GnRH-ir neurons. Studies on the effect of natural or synthetic estrogens on GnRH system are scarce in fish and no data are available for the zebrafish. In the goldfish, estradiol treatment in ovariectomized female had no effect on the number and the size of GnRH-ir cell bodies (Parhar et al., 2001). Similarly, in the juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), sGnRH genes expression was unaffected by short-term exposure to estradiol (Vetillard and Bailhache, 2005). However, long-term implantation of triploid rainbow trout with estradiol resulted in an increase in sGnRH peptide contents in the brain (Breton and Sambroni, 1996). In the catfish (*Clarias gariepinus*), male exposure to 1µg/L of EE2 for 21 days resulted in a decrease of catfish GnRH (cfGnRH) immunoreactivity associated with a decrease of cfGnRH transcripts in POA (Swapna and Senthilkumaran, 2009). In other vertebrate groups, it has been shown that estradiol treatment of male leopard frog (*Rana pipiens*) for 20 days significantly enlarged GnRH soma size without affecting the total number of GnRH neurons in the forebrain (Tsai and Jones, 2005) while in mammals,

neonatal exposure of mouse to high level of  $17\alpha$ -estradiol (10 mg/day for 14 days) caused an increase in the number of GnRH-ir neurons in males (Grober et al., 1998). Taken together, these data show that estrogenic compounds have the capability to induce changes on GnRH neurons but such changes are not systematically observed and the nature and the intensity of effects appear dependent on the experimental conditions used (e.g., concentration and duration of exposure, developmental stage). The lack of significant changes of GnRH neurons in the POA found in our study following EE2 exposure may rely on the exceptionally high capacity of the fish brain to synthesize neuro-estrogens in the entire brain due to high aromatase activity (Pellegrini et al., 2005). Assuming this, the GnRH system during early developmental stages of fish should be more sensitive to hormonal changes compared to adult fish and further investigation are needed to explore the sensitivity of the GnRH system to steroidal treatment during early development of fish.

In summary, the present study provides neuroanatomical and quantitative information about GnRH systems in the brain of male and female zebrafish. Our results indicate that the distribution, the number and the size of GnRH-ir neurons are not sexually dimorphic. We also report the absence of effect of short-term exposure of male zebrafish to EE2 on GnRH-ir neurons distribution, number and size. All together, these results improve our understanding of the GnRH system in a vertebrate model species.

## **Acknowledgements**

This work was supported by the French Ministry of Ecology and Sustainable Development (grant 189\_09 DRC01 and the NEMO project), the French National Research Agency (Project Neuroendocrine Effect of Endocrine Disruptors NEED, CES 2008-011).

## References

- Abraham, E., Palevitch, O., Gothilf, Y., Zohar, Y., 2009. The zebrafish as a model system for forebrain GnRH neuronal development. *Gen Comp Endocrinol.* 164, 151-60.
- Breton, B., Motin, A., Billard, R., Kah, O., Geoffre, S., Precigoux, G., 1986. Immunoreactive gonadotropin-releasing hormone-like material in the brain and the pituitary gland during the periovulatory period in the brown trout (*Salmo trutta* L.): relationships with the plasma and pituitary gonadotropin. *Gen Comp Endocrinol.* 61, 109-19.
- Breton, B., Sambroni, E., 1996. Steroid activation of the brain-pituitary complex gonadotropic function in the triploid rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Gen Comp Endocrinol.* 101, 155-64.
- Elofsson, U., Winberg, S., Francis, R. C., 1997. Number of preoptic GnRH-immunoreactive cells correlates with sexual phase in a protandrously hermaphroditic fish, the dusky anemonefish (*Amphiprion melanopus*). *J Comp Physiol A.* 181, 484-92.
- Elofsson, U. O., Winberg, S., Nilsson, G. E., 1999. Relationships between sex and the size and number of forebrain gonadotropin-releasing hormone-immunoreactive neurones in the ballan wrasse (*Labrus berggylta*), a protogynous hermaphrodite. *J Comp Neurol.* 410, 158-70.
- Foran, C. M., Bass, A. H., 1999. Preoptic GnRH and AVT: axes for sexual plasticity in teleost fish. *Gen Comp Endocrinol.* 116, 141-52.
- Gothilf, Y., Elizur, A., Chow, M., Chen, T. T., Zohar, Y., 1995. Molecular cloning and characterization of a novel gonadotropin-releasing hormone from the gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Mol Mar Biol Biotechnol.* 4, 27-35.
- Grober, M. S., Bass, A. H., 1991. Neuronal correlates of sex/role change in labrid fishes: LHRH-like immunoreactivity. *Brain Behav Evol.* 38, 302-12.
- Grober, M. S., Winterstein, G. M., Ghazanfar, A. A., Eroschenko, V. P., 1998. The effects of estradiol on gonadotropin-releasing hormone neurons in the developing mouse brain. *Gen Comp Endocrinol.* 112, 356-63.
- Herbison, A. E., 2009. Rapid actions of oestrogen on gonadotropin-releasing hormone neurons; from fantasy to physiology? *J Physiol.* 587, 5025-30.
- Kah, O., Breton, B., Dulka, J. G., Nunez-Rodriguez, J., Peter, R. E., Corrigan, A., Rivier, J. E., Vale, W. W., 1986. A reinvestigation of the Gn-RH (gonadotrophin-releasing hormone) systems in the goldfish brain using antibodies to salmon Gn-RH. *Cell Tissue Res.* 244, 327-37.
- Kah, O., Lethimonier, C., Somoza, G., Guilgur, L. G., Vaillant, C., Lareyre, J. J., 2007. GnRH and GnRH receptors in metazoa: a historical, comparative, and evolutive perspective. *Gen Comp Endocrinol.* 153, 346-64.



- Lethimonier, C., Madigou, T., Munoz-Cueto, J. A., Lareyre, J. J., Kah, O., 2004. Evolutionary aspects of GnRHs, GnRH neuronal systems and GnRH receptors in teleost fish. *Gen Comp Endocrinol.* 135, 1-16.
- Pandolfi, M., Munoz Cueto, J. A., Lo Nostro, F. L., Downs, J. L., Paz, D. A., Maggese, M. C., Urbanski, H. F., 2005. GnRH systems of *Cichlasoma dimerus* (Perciformes, Cichlidae) revisited: a localization study with antibodies and riboprobes to GnRH-associated peptides. *Cell Tissue Res.* 321, 219-32.
- Parhar, I. S., Tosaki, H., Sakuma, Y., Kobayashi, M., 2001. Sex differences in the brain of goldfish: gonadotropin-releasing hormone and vasotocinergic neurons. *Neuroscience.* 104, 1099-110.
- Pellegrini, E., Menuet, A., Lethimonier, C., Adrio, F., Gueguen, M.-M., Tascon, C., Anglade, I., Pakdel, F., Kah, O., 2005. Relationships between aromatase and estrogen receptors in the brain of teleost fish. *General and Comparative Endocrinology.* 142, 60-66.
- Powell, J. F., Krueckl, S. L., Collins, P. M., Sherwood, N. M., 1996. Molecular forms of GnRH in three model fishes: rockfish, medaka and zebrafish. *J Endocrinol.* 150, 17-23.
- Powell, J. F., Zohar, Y., Elizur, A., Park, M., Fischer, W. H., Craig, A. G., Rivier, J. E., Lovejoy, D. A., Sherwood, N. M., 1994. Three forms of gonadotropin-releasing hormone characterized from brains of one species. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91, 12081-5.
- Servili, A., Lethimonier, C., Lareyre, J. J., Lopez-Olmeda, J. F., Sanchez-Vazquez, F. J., Kah, O., Munoz-Cueto, J. A., 2010. The Highly conserved gonadotropin-releasing hormone-2 form acts as a melatonin-releasing factor in the pineal of a teleost fish, the european sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Endocrinology.* 151, 2265-75.
- Steven, C., Lehnen, N., Kight, K., Ijiri, S., Klenke, U., Harris, W. A., Zohar, Y., 2003. Molecular characterization of the GnRH system in zebrafish (*Danio rerio*): cloning of chicken GnRH-II, adult brain expression patterns and pituitary content of salmon GnRH and chicken GnRH-II. *Gen Comp Endocrinol.* 133, 27-37.
- Swapna, I., Senthilkumaran, B., 2009. Influence of ethynylestradiol and methyltestosterone on the hypothalamo-hypophyseal-gonadal axis of adult air-breathing catfish, *Clarias gariepinus*. *Aquat Toxicol.* 95, 222-9.
- Tsai, P. S., Jones, J. T., 2005. Steroid-induced changes in the morphology of GnRH neurons in the male leopard frog, *Rana pipiens*: correlation with plasma gonadotropin and gonadal size. *Gen Comp Endocrinol.* 141, 152-60.
- Vetillard, A., Bailhache, T., 2005. Cadmium: an endocrine disrupter that affects gene expression in the liver and brain of juvenile rainbow trout. *Biol Reprod.* 72, 119-26.
- Volkoff, H., Peter, R. E., 1999. Actions of two forms of gonadotropin releasing hormone and a GnRH antagonist on spawning behavior of the goldfish *Carassius auratus*. *Gen Comp Endocrinol.* 116, 347-55.
- Wullimann, M. F., Rupp, B. and Reichert, H. , 1996. *Neuroanatomy of the Zebrafish Brain: A Topological Atlas.* Birkhauser Verlag.

## Annex 1

### **Nomenclature of zebrafish brain nuclei taken from the atlas by Wullimann et al. (1996) :**

A, anterior thalamic nucleus; APN, accessory pretectal nucleus; ATN, anterior tuberal nucleus; CCe, corpus cerebelli; Chab, habenular commissure; Chor, horizontal commissure; CM, corpus mamillare; CP, central posterior thalamic nucleus; CPN, central pretectal nucleus; Cpop, postoptic commissure; Cpost, posterior commissure; D, dorsal telencephalic area; Dc, central zone of dorsal telencephalic area; Dl, lateral zone of dorsal telencephalic area; Dm, medial zone of dorsal telencephalic area; DOT, dorsomedial optic tract; Dp, posterior zone of dorsal telencephalic area; DP, dorsal posterior thalamic nucleus; DTN, dorsal tegmental nucleus; ECL, external cellular layer of olfactory bulb; EG, eminentia granularis ; ENv, entopenduncular nucleus, ventral part; FR, fasciculus retroflexus; GL, glomerular layer of olfactory bulb; Had, dorsal habenular nucleus; Hav, ventral habenular nucleus; Hc, caudal zone of periventricular hypothalamus; Hd, dorsal zone of periventricular hypothalamus; Hv, ventral zone of periventricular hypothalamus; ICL, internal cellular layer of olfactory bulb; IL, inferior lobe; LH, lateral hypothalamic nucleus; LLF, lateral longitudinal fascicle; LR, lateral recess of diencephalic nucleus; MLF, medial longitudinal fascicle; NIII, oculomotor nucleus; NMLF, nucleus of medial longitudinal fascicle; NLV, nucleus lateralis valvulae ; PG, preglomerular nucleus; PGa, anterior preglomerular nucleus; PGI, lateral preglomerular nucleus; PP, periventricular pretectal nucleus; PO, posterior pretectal nucleus; PPa, parvocellular preoptic nucleus, anterior part; PPs, parvocellular preoptic nucleus, posterior part; PR, posterior recess of diencephalic ventricle; PSp, parvocellular superficial pretectal nucleus; PTN, posterior tuberal nucleus ; R, rostromedial nucleus; RF, reticular formation; SC, suprachiasmatic nucleus; SD, saccus dorsalis; SO, secondary octaval population; TeO, tectum opticum; TL, torus longitudinalis; TLa, torus lateralis; TPp, periventricular nucleus of posterior tuberculum; TS, torus semicircularis; V, ventral telencephalic area ; V3, third ventricle; VII, sensory root of the facial nerve; VIII, octaval nerve; VCe, valvula cerebelli; Vd, dorsal nucleus of ventral telencephalic area; VL, ventrolateral thalamic nucleus; VM, ventromedial thalamic nucleus; VOT, ventrolateral optic tract; Vp, postcommissural nucleus of ventral telencephalic area; Vv, ventral nucleus of dorsal telencephalic area; ZL, zona limitans.

## **Chapitre II**

*Effets du 17 $\alpha$ -éthinyloestradiol sur  
l'ontogenèse du système à GnRH  
chez le poisson zèbre*

### ***Contexte***

Dans le chapitre I, nous avons montré qu'une exposition de courte durée à un composé œstrogénique, le 17 $\alpha$ -éthinyloestradiol, n'affectait pas la distribution et les paramètres morphométriques des neurones à GnRH-ir du poisson zèbre au stade adulte. Dans le contexte de la perturbation endocrinienne, l'étude de la sensibilité des poissons aux composés œstrogéniques en fonction de leur stade de développement (i.e., embryonnaire, larvaire, juvéniles, adultes) a fait l'objet de différents travaux (Brion et al. 2004; Maack and Segner 2004; Schafers et al. 2007). Ces études montrent d'une part que la nature et l'intensité des effets d'une exposition à des composés œstrogéniques sont dépendants du stade de développement et d'autre part que les stades précoces du développement sont les plus sensibles aux composés œstrogéniques. C'est au cours des premiers stades de développement que le système à GnRH se met en place chez l'ensemble de vertébrés. L'ontogenèse du système à GnRH hypophysiotrope est un processus complexe au cours duquel les neurones à GnRH, issus de la région olfactive, migrent jusqu'à l'hypothalamus. Le développement de ces neurones est soumis à d'importantes régulations qui le rendent potentiellement sensible aux PE.

### ***Objectifs et démarche expérimentale***

A la lumière de l'ensemble de ces données, il nous est donc paru nécessaire d'explorer les effets potentiels d'une exposition précoce à des composés œstrogéniques sur le système à GnRH. Aussi, l'objectif de ce second chapitre a-t-il consisté à étudier l'effet de l'exposition au 17 $\alpha$ -éthinyloestradiol (EE2) sur l'ontogenèse des neurones à GnRH au cours du développement précoce du poisson zèbre. Parallèlement, nous nous sommes intéressés à l'expression de l'aromatase cérébrale (AroB), codée par le gène *cyp19a1b*, qui est l'enzyme clé de la biosynthèse des œstrogènes et dont les régulations par les œstrogènes eux-mêmes sont maintenant bien connues (Le Page et al. 2006; Menuet et al. 2005).

### ***Résultats principaux***

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans le journal *Aquatic Toxicology* présentée ci-après.

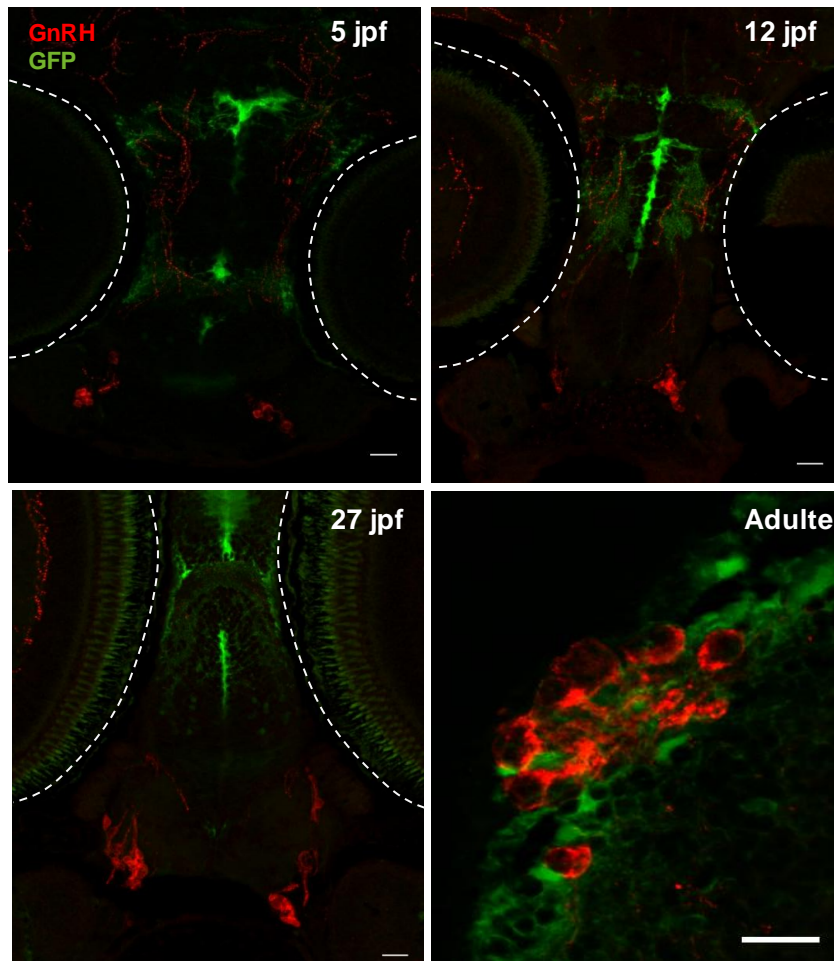
**17 $\alpha$ -ethinylestradiol disrupts the ontogeny of the forebrain GnRH system and the expression of brain aromatase during early development of zebrafish**

*Mélanie Vosges, Yann Le Page, Bon-chu Chung, Yves Combarous, Jean-Marc Porcher  
Olivier Kah and François Brion, Aquatic Toxicology, 2010, 99(4) :479-491.*

Tout d'abord, nous confirmons que les neurones à GnRH sont d'abord détectés à proximité de la région olfactive et migrent, au cours du développement, en direction de l'hypothalamus. Pour la première fois, nous montrons également que l'exposition à l'EE2 (0,02nM, 0,1nM et 0,5nM) au cours du développement embryo-larvaire perturbe l'ontogenèse du système GnRH en induisant une augmentation du nombre de neurones à GnRH-ir dès les stades précoces, cette augmentation étant dépendante de la concentration d'exposition. De même, une réduction de la taille des neurones à GnRH-ir et une perturbation de leur profil de migration ont été mis en évidence chez les larves exposées à l'EE2.

L'expression de l'AroB a été analysée par immunohistochimie durant le développement de larves contrôles et exposées à l'EE2 (0,02nM, 0,1nM et 0,5nM). Cette étude apporte une description détaillée de l'expression spatio-temporelle de l'AroB au cours du développement dans le cerveau et l'hypophyse du poisson zèbre. Nous montrons d'abord que l'EE2 induit massivement l'expression de l'AroB dans les cellules gliales radiaires. Les inductions sont dépendantes du temps et de la concentration en EE2. De manière très significative, elles s'observent pour des concentrations d'EE2 très faibles (0.02 nM) et des temps d'exposition très court (5 jpf), confirmant ainsi l'extrême sensibilité de l'AroB aux xéno-œstrogènes. Nous montrons par ailleurs une expression très précoce de l'aromatase B au niveau de l'hypophyse qui n'est pas perturbée par l'éthinylœstradiol suggérant l'existence d'un promoteur hypophysaire spécifique de l'aromatase B.

Enfin, l'utilisation du modèle de poisson zèbre transgénique exprimant la GFP sous le contrôle du promoteur de l'AroB (*cyp19a1b*-GFP) nous a permis d'étudier les interactions entre les cellules AroB-GFP et les neurones à GnRH-ir. Nous avons montré l'absence de relations entre les deux réseaux neuroendocrines chez les larves transgéniques contrôles (5 jpf) et l'apparition de relations de proximité étroites suite à l'exposition à l'EE2 (5 jpf).



**Figure 13 : Expression de la GnRH (rouge) et de la GFP (vert) chez des poissons zèbres transgéniques *cyp19a1b*-GFP à différents stades du développement et au stade adulte. A 5 jpf, 12 jpf et 27 jpf aucune relation n'est mise en évidence entre les neurones à GnRH-ir et les cellules gliales radiaires exprimant la GFP. Au stade adulte, les neurones à GnRH-ir situés dans le bulbe olfactifs sont entourés de prolongements radiaires GFP-positifs. Les lignes pointillées indiquent les yeux. Echelle = 20µm.**

Des expérimentations complémentaires qui ne sont pas présentées dans l'article 2 ont été menées afin d'étudier l'évolution des relations entre les neurones à GnRH et les cellules gliales radiaire exprimant la GFP chez des poissons zèbres transgéniques *cyp19a1b*-GFP non exposés (**Figure 13**). Nous avons ainsi montré qu'aucune relation de proximité n'est observée dans les stades de vie précoces (3 jpf -non présenté- et **5 jpf**, **Figure 13**) et plus tardifs (**12 jpf et 27 jpf**, **Figure 13**). En revanche, au stade adulte les neurones à GnRH-ir sont très souvent entourés de prolongements radiaires GFP-positifs notamment les neurones situés dans les bulbes olfactifs (**Adulte**, **Figure 13**). Ainsi, au cours du développement normal des poissons, des relations étroites semblent se mettre en place progressivement entre les cellules gliales exprimant l'aromatase B et les neurones GnRH suggérant l'existence de lien fonctionnel qu'il s'agirait de déterminer. Au regard des données acquises chez les embryons et les larves exposées à l'EE2, il apparait que ces relations se mettent en place très précocement puisqu'elles sont observées dès 5 jpf. L'existence d'un lien entre la surexpression de l'AroB chez les larves exposées à l'EE2 et la perturbation du développement des neurones à GnRH constitue un des mécanismes possible qui sous-tend les effets de l'EE2 sur le développement des neurones à GnRH.

### ***Conclusions***

Nous avons démontré que de faibles concentrations d'EE2 affectent l'ontogenèse du système à GnRH mais également l'expression de l'AroB au cours du développement du poisson zèbre. Ainsi, nous montrons qu'un composé œstrogénique de synthèse, largement répandu dans l'environnement, est capable de perturber le développement et l'expression de réseaux neuroendocrines clés chez une espèce modèle de vertébrés.



## 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol disrupts the ontogeny of the forebrain GnRH system and the expression of brain aromatase during early development of zebrafish

Mélanie Vosges<sup>a</sup>, Yann Le Page<sup>b</sup>, Bon-chu Chung<sup>c</sup>, Yves Combarrous<sup>d</sup>,  
Jean-Marc Porcher<sup>a</sup>, Olivier Kah<sup>b,\*\*</sup>, François Brion<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Unité d'écotoxicologie, Direction des Risques Chroniques, Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS), BP 2, F-60550 Verneuil-en-Halatte, France

<sup>b</sup> Neurogenesis and Oestrogens, Université de Rennes 1, UMR CNRS 6026, IFR140, Campus de Beaulieu, 35042 Rennes cedex, France

<sup>c</sup> Taiwan Institute of Molecular Biology, Academia Sinica, Taipei, Taiwan

<sup>d</sup> INRA, CNRS, Université François Rabelais de Tours, Physiologie de la Reproduction et des Comportements Nouzilly, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 23 April 2010

Received in revised form 16 June 2010

Accepted 23 June 2010

#### Keywords:

Gonadotropin-releasing-hormone (GnRH)

Aromatase B (*cyp19a1b*)

Zebrafish (*Danio rerio*)

17 $\alpha$ -Ethinylestradiol (EE2)

(Neuro-) endocrine disruption

Development

### ABSTRACT

Until now, studies dedicated to the actions of endocrine disrupting chemicals (EDCs) on the reproductive axis have been concerned with their effects at the gonadal level leaving their actions on neuroendocrine circuits controlling reproduction virtually unexplored. In vertebrates, gonadotropin-releasing hormone (GnRH) is the key factor controlling the activity of the reproductive axis. The development and functioning of GnRH neurons are finely tuned by a series of factors, notably sex steroids, making these neurons potential targets of EDCs, notably in aquatic species. By means of immunohistochemistry, we examined the effects of low levels of ethinylestradiol (EE2 0.02 nM, 0.1 nM, 0.5 nM), a potent synthetic estrogen, on early development (at 5, 10, 20, 30 days post-fertilization) of the forebrain GnRH neurons in a model fish species, the zebrafish (*Danio rerio*). In parallel, the ER-regulated expression of cytochrome P450 aromatase B (AroB) protein, which is encoded by the *cyp19a1b* gene, was precisely mapped at the brain and pituitary levels in developing control and EE2-exposed zebrafish. We show that EE2 disrupts the ontogeny of GnRH system by inducing an increase in the number of GnRH-ir neurons and GnRH fibers based on their immunoreactivity as well as a decrease in the size of the GnRH-ir soma and a modification of the migration profile of GnRH-ir neurons. Furthermore, we report a spectacular dose and time-dependent induction of AroB expression in radial glial cells of the developing brain further illustrating the extreme sensitivity of AroB to xenoestrogen and the relevance of AroB as biomarker of xenoestrogen effects on the central nervous system. Collectively, these original and relevant observations highlight the sensitivity of GnRH and AroB to a synthetic estrogen during embryogenesis. These data reinforce the need to further study the mechanisms underlying EDC effects on key neuroendocrine circuits involved in reproduction and brain development of vertebrates.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

In recent years, there has been increasing concern about the detrimental effects of many natural and synthetic chemicals present in the environment on the endocrine system of organisms (Colborn et al., 1993). These compounds have been referred as endocrine disrupting chemicals (EDCs). They include a wide range of molecules such as pesticides, phthalates, alkylphenols as well as

natural and synthetic hormones that are able to interfere through several mechanisms with the endocrine system, notably leading to deleterious effects on the development of animals and their subsequent reproductive health (Kavlock et al., 1996; Vos et al., 2000).

In light of these observations, numerous studies have addressed the effects of EDC exposure on the reproductive axis of wildlife or humans. However, most of these studies have primarily focused on peripheral effects of EDCs such as gonadal development, oocyte development, egg production and fertilization, sperm count and liver vitellogenin induction in oviparous species (for review see, e.g. Hotchkiss et al., 2008). However, the reproductive axis also includes upper levels of regulation within the forebrain which harbors the neuroendocrine systems controlling the activation and functioning of the peripheral reproductive organs. At this level, complex networks of neuroendocrine circuits act coordinately to regulate the reproductive function. Central to these neuroregulatory networks are the forebrain gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons

**Abbreviations:** AroB, aromatase B; dpf, days post-fertilization; EDC, endocrine disrupting chemical; EE2, ethinylestradiol; GnRH, gonadotropin-releasing hormone; ir, immunoreactive.

\* Corresponding author. Tel.: +33 3 44 55 65 12; fax: +33 3 44 55 67 67.

\*\* Corresponding author. Tel.: +33 2 23 23 67 65; fax: +33 2 23 23 67 94.

E-mail addresses: [olivier.kah@univ-rennes1.fr](mailto:olivier.kah@univ-rennes1.fr) (O. Kah), [francois.brion@ineris.fr](mailto:francois.brion@ineris.fr) (F. Brion).



that produce the GnRH decapeptide. GnRH is integral to the regulation of the reproductive axis by finely tuning the synthesis and release of the pituitary gonadotropins LH (Luteinizing Hormone) and FSH (Follicle-Stimulating Hormone). In turn, these two hormones regulate gametogenesis and steroidogenesis in the gonads. The activity of the GnRH neurons is finely tuned by a series of internal and external factors, notably sex steroids (Herbison, 2009), making these neurons a potential prime target for EDCs.

Recent studies support the hypothesis that EDCs can affect the GnRH system and may impact pubertal development in different vertebrate models, including mammals and humans (Diamanti-Kandarakis et al., 2009; Dickerson and Gore, 2007; Gore, 2008). However, the precise mechanisms underlying such effects are still a matter of debate (Hotchkiss et al., 2008).

Given their aquatic habitat, fish are primary targets for EDCs and there are rapidly accumulating data showing that numerous substances belonging to various chemical classes such as natural and synthetic estrogens, alkylphenols, bisphenol, pesticides and dioxins impact the reproductive success of fish. Observed effects range from feminization or incomplete gametogenesis to total reproductive failure (for a review see Mills and Chichester, 2005). However, as in other vertebrates, the potential effects of EDCs on the neuroendocrine circuits controlling reproduction or on brain sexualization are totally unexplored.

In agreement with its pivotal roles in the reproductive axis, the GnRH systems have been highly conserved throughout evolution (Kah et al., 2007). In teleost fish, depending on the species, two or three different variants of GnRH are expressed in the brain (Gothilf et al., 1995; Powell et al., 1994). In zebrafish (*Danio rerio*), a popular teleost model, two GnRH variants have been identified (Powell et al., 1996) and characterized (Steven et al., 2003): GnRH2 (corresponding to the chicken GnRH-II variant) that is synthesized in large neurons of the synencephalon and GnRH3, corresponding to the salmon GnRH variant (Kah et al., 1986; Lethimonier et al., 2004), which is expressed in a continuum of neurons extending from the olfactory bulbs to the anterior hypothalamus (Kah et al., 1986; Lethimonier et al., 2004). The GnRH3 decapeptide corresponds to the hypophysiotrophic variant that controls gonadotropin release (Steven et al., 2003), while the function of GnRH2 is less clear although in fish its roles in sexual behavior (Volkoff and Peter, 1999) and in modulation of pineal function (Servili et al., 2010) are documented. In all vertebrates, in contrast to the cGnRH-II neurons that develop from a mesencephalic primordium, the forebrain GnRH neurons arise from the olfactory placode region and migrate within the forebrain along a rostro-caudal path (Palevitch et al., 2007; Zohar et al., 2010). In zebrafish, GnRH3 neurons identified by means of *in situ* hybridization or using a *tg(gnrh3-GFP)* transgenic line first appear in the olfactory placode region and then rapidly migrate through the olfactory bulbs, telencephalon and anterior hypothalamus where they settle down (Palevitch et al., 2007).

Another central mechanism known to be potentially affected by EDCs is the sexualization of the brain, which in males is thought to rely on early effects of testosterone converted into estradiol within the brain by the cytochrome P450 aromatase. In mammals, the resulting estrogens then cause irreversible sexual dimorphism. The brain of adult teleost fish exhibits a high capacity to aromatize androgens into estrogens (Pasmanik and Callard, 1985, 1988), due to the strong expression of brain aromatase B (AroB), encoded by the *cyp19a1b* gene (Chiang et al., 2001; Tchoudakova et al., 2001). Expression of *cyp19a1b* in the brain is regulated by estrogens (Menuet et al., 2005) and several studies highlight the dramatic effects of estrogenic compounds on *cyp19a1b* expression especially at larval stage (Cheshenko et al., 2007; Hinfray et al., 2006; Kazeto et al., 2004). Although the precise functions of brain aromatization in fish remains to be established, the fact that AroB is expressed

in progenitor radial glial cells might reflect a potential modulatory effect of EDCs on neurogenesis and brain sexualization.

Among EDCs, natural and synthetic steroidal estrogens (including the pharmaceutical 17 $\alpha$ -ethinylestradiol, EE2) are some of the major and most potent estrogenic contaminants in the aquatic environment. They have been detected in effluents from sewage water treatment plant, in surface waters and in river sediments in several industrialized countries. For instance, EE2 is often measured in effluents and surface waters, at concentrations ranging from <1 ng/l to 15 ng/l (Cargouet et al., 2004; Desbrow et al., 1998; Ternes et al., 1999) and exceptionally up to 42 ng/l (Ternes et al., 1999). Several laboratory studies have documented that fish exposure to environmentally relevant concentrations of estrogens leads to an array of biological responses that include induction of vitellogenin (an estrogen-dependent yolk precursor) in juveniles and males, altered sexual differentiation, retardation of gonadal growth and failure of reproductive success (Brion et al., 2004; Lange et al., 2008; Nash et al., 2004; Schäfers et al., 2007). The underlying mechanisms are far from being fully understood, but many of these effects could be somehow linked to potential impacts on neuroendocrine circuits controlling reproduction, notably the GnRH system or the process of brain sexualization. However, disruption of central mechanisms has never been documented in fish and rarely in other vertebrates.

Therefore, the present study aimed at assessing the effects of EE2 on the ontogeny of the forebrain GnRH3 system in zebrafish using immunohistochemistry combined to morphometric analyses. In addition, the effects of EE2 on AroB expression during the early development of zebrafish were examined using immunohistochemistry. Apart from brain sexualization, AroB is likely involved in the neuroendocrine regulation of reproductive function through poorly understood mechanisms. In this scope, relationships between AroB-expressing radial glial cells with the GnRH system are not excluded. To investigate such potential interactions, we used a newly established zebrafish transgenic line that expresses Green Fluorescent Protein (GFP) driven by the zebrafish *cyp19a1b* promoter (Tong et al., 2009). The interactions between forebrain GnRH and AroB-expressing cells could then be investigated by assessing GFP expression and GnRH immunoreactivity in both control and EE2-exposed fish.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Experiment 1: Effects of low concentrations of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol on the ontogeny of the forebrain GnRH system and the expression of aromatase B in wild type zebrafish

#### 2.1.1. Animals and egg production

All animal protocols in this study were approved by the ethical committee of the National Institute of Industrial Environment and Risks. Sexually mature wild type male and female zebrafish (*Danio rerio*, AB strain) were used as breeding stocks. The fish were raised in a recirculated water system (Techniplast, France) at 27 °C under a controlled photoperiod (14 h light/10 h dark cycle). They were fed twice daily with TetraMin fish flake and live brine shrimp (*Artemia* spp.; Ocean Nutrition). For breeding, a spawning tray was placed in each aquarium (sex ratio: 1 female:2 males) and spawning of fish was stimulated by light. Eggs were collected and cleaned the following morning. Fertilized eggs were randomly distributed to experimental tanks.

#### 2.1.2. Chemicals and exposure design

17 $\alpha$ -Ethinylestradiol (EE2; >98% pure) was purchased from Sigma-Aldrich (St. Quentin Fallavier, France). The stock solution of 10 mM EE2 was prepared in dimethylsulfoxide (DMSO);



Sigma–Aldrich) and was then serially diluted to experimental solutions of 0.2  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  and 5  $\mu\text{M}$ . At 1-day post-fertilization (dpf), zebrafish embryos were transferred to 2 l water tanks and exposed to EE2 at nominal concentrations of 0.02 nM, 0.1 nM and 0.5 nM (respectively 6 ng/l, 30 ng/l and 150 ng/l) or to solvent control (DMSO; 0.01% v/v). Each tank contained 150 embryos. For each exposure condition, there were two replicates. Tanks were kept in an incubator at 28 °C under semi-static conditions with a half renewal of water every 2 days. Exposures were performed from 1 dpf to 30 dpf with sequential sampling at 5 dpf, 10 dpf, 20 dpf and 30 dpf.

### 2.1.3. Larval sampling and processing

Samples of 15 larvae per replicate were randomly collected at 5 dpf, 10 dpf, 20 dpf and 30 dpf. For each sampling point, larvae were fixed overnight at 4 °C in 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS). After rinsing in PBS, samples were successively transferred to 10%, 20% and 30% sucrose–PBS solution at 4 °C and they were then embedded in Neg-50 cryo-compound (Microm Microtech, France). Frozen sections of larvae were cut to a thickness of 12  $\mu\text{m}$  and stored at –20 °C until used.

### 2.1.4. Immunohistochemistry

**2.1.4.1. Antibodies.** The GnRH antibody, BB8 (Breton et al., 1984) used for this study was raised in rabbit against salmon GnRH. BB8 was used at a dilution of 1:2000. The purified aromatase B antibody (Menuet et al., 2005) was raised in rabbit against zebrafish AroB and was used at a 1:300 dilution. AlexaFluor 594-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:200; Invitrogen, France) was used as secondary antibody for GnRH and AroB immunodetection. To control the specificity of the staining, sections were processed without the primary antibody.

**2.1.4.2. Immunofluorescence staining.** Frozen sections were rinsed 2 times in PBS for 5 min at room temperature. After rinsing, they were incubated for 1 h in a PBS solution containing 0.2% Triton X-100 and 0.5% milk powder. Incubation with the primary antibody was performed overnight in 0.5% milk powder in PBS. Sections were then washed 3 times during 10 min in PBS solution containing 0.2% Triton X-100 before being incubated for 2 h with the secondary antibody. After rinsing the sections in PBS (3  $\times$  10 min), nuclear staining was performed using 3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Hoechst 33342 (Invitrogen, France) in PBS for 5 min. Finally the slides were rinsed in PBS for 10 min and coverslipped using a fluorescence mounting medium (DAKO, France).

### 2.1.5. Analysis

Immunofluorescence staining was observed using a Zeiss AxioImager.Z1 fluorescence microscope combined with an ApoTome (Zeiss GmbH, Göttingen, Germany). Micrographs were analyzed using the Axiovision Imaging software. For 40 $\times$  and 63 $\times$  objectives, series of optical sections along the z-axis were acquired at 0.3–0.5  $\mu\text{m}$  intervals and projected in a single image (maximum-intensity projection). Neuroanatomical localization and nomenclature of brain nuclei follows that of Mueller and Wullmann (2005).

**2.1.5.1. GnRH immunohistochemistry.** GnRH immunostaining was analyzed on sections of 10 larvae per developmental stage and per exposure condition. Every field containing GnRH-immunopositive neurons was photographed with 40 $\times$  and 63 $\times$  objectives. These digitized images were then used to determine the total number of GnRH cell bodies by manually counting every nucleated GnRH-ir neurons for each larva. The GnRH soma area was quantified by analyzing the perimeter of each GnRH-immunoreactive neuron with the outline spline tool of the Axiovision Imaging software. All these

morphometric data were blindly performed without a priori knowledge of the specimen identity.

**2.1.5.2. Brain aromatase (AroB) immunohistochemistry.** AroB labeling was observed on the entire brain of 5 larvae per developmental stage and for each condition of exposure and microphotographs were captured using the 20 $\times$  objective. Localization of aromatase B-immunopositive structures in the developing brain of larvae was compared between experimental groups.

## 2.2. Experiment 2: Effects of low concentration of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol on the spatial relationships between GnRH system and AroB expressing cells using the zebrafish *cyp19a1b*-GFP transgenic line

### 2.2.1. Animals and exposure design

*Cyp19a1b*-GFP transgenic zebrafish embryos of 1 dpf were exposed to EE2 at nominal concentrations of 0.02 nM, 0.1 nM and 0.5 nM or to solvent control (DMSO; 0.01% v/v). Each experimental group was constituted of 10 embryos (in duplicate) exposed in 100 ml of water. Embryos were kept in an incubator at 28 °C, under semi-static conditions with 50% of daily water renewal. Exposures were performed from 1 dpf to 5 dpf. Larvae were processed for GnRH immunohistochemistry as described above.

### 2.2.2. Analysis

The analysis of potential interactions between GnRH neurons and GFP-expressing cells was performed in 10 larvae for each condition of exposure using a Zeiss AxioImager.Z1 fluorescence microscope combined with an ApoTome at 400 $\times$  magnification with optical sections in the z-axis of 0.3  $\mu\text{m}$ . Each of the z-sections containing GnRH neurons was examined sequentially to detect interactions with GFP-positive cells. Maximum-intensity projections were produced using the Axiovision Imaging software.

## 2.3. Statistical analysis

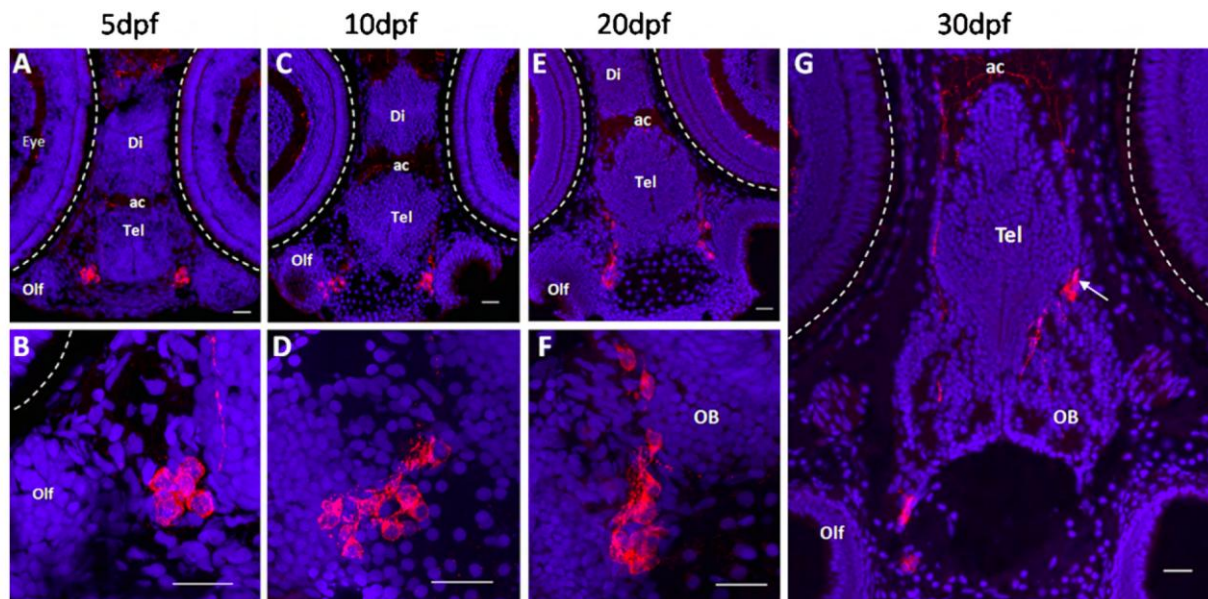
The total number of GnRH-ir cell bodies as well as the surface of GnRH-ir soma were expressed as means  $\pm$  standard error of the mean (S.E.M.) of  $n$  independent observations. Data were statistically analyzed using the *Kruskal–Wallis* non-parametric test followed by the post hoc *Dunn's* test for multiple comparisons (Anastats software). A  $p$  value of less than 0.05 was considered to be statistically significant.

## 3. Results

### 3.1. Ontogeny of the forebrain GnRH system in wild type control zebrafish

The development of the forebrain GnRH system was analyzed in control conditions by means of immunohistochemistry at 5 dpf, 10 dpf, 20 dpf and 30 dpf (Fig. 1). At 5 dpf, two symmetrical clusters of GnRH-immunoreactive (ir) cell bodies were localized in the transitional area between the olfactory region and olfactory bulb (Fig. 1A and B). These immunoreactive cells consist of a round shaped soma that project fibers bilaterally to the telencephalon, some of which decussate through the anterior commissure and more caudally at the level of the preoptic area. At 10 dpf, the number of GnRH-ir cell bodies per cluster slightly increased (Fig. 1C and D). These perikarya extend through the olfactory nerve to the olfactory bulb and appear to migrate along their own axonal pathway towards the telencephalon. At this developmental stage, the density of the GnRH-ir fiber network increases while keeping the same pattern as that described at 5 dpf. At 20 dpf, GnRH-ir cell bodies form a continuum of closely associated cells extending from the





**Fig. 1.** Temporal and spatial expression of forebrain GnRH during zebrafish development: representative photomicrographs (from  $n = 10$  larvae per developmental stage) of GnRH-immunoreactive structures (red) on coronal sections (anterior = bottom). (A) 5 dpf larvae with two clusters of GnRH-ir neurons in the transitional zone between olfactory placode and olfactory bulb (200 $\times$  magnification). (B) 400 $\times$  magnification of GnRH-ir neurons shown in (A). (C) 10 dpf larvae showing GnRH-ir neurons extended to the olfactory bulb (200 $\times$  magnification). (D) 400 $\times$  magnification of GnRH-ir neurons shown in (C). (E) 20 dpf larvae showing a continuum of GnRH-ir perikarya extending from the olfactory region to the ventral telencephalon (200 $\times$  magnification). (F) 400 $\times$  magnification of GnRH-ir migrating cells. (G) 200 $\times$  magnification of 30 dpf larvae displaying GnRH-ir migrating neurons spreading within the telencephalon (arrow). Olf, olfactory placode; Tel, telencephalon; Di, diencephalon; ac, anterior commissure; OB, olfactory bulb. Dotted lines indicate eyes. Blue: Hoechst staining. Scale bars = 20  $\mu\text{m}$ .

olfactory region to the ventral telencephalon (Fig. 1E and F). These migrating immunoreactive cells appear more elongated possibly reflecting the fact that they are migrating. The distribution pattern of GnRH-ir neurons at 30 dpf does not differ much from the previous stage, apart from the fact that migrating neurons have reached the ventral telencephalon (Fig. 1G).

### 3.2. Effects of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol on the ontogeny of the forebrain GnRH system in wild type zebrafish

Quantitative analyses of GnRH immunoreactivity were performed at 5 dpf, 10 dpf and 20 dpf. At 30 dpf, coronal sectioning of the entire brain proved difficult making quantitative analyses impossible at this stage. The number of forebrain GnRH-ir neurons was counted during zebrafish development and revealed significant differences between the experimental groups. At 5 dpf the average number of GnRH-ir cell bodies in the forebrain of control larvae was  $20.5 \pm 1.4$  ( $n = 10$ ; Fig. 2). At this stage, the 0.1 nM and 0.5 nM EE2-treated groups displayed a significantly higher number of GnRH-ir neurons ( $28.5 \pm 1.7$  and  $30.3 \pm 0.9$  respectively,  $n = 10$ ,  $p < 0.05$ ; Fig. 2) as compared to the control group. At 10 dpf, the number of GnRH-ir perikarya increased in all experimental groups, but the 0.1 nM and 0.5 nM EE2-treated groups showed a significantly higher number of cell bodies compared to the control group (Figs. 2 and 3). At 20 dpf, the number of GnRH-ir perikarya still increased, but statistical significance was achieved only in the 0.1 nM group ( $p < 0.05$ ). Whatever the developmental stage, no differences were observed between the group exposed to 0.02 nM EE2 and the control group.

In addition to the number of GnRH-ir neurons, we also assessed the effect of EE2 on the size of GnRH-ir soma as a function of exposure condition and developmental stage (Fig. 4). At 5 dpf, the average surface of GnRH-ir soma in the control group was  $37.8 \pm 1.1 \mu\text{m}^2$  ( $n = 10$ ). This average surface remained unchanged during the developmental stages recorded in control group. At

5 dpf, the mean of GnRH-ir soma size of all EE2-treated groups did not differ significantly from the control group.

By contrast, at 10 dpf the size of the GnRH-ir cell bodies in the EE2 0.1 nM and EE2 0.5 nM groups was significantly reduced ( $31.9 \pm 1 \mu\text{m}^2$  and  $31.2 \pm 1.1 \mu\text{m}^2$ ,  $n = 10$ ,  $p < 0.05$ ) as compared to the control group ( $37.8 \pm 1.4 \mu\text{m}^2$ ,  $n = 10$ ). In these two treated groups, there is a significant reduction of the GnRH-ir neuronal surface compared to that observed at 5 dpf ( $p < 0.05$ ). This situation was transient since no more differences were observed between the experimental groups at 20 dpf.

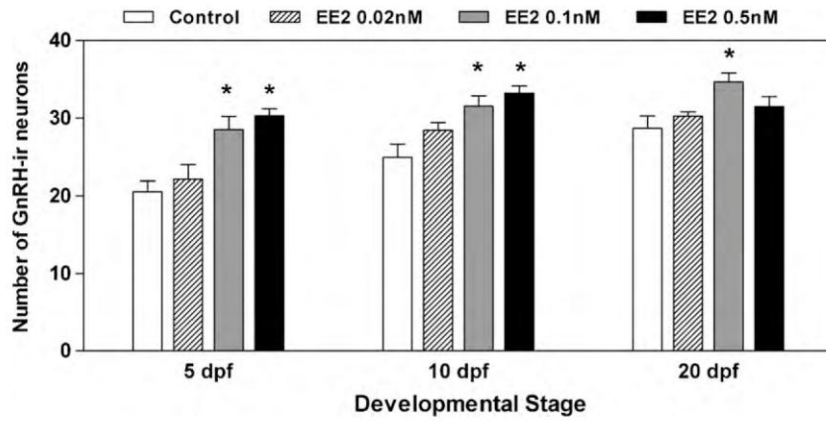
Examination of forebrain GnRH development in EE2-treated groups revealed differences in term of spatial distribution of GnRH-ir cell bodies compared with the control group. Indeed, GnRH-ir neurons in 0.1 nM and 0.5 nM EE2-treated groups were more widely dispersed in ventral position, spreading over a larger number of adjacent sections than in the control group (data not shown).

We also noted differences in the GnRH-ir fibers between the controls and the EE2-treated groups. More specifically, in the 0.5 nM EE2 group, the density of GnRH-ir fibers issued from the forebrain GnRH neurons appeared clearly higher than in the untreated group especially at 5 dpf (Fig. 5A and B) and 10 dpf (Fig. 5C and D).

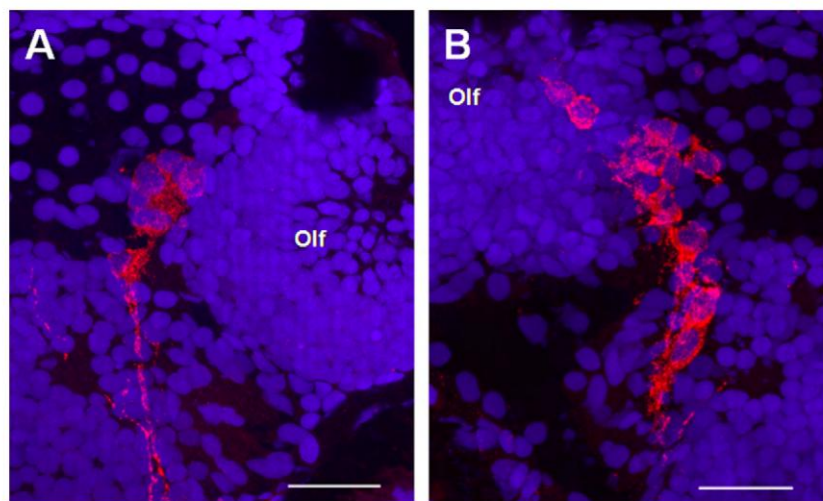
### 3.3. AroB expression during development in wild type control zebrafish

AroB expression in the control conditions was monitored during development by immunohistochemistry. Fig. 6 shows the development of AroB expression in the rostral hypothalamus (Hr), the pituitary (Pit) and the caudal hypothalamus (Hc) at 5 dpf, 10 dpf, 20 dpf and 30 dpf. At 5 dpf, AroB immunoreactivity was mainly restricted to the pituitary (Fig. 6B). At this level, a dense cluster of immunoreactive cells was identified, while only immunoreactive processes were observed within the brain (Fig. 6A). At 10 dpf, the AroB immunoreactivity in the pituitary persisted (Fig. 6E) and





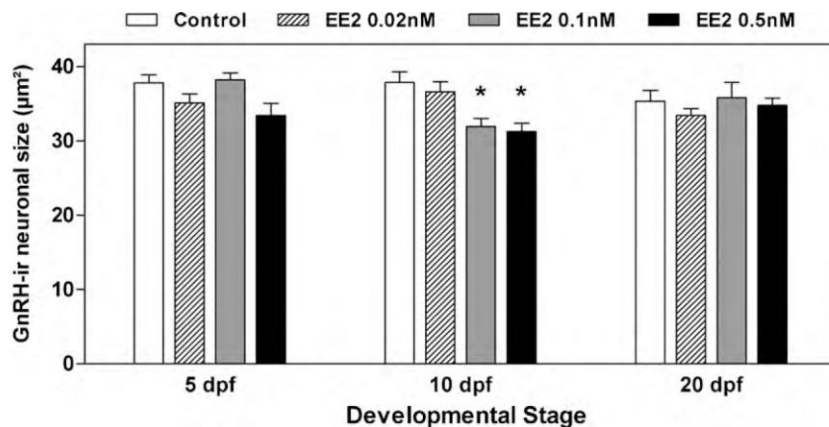
**Fig. 2.** Effects of EE2 exposure on forebrain GnRH-ir cell number during zebrafish development. Values are expressed as means  $\pm$  S.E.M. ( $n = 10$  larvae per treatment group). \* $p < 0.05$  compared with control group (Kruskal–Wallis nonparametric test with *post hoc* Dunn’s test for multiple comparisons).



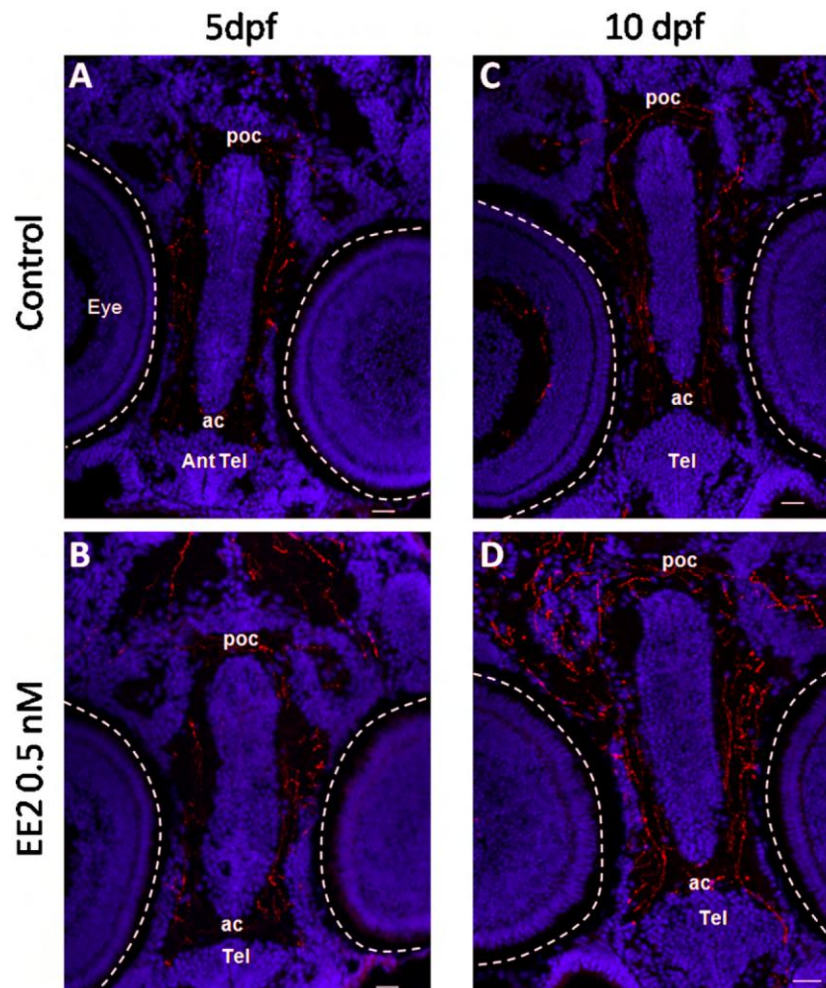
**Fig. 3.** Representative photomicrographs of forebrain GnRH-ir neurons (red) of 10 dpf zebrafish larvae control (A) and exposed to 0.5 nM of EE2 (B). Sections were photographed at 400 $\times$  magnification. Olf, olfactory placode. Blue: Hoechst staining. Scale bars = 20  $\mu$ m.

processes in the brain significantly intensified (Fig. 6D). At this stage, we observed the presence of a few AroB-ir cells in the caudal hypothalamus (Fig. 6F). At 20 dpf, the number of AroB-positive cells increased in the caudal hypothalamus, around the lateral and posterior recesses (Fig. 6I). The pituitary expression of AroB remained, while the pituitary increased in size (Fig. 6H). At this stage, AroB-ir

processes were observed in the rostral hypothalamus and in the optic tectum (Fig. 6G). At 30 dpf, the number of AroB-ir cells in the pituitary increased (Fig. 6K) as well as the AroB expression in the caudal hypothalamus, within the nucleus recessus posterioris (Fig. 6L). In addition, at this stage, we observed some AroB-ir cell bodies appearing in the rostral hypothalamus (Fig. 6J).



**Fig. 4.** Effects of EE2 exposure on forebrain GnRH-ir soma size during zebrafish development. Data are means  $\pm$  S.E.M. ( $n = 10$  larvae per treatment group). \* $p < 0.05$  compared with control group (Kruskal–Wallis nonparametric test with *post hoc* Dunn’s test for multiple comparisons).



**Fig. 5.** Representative photomicrographs of GnRH-fibers immunoreactivity (red) on coronal sections of zebrafish brain (anterior = bottom). Control larvae at 5 dpf (A) and 10 dpf (B) displayed lower GnRH-immunoreactivity than larvae exposed to 0.5 nM of EE2 at 5 dpf (C) and 10 dpf (D) respectively. Sections were photographed at 200 $\times$  magnification. Tel, telencephalon; ac, anterior commissure; poc, postoptic commissure. Dotted lines indicate eyes. Blue: Hoechst staining. Scale bars = 20  $\mu$ m.

#### 3.4. Effects of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol on the AroB expression in wild type zebrafish

As previously described, at 5 dpf, the AroB immunoreactivity in control larvae was limited to the cells localized in the pituitary and only a few cytoplasmic extensions were detected in the brain (Figs. 6A–C and 7A–E). At this stage, the EE2-exposed groups also displayed AroB-ir cells in the pituitary (Fig. 7I, N, and S) and this AroB expression did not seem to be further increased by EE2 since no obvious differences in term of intensity of the immunoreactions were observed as compared to the control group. Hence, at the pituitary level, the pattern of AroB expression remained unchanged across experimental groups at all developmental stages examined, although an increase of immunoreactivity was observed during development (data not shown).

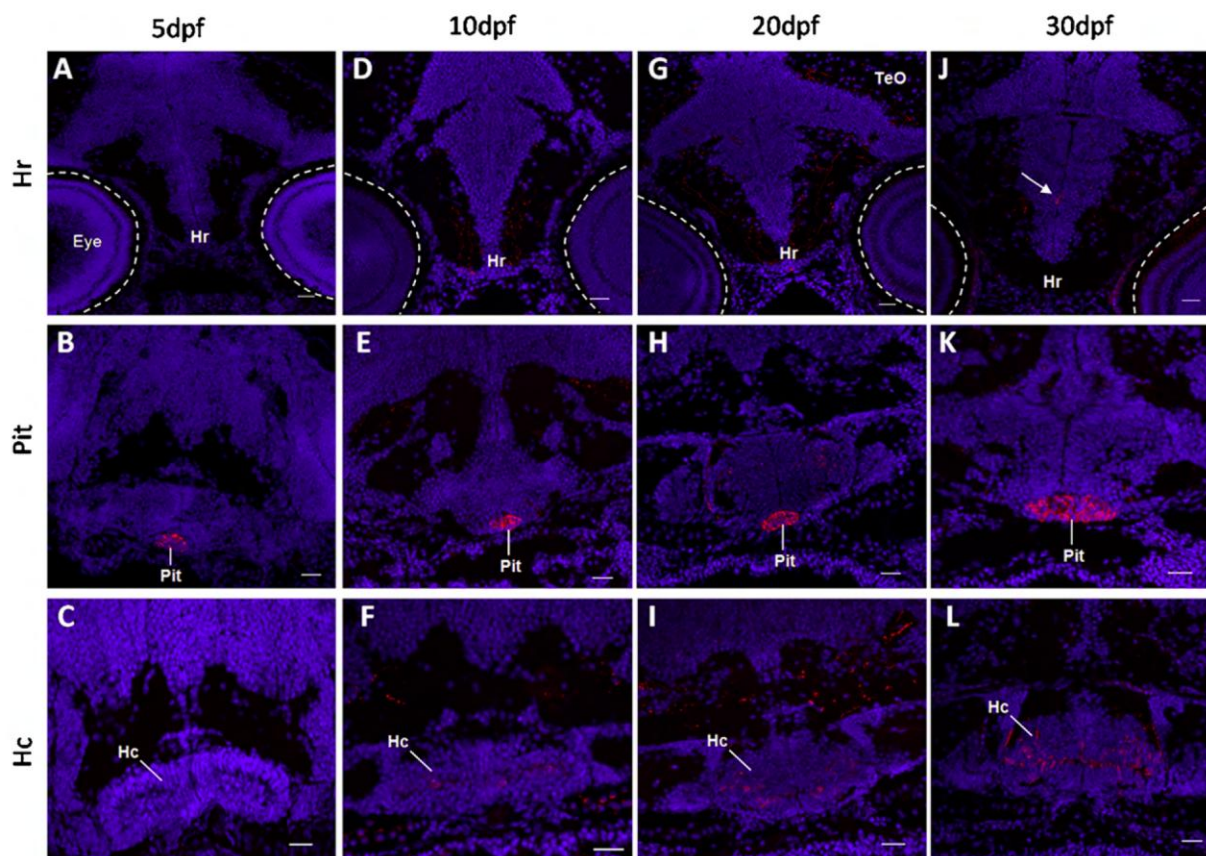
In contrast, the observations of AroB immunoreactivity in the brain of fish highlighted significant differences among experimental groups. These differences were detected as early as 5 dpf (Fig. 7) and persisted in all subsequent stages examined. Strikingly contrasting with control groups that exhibited only a few processes (Fig. 7C), the three EE2-treated groups showed a spectacular AroB immunoreactivity within the brain (Fig. 7F–T). This up-regulation of AroB expression was clearly concentration-dependent among treated groups and was already observed with the lowest exposure concentration (EE2 0.02 nM) as early as the fourth day of exposure

(Fig. 7F–J). AroB immunoreactivity was detected in cells with the typical morphology of radial glial cells. Indeed, these cells exhibited small nuclei close to the ventricular surface and had long cytoplasmic processes extending radially to the pial surface of the brain. At 5 dpf, these AroB-ir cells were located in the caudal olfactory bulbs, the telencephalon (Fig. 7F, K, and P), the preoptic region (Fig. 7G, L and Q), the optic tecta, the rostral hypothalamus (Fig. 7H, M and R), and caudal hypothalamus, around the lateral (Fig. 7I, N and S), and posterior recessi (Fig. 7J, O and T). AroB-positive cells were also observed bordering the fourth ventricle up to the spinal cord. These radial glial cells emitted many processes that terminate by strongly immunoreactive endfeet at the ventral surface of the brain. The expression pattern of AroB immunoreactivity in the brain remained unchanged at 10 dpf, 20 dpf and 30 dpf while the intensity of AroB immunoreactivity increased during development as illustrated in Fig. 8, demonstrating that up-regulation of AroB was time-dependent and EE2 concentration-dependent.

#### 3.5. Spatial relationships between the GnRH-3 system and AroB-positive structures using the zebrafish *cyp19a1b*-GFP transgenic line

Potential relationships between the forebrain GnRH system and AroB expressing cells were investigated using the transgenic zebrafish line *cyp19a1b*-GFP (Fig. 9). In control larvae, no particu-





**Fig. 6.** Temporal and spatial expressions of AroB during zebrafish development: photomicrographs of AroB-immunoreactive structures (red) on transversal sections of zebrafish larvae in control condition. (A–C) 5 dpf larva showing AroB-ir cell in the pituitary (B) and few AroB-ir processes in Hr (A). (D–F) 10 dpf larva with AroB-ir cells in pituitary (E), Hc (F) and increase immunoreactivity in Hr AroB-ir processes (D). (G–I) 20 dpf larva showing AroB-ir processes in Hr and in TeO (G), AroB-ir cells in pituitary (H) and increase in Hc AroB-ir cells (I). (J–L) 30 dpf larva showing AroB-ir cells in Hr (J, arrow), pituitary (K) and Hc (L). Sections were photographed at 200× magnification. Hr, rostral hypothalamus; TeO, tectum opticum; Pit, pituitary; Hc, caudal hypothalamus. Dotted lines indicate eyes. Blue: Hoechst staining. Scale bars = 20 μm.

lar spatial relationships were observed between the two clusters of GnRH-ir neurons of the olfactory region and GFP expression (Fig. 9A and B). However, in the three EE2-treated groups, we detected close associations between GnRH-ir neurons and GFP expressing cells. As expected, the GFP positive cells were clearly radial glial cells. The associations between GnRH-ir neurons and GFP positive cells increased according to the EE2 concentration.

In 0.02 nM EE2-treated larvae, only a few contacts between GnRH-ir neurons and GFP-positive processes were observed (Fig. 9C and D). In 0.1 nM EE2-treated larvae, we observed more numerous extensions of GFP expressing cells surrounding GnRH-ir neurons (Fig. 9E–F). Finally, in 0.5 nM EE2-treated larvae, GFP-positive processes were much more abundant, forming a dense network totally engulfing GnRH-ir neurons (Fig. 9G and H).

#### 4. Discussion

The aim of the present study was to document the effects of the synthetic estrogen, EE2, on two important neuroendocrine targets, the forebrain GnRH neurons and the brain aromatase B, during zebrafish development. Using immunohistochemistry, we demonstrate for the first time that low concentrations of EE2 alter the development of the forebrain GnRH system and strongly up-regulate AroB expression at concentrations as low as 0.02 nM of EE2. These results further stress the importance of effects of environmentally relevant EE2 concentrations on key neuroendocrine networks involved in the development of a functional reproductive axis.

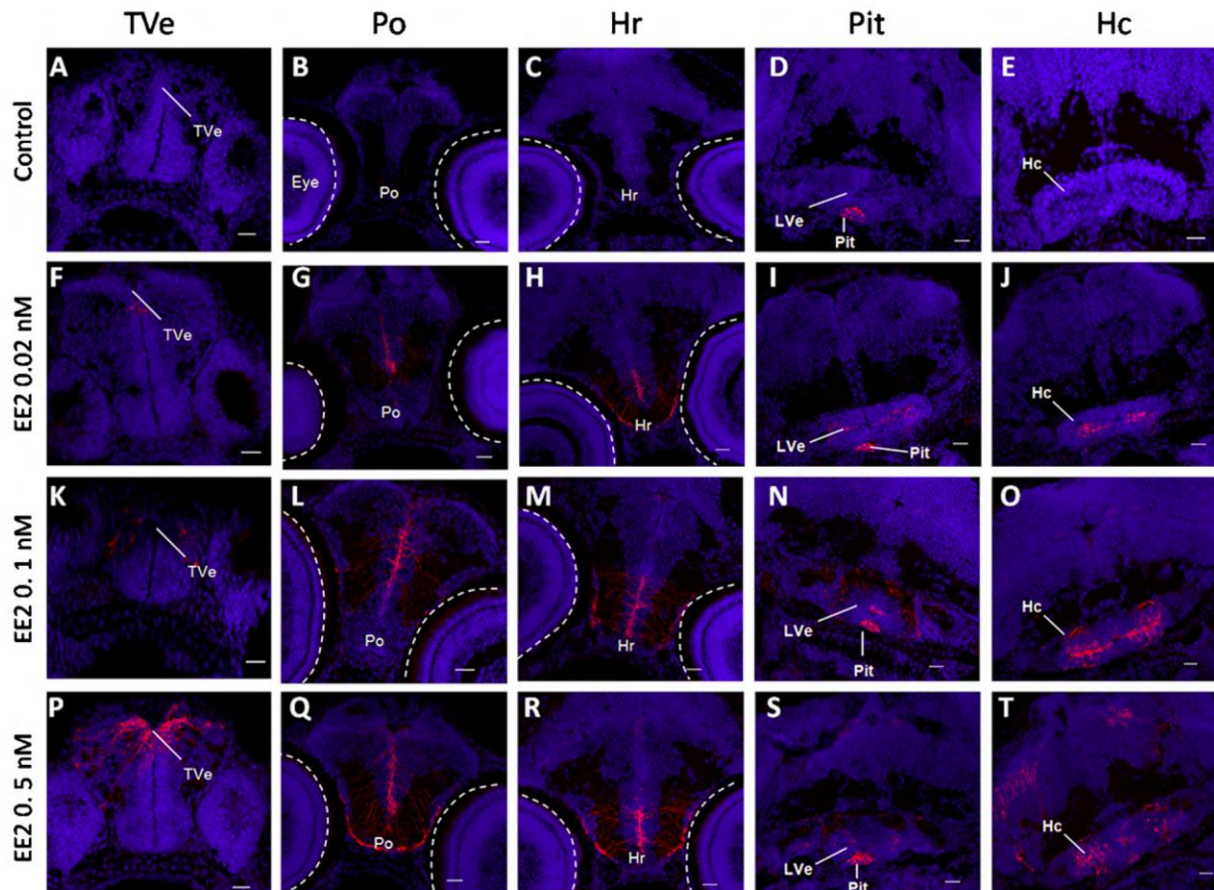
##### 4.1. Forebrain GnRH ontogeny

In this study, we first provide a precise description of the neuroanatomical distribution of the forebrain GnRH system during the zebrafish development in control conditions. The GnRH neuronal migration is consistent with what is known in fish in general regarding migration of these neurons from the olfactory placode region into the forebrain (Kah et al., 2007; Zohar et al., 2010). They are also in agreement with what was reported in zebrafish by means of *in situ* hybridization and promoter-reporter expression (Palevitch et al., 2007). However, in our study no cell bodies were observed at the hypothalamus level at 30 dpf which contrasts with previously reported data in the transgenic GnRH3: EGFP zebrafish line (Palevitch et al., 2007). The reason for this discrepancy remains unclear but may be explained by our experimental conditions and/or by a strain-dependent variability in GnRH ontogeny.

##### 4.2. The forebrain GnRH system is a target of EE2 during early development of zebrafish

The present study documents for the first time in fish that exposure of embryos to 17α-ethinylestradiol resulted in significant alteration of GnRH neuron development. These changes include effects on the number of GnRH-ir neurons, their size, their migration profile and their projections. These changes were concentration-dependent since exposure to 0.02 nM of EE2 did not induce any change compared with the control group while after a 4-day exposure there were 39% and 47% more GnRH-immunoreactive





**Fig. 7.** Photomicrographs of spatial expression of AroB on transversal sections of 5 dpf zebrafish control and treated with 0.02 nM, 0.1 nM and 0.5 nM of EE2 showing a concentration-dependent up-regulation of AroB at the level of telencephalic ventricle (A, F, K, P), the preoptic region (B, G, L, Q), the rostral hypothalamus (C, H, M, R), around the lateral recess (D, I, N, S) and the caudal hypothalamus (E, J, O, T). At the level of the pituitary no differences of AroB immunoreactivity was observed between control (D) and exposed larvae (I, N, S). All sections were photographed at 200 $\times$  magnification. Tve, telencephalic ventricle; Po, preoptic region; Hr, rostral hypothalamus; LVe, lateral ventricular recess of hypothalamus; Pit, pituitary; Hc, caudal hypothalamus. Dotted lines indicate eyes. Blue: Hoechst staining. Scale Bars = 20  $\mu$ m.

neurons in the 0.1 nM and the 0.5 nM EE2 groups, respectively. At 10 dpf, these differences in terms of neuron number persisted and then decreased at 20 dpf, where only larvae exposed to 0.1 nM of EE2 showed a higher number of GnRH-ir neurons compared to the control group.

Previous data showed that neonatal exposure of mouse to high level of 17 $\beta$ -estradiol (10 mg/day for 14 days) caused an increase in the number of GnRH-ir neurons in males (Grober et al., 1998). It has also been shown that testosterone, an aromatizable androgen, was able to affect the number of catfish GnRH neurons in the immature African catfish, *Clarias gariepinus* (Dubois et al., 1998). In the latter study, a non-aromatizable androgen, 4-OH-androstenedione, had no effect, indicating that testosterone impacts GnRH neurons through aromatization. Although these studies did not explore early phases of the GnRH ontogeny, they already pointed out that the number GnRH neuron was affected by estrogens or aromatizable androgens. Importantly, our study indicates that the increase in the number of GnRH-ir neurons following EE2 exposure occurred very early during development and at low concentrations of EE2.

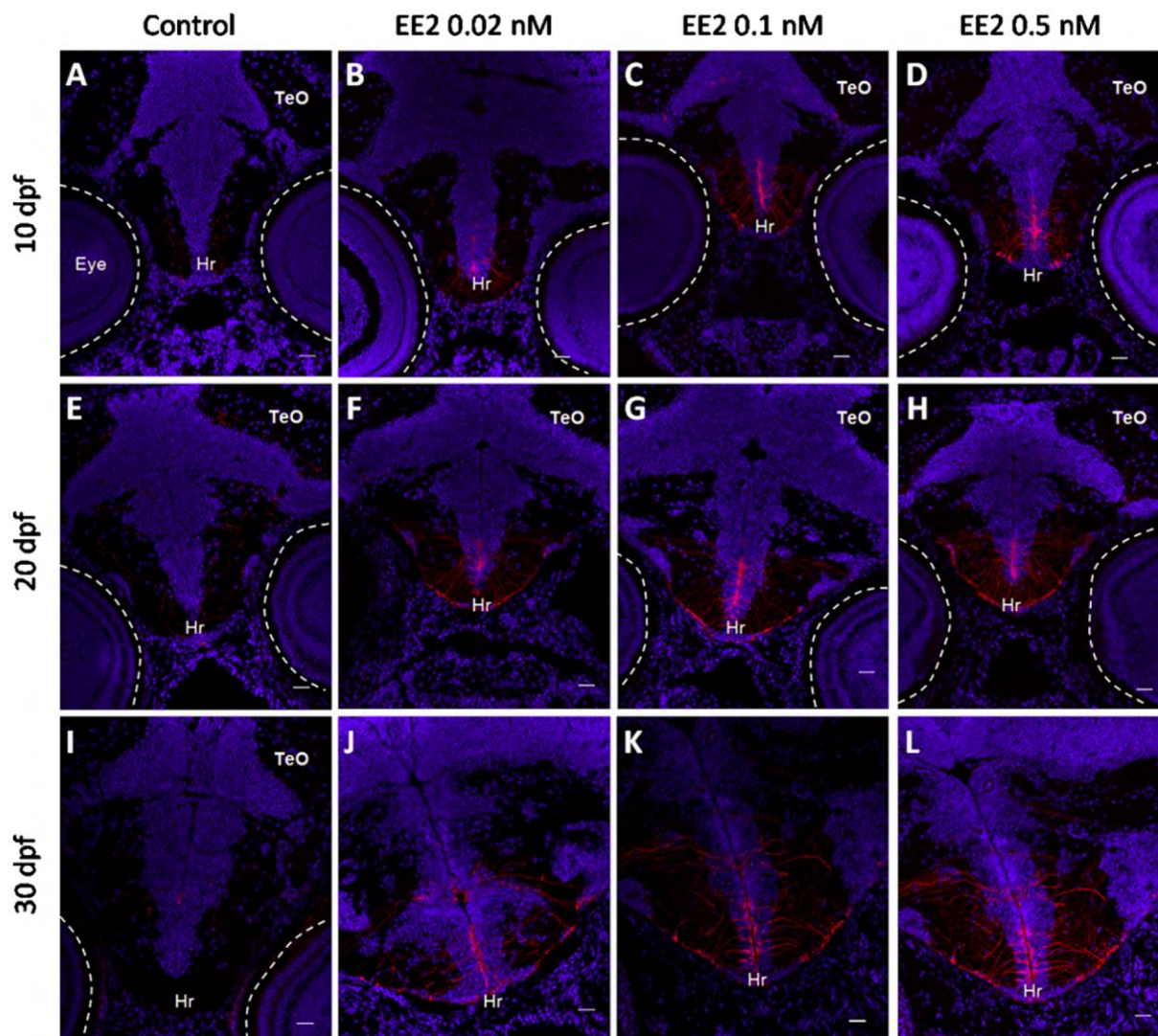
The increase in the number of GnRH-ir neurons could reflect a proliferative effect of EE2 on GnRH neurons during early life stages. In sheep, such a potential effect of estradiol on proliferation of GnRH neurons was suggested *in vitro* following treatments of GnRH culture by E2 antagonist causing a marked decrease in GnRH neuron proliferation (Agca et al., 2008). More specifically, our data suggest an accelerating effect of EE2 on the developmental process of GnRH. Indeed, EE2-exposed larvae (0.1 nM and 0.5 nM) at 5 dpf exhibit a

number of neurons similar to those found in the control group at 20 dpf.

Although the role of estrogens in fish brain is poorly documented, increasing evidence suggests that local production of estrogens through brain aromatase (AroB) could be involved in the regulation of neurogenesis (Dietel et al., 2010; Mouriec et al., 2009; Pellegrini et al., 2005). Indeed, AroB is expressed in radial glial cells that are known to be progenitor cells playing a crucial role in neurogenesis in mammals, birds and fish (Gotz and Barde, 2005; Noctor et al., 2002; Pellegrini et al., 2007). Interestingly, in the present study we showed that EE2 strongly up-regulated AroB expression and we revealed close interactions between AroB-GFP expressing cells and GnRH-ir neurons following EE2 exposure. Taken together, we can hypothesize that the over-expression of AroB leads to a local over-production of estrogen, thereby resulting in a disruption of forebrain GnRH neurogenesis. To assess the proliferative effect of EE2 on GnRH neurons during zebrafish development, further investigations will be carried out using proliferation markers such as the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) or the thymidine analogue bromodeoxyuridine (BrdU).

The morphometric analysis of the size of GnRH-ir perikarya indicated a transient effect of EE2, since a significant reduction of GnRH-ir soma size was only observed at 10 dpf in groups treated with 0.1 nM and 0.5 nM of EE2. This reduction could reflect a variation in the neuronal shape (elongation) resulting in reduced surface of the soma. Alternatively, it could also reflect changes in the immunoreactivity of neurons due to modifications of the cellu-





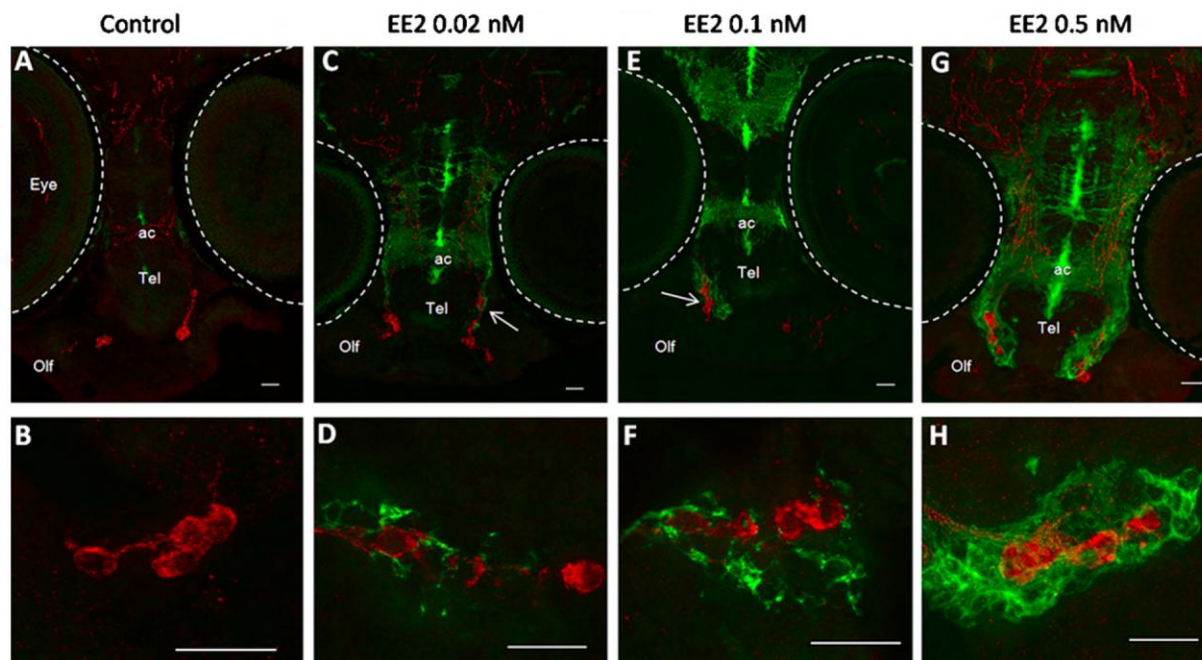
**Fig. 8.** Photomicrographs of temporal expression of AroB-ir cells (red) on transversal sections of zebrafish larvae control (A, E, I) and exposed to 0.02 nM, 0.1 nM and 0.5 nM of EE2 at the level of the rostral hypothalamus (200 $\times$  magnification). Concentration-dependent expression of AroB-ir cells in Hr after EE2 exposure in 10 dpf (B–D), 20 dpf (F–H) and 30 dpf (J–L) larvae (200 $\times$  magnification). TeO, tectum opticum; Hr, rostral hypothalamus. Dotted lines indicate eyes. Blue: Hoechst staining. Scale bars = 20  $\mu$ m.

lar machinery implied in the synthesis or the release of GnRH. This hypothesis was mentioned in previous studies which demonstrated the effects of steroid hormones on GnRH neuron size in male leopard frogs (Tsai and Jones, 2005) and in the cichlid fish, *Haplochromis burtoni* (Soma et al., 1996; White and Fernald, 1993). Moreover, observations of increased GnRH-ir projections could also suggest increased export of preproGnRH in the neurites, since EE2-treated larvae (0.5 nM) clearly exhibited more profuse immunoreactive fibers than control larvae in early life stages (5 dpf and 10 dpf). Such changes have also been reported in immature African catfish (*C. gariepinus*) treated with testosterone (Dubois et al., 1998). These latter results are consistent with our data as the effects of testosterone were likely mediated by aromatization to estradiol given that a non-aromatizable androgens had no effect (Dubois et al., 1998). Similarly, in *Xenopus* ovariectomy decreases GnRH content in terminal nerve fibers while estrogen administration restores GnRH content in these fibers (Wirsig-Wiechmann and Lee, 1999).

Altogether, our results strongly suggest that forebrain GnRH development is disrupted subsequently to EE2 exposure. The mech-

anisms through which estrogenic compounds act on GnRH neurons are far from clear. Up to now, nuclear estrogen receptors (ERs) have not been found in GnRH neurons neither in teleost (Navas et al., 1995) nor in mammals (Herbison et al., 1995; Herbison and Theodosis, 1992; Shivers et al., 1983). Moreover, there is evidence that estrogen signaling is conveyed to GnRH neurons indirectly through ER-expressing neurons, plausibly Kiss neurons as demonstrated in mammals (Kaiser and Kuohung, 2005; Messenger et al., 2005). Two Kiss genes have been found in teleost fish (Felip et al., 2009; Lee et al., 2009) including zebrafish (Kitahashi et al., 2009) and growing evidence suggests implications of these genes in the control of reproductive function (Felip et al., 2009). However, the relationships between Kiss systems and GnRH neurons remain unclear in fish even if the presence of the Kiss receptor GPR54 in GnRH neurons (Parhar et al., 2004) suggests possible interactions. On the other hand, direct effects of estrogens on GnRH neurons are not excluded. GnRH promoter of the Atlantic salmon (*Salmo salar*) was found to contain estrogen response element (ERE)-like motifs suggesting potential direct estrogen regulation of the *GnRH* gene (Klungland et al., 1993). As suggested by Grober et al. (1998), it is





**Fig. 9.** Maximum-intensity projections ( $0.3 \mu\text{M}$  optical sections) of coronal section (anterior = bottom) illustrating relationships between GnRH neurons (red) and GFP expression (green) in 5 dpf zebrafish (representative photomicrographs from 10 larvae per experimental conditions). (A) Control larva showing no interaction between GnRH-ir neurons and the weak GFP signals ( $200\times$  magnification). (B)  $630\times$  magnification of cells shown in (A). (C) Larva exposed to  $0.02 \text{ nM}$  of EE2 showing little interactions between GnRH-ir cell bodies and GFP expression ( $200\times$  magnification). (D)  $630\times$  magnification of cells shown in (C). (E) Larva exposed to  $0.1 \text{ nM}$  of EE2 showing increasing relationships between GnRH-ir neurons and GFP signals ( $200\times$  magnification). (F)  $630\times$  magnification of cells shown in (E). (G) Larva exposed to  $0.5 \text{ nM}$  of EE2 showing GFP expressing structures totally enmeshing GnRH-ir neurons ( $200\times$  magnification). (H)  $630\times$  magnification of cells shown in (G). Olf, olfactory placode; Tel, telencephalon; ac, anterior commissure. Dotted lines indicate eyes. Scale bars =  $20 \mu\text{m}$ .

possible that GnRH neurons transiently expressed ER during the development in mammals. However, such a possibility has never been explored in fish.

In addition to morphometric changes, the present work shows some modifications in the spatial distribution of the forebrain GnRH-ir neurons following EE2 exposure during development. Indeed, forebrain GnRH-ir neurons appeared more widely dispersed in the ventral position as compared to control. In zebrafish, abnormal GnRH3 axonal projections and cell migration have been reported following knockdown of NELF (Palevitch et al., 2009), *cxcr4b-cxcr112a* ligand–receptor pair (Palevitch et al., 2010) and also GnRH3 itself (Abraham et al., 2008), demonstrating their crucial role for the migration of GnRH3 neurons in zebrafish. Given the adverse effect of EE2 exposure on GnRH immunoreactivity highlighted in our study, it is likely that disruption of GnRH itself is involved, at least partly, in alteration of forebrain GnRH neurons migration.

#### 4.3. Early expression of AroB is up-regulated by EE2 in the brain but not in the pituitary of zebrafish

In the present study, we further documented the spatio-temporal expression of AroB within the central nervous system during the early development of control and EE2-exposed zebrafish. Several studies have examined the mRNA expression of the *cyp19a1b* gene using real-time PCR during zebrafish development and revealed an early mRNA expression of this gene during embryogenesis (e.g. Mouriec et al., 2009; Trant et al., 2001). In brain, the first signs of AroB protein expression were detected at 10 dpf in the caudal hypothalamus, this timing of expression being in agreement with previously reported data in the zebrafish using conventional microscopy (Menuet et al., 2005; Tong et al., 2009). In contrast to control, a very strong and very early expression of

AroB was found in radial glial cells of EE2-exposed fish. We and others have previously shown that estrogen can strongly stimulate the *cyp19a1b* expression in zebrafish larvae (Cheshenko et al., 2007; Hinfray et al., 2006; Menuet et al., 2005; Mouriec et al., 2009; Sawyer et al., 2006). It has been demonstrated that the estrogen-dependent regulation of AroB expression involves functional ERs and the binding of liganded-ER on ERE and  $\frac{1}{2}$  ERE located in the promoter region of the *cyp19a1b* gene (Le Page et al., 2006; Menuet et al., 2005). The *cyp19a1b* regulation also requires glial-specific factor(s) that bind to a glial x responsive element (GxRE) acting synergistically with the ERE sequences (Le Page et al., 2008). This mechanism confers to the *cyp19a1b* gene a high sensitivity to estrogens and a cell-specificity in radial glial cells. In our study, the strong and precocious up-regulation of AroB expression was observed in the brain of EE2-treated larvae as early as 5 dpf for EE2 concentration as low as  $0.02 \text{ nM}$ . Although no quantitative analyses were performed, the AroB induction by EE2 was clearly concentration- and time-dependent. Previously, EE2 was shown to strongly induce the expression of the *cyp19a1b* gene in a dose-dependent manner in 14 dpf-old juvenile zebrafish exposed for 3 days (Kazeto et al., 2004). Study in roach (*Rutilus rutilus*) highlighted that prolonged exposure to low concentrations of EE2 significantly up-regulates *cyp19a1b* gene (Lange et al., 2008). More recently, we revealed that short exposure (from 0 dpf to 3 dpf) to a concentration as low as  $4 \text{ pM}$  EE2 ( $1 \text{ ng EE2/l}$ ) was still able to up-regulate AroB expression in zebrafish brain (unpublished data). Therefore, our study confirms and further illustrates the extreme sensitivity of the zebrafish brain aromatase to (xeno)-estrogens by demonstrating that short exposures to low and environmentally relevant concentrations of EE2 are able to strongly induce the expression of AroB in radial glial cells in early life stages. Given the key role of these cells in neurogenesis (Gotz and Barde, 2005; Pellegrini et al., 2007), we can presume that EE2 exposure during development



affects neurogenesis within the brain, notably GnRH neurogenesis.

Another important result of our study relies on the early expression of AroB protein in cells localized in the pituitary. AroB expression in the pituitary was previously described in different teleost fish species including female rainbow trout (Menuet et al., 2003) and juvenile zebrafish (Kallivretaki et al., 2007), but to our knowledge, this is the first report showing that AroB expressing cells are circumscribed to the pituitary in early life stage. Interestingly, AroB expression was also observed in the pituitary of EE2-treated larvae. However, at this level, AroB expression was not altered by EE2 since no difference in terms of immunoreactivity was found as compared to the control group. Previous studies have shown that pituitary aromatase activity was not related with seasonal reproductive cycles (Pasmanik and Callard, 1988) while, in the brain, aromatase activity is subject to seasonal variations (Borg et al., 1987; Gonzalez and Piferrer, 2002; Pasmanik and Callard, 1988). Thus, in the pituitary, AroB expression does not seem to be regulated by (xeno)-estrogens, which contrasts markedly with the strong up-regulation of AroB expression found in radial glial cells. This difference in terms of regulation may rely on the cell-specificity of the estrogen-dependent regulation of the brain AroB which requires specific neuro-glial factors (Le Page et al., 2008). In mammals and birds, it is known that there is a single *cyp19* aromatase gene with multiple promoters driving tissue-specific expression (Conley and Hinshelwood, 2001). Therefore, the existence of a specific zebrafish *cyp19a1b* promoter in pituitary cells cannot be ruled out too.

## 5. Conclusions

In summary, we demonstrate for the first time that ontogeny of forebrain GnRH neurons can be affected by low concentrations of EE2 during the development of a vertebrate model, the zebrafish. We also show the dramatic time- and concentration-dependent effects of EE2 on AroB expression in radial glial cells of the developing brain, reinforcing the fact that the *cyp19a1b* gene is extremely sensitive to estrogens and xenoestrogens. This E2 up-regulation that relies on the presence of functional ER makes the *cyp19a1b* gene a relevant biological marker of EDCs in early life stages of fish. Furthermore, our study documents for the first time the existence of close associations between these GnRH and AroB-positive structures following EE2 exposure, strongly suggesting functional links between GnRH neurons and radial glial cells expressing AroB.

The consequences of such perturbations on the reproductive success remain to be determined. However, it is known that early exposure of fish to EE2 impacts sexual differentiation, delays sexual maturation, disturbs gametogenesis and impairs the breeding success. Given the importance of an appropriate migration of hypothalamic GnRH neurons for normal reproductive function in vertebrates, including human (Bianco and Kaiser, 2009) and fish (Abraham et al., 2010), it is therefore likely that the effect of EE2 on reproduction is in part mediated by disruption of the GnRH system. Further, due to the role played by radial glial cells in the process of neurogenesis and the suspected involvement of estradiol in this process, alteration of brain development following EE2 exposure has to be considered.

Cumulatively, our results provide evidence that low concentrations of EE2 are able to negatively impact the development of key neuroendocrine networks implicated in the regulation of the reproductive function and brain development. These original observations stress out the urgent need to intensify our understanding of the mechanisms underlying effects of EDCs at the central level and their long-term consequences on the reproductive health in vertebrates. Studying the mechanisms underlying estrogenic or xenoestrogenic effects on the process of the develop-

ment of the hypophysiotropic GnRH system and brain development is extremely difficult in viviparous species. Our data suggest that small fish could be very valuable models to address these important issues.

## Acknowledgments

This work was supported by the French Ministry of Ecology and Sustainable Development (grant 189.09 DRC01 and the NEMO project), the French National Research Agency (Project Neuroendocrine Effect of Endocrine Disruptors NEED, CES 2008-011). We thank Benjamin Piccini for the excellent care and maintenance of the INERIS' zebrafish facility.

## References

- Abraham, E., Palevitch, O., Gothilf, Y., Zohar, Y., 2010. Targeted gonadotropin-releasing hormone-3 neuron ablation in zebrafish: effects on neurogenesis, neuronal migration, and reproduction. *Endocrinology* 151, 332–340.
- Abraham, E., Palevitch, O., Ijiri, S., Du, S.J., Gothilf, Y., Zohar, Y., 2008. Early development of forebrain gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) neurones and the role of GnRH as an autocrine migration factor. *J. Neuroendocrinol.* 20, 394–405.
- Agca, E., Batailler, M., Tillet, Y., Chemineau, P., Duittoz, A.H., 2008. Modulation of estrogen receptors during development inhibits neurogenesis of precursors to GnRH-1 neurones: in vitro studies with explants of ovine olfactory placode. *Brain Res.* 1223, 34–41.
- Bianco, S.D., Kaiser, U.B., 2009. The genetic and molecular basis of idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Nat. Rev. Endocrinol.* 5, 569–576.
- Borg, B., Timmers, R.J., Lambert, J.G., 1987. Aromatase activity in the brain of the three-spined stickleback. *Gasterosteus aculeatus*. I. Distribution and effects of season and photoperiod. *Exp. Biol.* 47, 63–68.
- Breton, B., Motin, A., Kah, O., Lemenn, F., Geoffre, S., Precigoux, G., Chambolle, P., 1984. Homologous radioimmunoassay of a hypothalamic factor stimulating salmon pituitary gonadotrophic function (sGnRH). *C.R Acad. Sci. III.* 299, 383–388.
- Brion, F., Tyler, C.R., Palazzi, X., Laillet, B., Porcher, J.M., Garric, J., Flammarion, P., 2004. Impacts of 17beta-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.
- Cargouet, M., Perdiz, D., Mouatassim-Souali, A., Tamisier-Karolak, S., Levi, Y., 2004. Assessment of river contamination by estrogenic compounds in Paris area (France). *Sci. Total Environ.* 324, 55–66.
- Cheshenko, K., Brion, F., Le Page, Y., Hinfray, N., Pakdel, F., Kah, O., Segner, H., Eggen, R.L., 2007. Expression of zebra fish aromatase *cyp19a* and *cyp19b* genes in response to the ligands of estrogen receptor and aryl hydrocarbon receptor. *Toxicol. Sci.* 96, 255–267.
- Chiang, E.F., Yan, Y.L., Guiguen, Y., Postlethwait, J., Chung, B., 2001. Two *Cyp19* (*P450* aromatase) genes on duplicated zebrafish chromosomes are expressed in ovary or brain. *Mol. Biol. Evol.* 18, 542–550.
- Colborn, T., vom Saal, F.S., Soto, A.M., 1993. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ. Health Perspect.* 101, 378–384.
- Conley, A., Hinshelwood, M., 2001. Mammalian aromatases. *Reproduction* 121, 685–695.
- Desbrow, C., Routledge, E.J., Brighty, G.C., Sumpter, J.P., Waldock, M., 1998. Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 1. Chemical Fractionation and In Vitro Biological Screening. *Environ. Sci. Technol.* 32, 1549–1558.
- Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J.P., Giudice, L.C., Hauser, R., Prins, G.S., Soto, A.M., Zoeller, R.T., Gore, A.C., 2009. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr. Rev.* 30, 293–342.
- Dickerson, S.M., Gore, A.C., 2007. Estrogenic environmental endocrine-disrupting chemical effects on reproductive neuroendocrine function and dysfunction across the life cycle. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 8, 143–159.
- Diotel, N., Page, Y.L., Mouriec, K., Tong, S.-K., Pellegrini, E., Vaillant, C., Anglade, I., Brion, F., Pakdel, F., Chung, B.-c., Kah, O., 2010. Aromatase in the brain of teleost fish: Expression, regulation and putative functions. *Front Neuroendocrinol.* 31, 172–192.
- Dubois, E.A., Florijn, M.A., Zandbergen, M.A., Peute, J., Goos, H.J., 1998. Testosterone accelerates the development of the catfish GnRH system in the brain of immature African catfish (*Clarias gariepinus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 112, 383–393.
- Felip, A., Zanuy, S., Pineda, R., Pinilla, L., Carrillo, M., Tena-Sempere, M., Gomez, A., 2009. Evidence for two distinct *Kiss* genes in non-placental vertebrates that encode kisspeptins with different gonadotropin-releasing activities in fish and mammals. *Mol. Cell Endocrinol.* 312, 61–71.
- Gonzalez, A., Piferrer, F., 2002. Characterization of aromatase activity in the sea bass: effects of temperature and different catalytic properties of brain and ovarian homogenates and microsomes. *J. Exp. Zool.* 293, 500–510.
- Gore, A.C., 2008. Developmental programming and endocrine disruptor effects on reproductive neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol.* 29, 358–374.
- Gothilf, Y., Elizur, A., Chow, M., Chen, T.T., Zohar, Y., 1995. Molecular cloning and characterization of a novel gonadotropin-releasing hormone from the gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 4, 27–35.

- Gotz, M., Barde, Y.A., 2005. Radial glial cells defined and major intermediates between embryonic stem cells and CNS neurons. *Neuron* 46, 369–372.
- Grober, M.S., Winterstein, G.M., Ghazanfar, A.A., Eroschenko, V.P., 1998. The effects of estradiol on gonadotropin-releasing hormone neurons in the developing mouse brain. *Gen. Comp. Endocrinol.* 112, 356–363.
- Herbison, A.E., 2009. Rapid actions of oestrogen on gonadotropin-releasing hormone neurons; from fantasy to physiology? *J. Physiol.* 587, 5025–5030.
- Herbison, A.E., Horvath, T.L., Naftolin, F., Leranthe, C., 1995. Distribution of estrogen receptor-immunoreactive cells in monkey hypothalamus: relationship to neurons containing luteinizing hormone-releasing hormone and tyrosine hydroxylase. *Neuroendocrinology* 61, 1–10.
- Herbison, A.E., Theodosis, D.T., 1992. Localization of oestrogen receptors in preoptic neurons containing neurotensin but not tyrosine hydroxylase, cholecystokinin or luteinizing hormone-releasing hormone in the male and female rat. *Neuroscience* 50, 283–298.
- Hinfray, N., Palluel, O., Turies, C., Cousin, C., Porcher, J.M., Brion, F., 2006. Brain and gonadal aromatase as potential targets of endocrine disrupting chemicals in a model species, the zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Toxicol.* 21, 332–337.
- Hotchkiss, A.K., Rider, C.V., Blystone, C.R., Wilson, V.S., Hartig, P.C., Ankley, G.T., Foster, P.M., Gray, C.L., Gray, L.E., 2008. Fifteen years after “Wingspread”—environmental endocrine disruptors and human and wildlife health: where we are today and where we need to go. *Toxicol. Sci.* 105, 235–259.
- Kah, O., Breton, B., Dulka, J.G., Nunez-Rodriguez, J., Peter, R.E., Corrigan, A., Rivier, J.E., Vale, W.W., 1986. A reinvestigation of the Gn-RH (gonadotropin-releasing hormone) systems in the goldfish brain using antibodies to salmon Gn-RH. *Cell Tissue Res.* 244, 327–337.
- Kah, O., Lethimonier, C., Somoza, G., Guilgur, L.G., Vaillant, C., Lareyre, J.J., 2007. GnRH and GnRH receptors in metazoa: a historical, comparative, and evolutive perspective. *Gen. Comp. Endocrinol.* 153, 346–364.
- Kaiser, U.B., Kuohung, W., 2005. Kiss-1 and GPR54 as new players in gonadotropin regulation and puberty. *Endocrine* 26, 277–284.
- Kallivretaki, E., Eggen, R.L., Neuhauss, S.C., Kah, O., Segner, H., 2007. The zebrafish, brain-specific, aromatase *cyp19a2* is neither expressed nor distributed in a sexually dimorphic manner during sexual differentiation. *Dev. Dyn.* 236, 3155–3166.
- Kavlock, R.J., Daston, G.P., DeRosa, C., Fenner-Crisp, P., Gray, L.E., Kaattari, S., Lucier, G., Luster, M., Mac, M.J., Maczka, C., Miller, R., Moore, J., Rolland, R., Scott, G., Sheehan, D.M., Sinks, T., Tilson, H.A., 1996. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environ. Health Perspect.* 104 (Suppl 4), 715–740.
- Kazeto, Y., Place, A.R., Trant, J.M., 2004. Effects of endocrine disrupting chemicals on the expression of CYP19 genes in zebrafish (*Danio rerio*) juveniles. *Aquat. Toxicol.* 69, 25–34.
- Kitahashi, T., Ogawa, S., Parhar, I.S., 2009. Cloning and expression of kiss2 in the zebrafish and medaka. *Endocrinology* 150, 821–831.
- Klungland, H., Andersen, Ø., Kisen, G., Aleström, P., Tora, L., 1993. Estrogen receptor binds to the salmon GnRH gene in a region with long palindromic sequences. *Mol. Cell Endocrinol.* 95, 147–154.
- Lange, A., Katsu, Y., Ichikawa, R., Paull, G.C., Chidgey, L.L., Coe, T.S., Iguchi, T., Tyler, C.R., 2008. Altered sexual development in roach (*Rutilus rutilus*) exposed to environmental concentrations of the pharmaceutical 17 $\alpha$ -ethinylestradiol and associated expression dynamics of aromatases and estrogen receptors. *Toxicol. Sci.* 106, 113–123.
- Le Page, Y., Menuet, A., Kah, O., Pakdel, F., 2008. Characterization of a cis-acting element involved in cell-specific expression of the zebrafish brain aromatase gene. *Mol. Reprod. Dev.* 75, 1549–1557.
- Le Page, Y., Scholze, M., Kah, O., Pakdel, F., 2006. Assessment of xenoestrogens using three distinct estrogen receptors and the zebrafish brain aromatase gene in a highly responsive glial cell system. *Environ. Health Perspect.* 114, 752–758.
- Lee, Y.R., Tsunekawa, K., Moon, M.J., Um, H.N., Hwang, J.L., Osugi, T., Otaki, N., Sunakawa, Y., Kim, K., Vaudry, H., Kwon, H.B., Seong, J.Y., Tsutsui, K., 2009. Molecular evolution of multiple forms of kisspeptins and GPR54 receptors in vertebrates. *Endocrinology* 150, 2837–2846.
- Lethimonier, C., Madigou, T., Munoz-Cueto, J.A., Lareyre, J.J., Kah, O., 2004. Evolutionary aspects of GnRHs. GnRH neuronal systems and GnRH receptors in teleost fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 135, 1–16.
- Menuet, A., Anglade, I., Le Guevel, R., Pellegrini, E., Pakdel, F., Kah, O., 2003. Distribution of aromatase mRNA and protein in the brain and pituitary of female rainbow trout: Comparison with estrogen receptor alpha. *J. Comp. Neurol.* 462, 180–193.
- Menuet, A., Pellegrini, E., Brion, F., Gueguen, M.M., Anglade, I., Pakdel, F., Kah, O., 2005. Expression and estrogen-dependent regulation of the zebrafish brain aromatase gene. *J. Comp. Neurol.* 485, 304–320.
- Messenger, S., Chatzidakis, E.E., Ma, D., Hendrick, A.G., Zahn, D., Dixon, J., Thresher, R.R., Malinge, I., Lomet, D., Carlton, M.B., Colledge, W.H., Caraty, A., Aparicio, S.A., 2005. Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 1761–1766.
- Mills, L.J., Chichester, C., 2005. Review of evidence: are endocrine-disrupting chemicals in the aquatic environment impacting fish populations? *Sci. Total Environ.* 343, 1–34.
- Mouriec, K., Lareyre, J.J., Tong, S.K., Le Page, Y., Vaillant, C., Pellegrini, E., Pakdel, F., Chung, B.C., Kah, O., Anglade, I., 2009. Early regulation of brain aromatase (*cyp19a1b*) by estrogen receptors during zebrafish development. *Dev. Dyn.* 238, 2641–2651.
- Mueller, T., Wullimann, M.F. (Eds.), 2005. Atlas of Early Zebrafish Brain Development: A Tool for Molecular Neurogenetics. Elsevier Publishing Company, Amsterdam.
- Nash, J.P., Kime, D.E., Van der Ven, L.T., Wester, P.W., Brion, F., Maack, G., Stahlschmidt-Allner, P., Tyler, C.R., 2004. Long-term exposure to environmental concentrations of the pharmaceutical ethinylestradiol causes reproductive failure in fish. *Environ. Health Perspect.* 112, 1725–1733.
- Navas, J.M., Anglade, I., Bailhache, T., Pakdel, F., Breton, B., Jegou, P., Kah, O., 1995. Do gonadotropin-releasing hormone neurons express estrogen receptors in the rainbow trout? A double immunohistochemical study. *J. Comp. Neurol.* 363, 461–474.
- Noctor, S.C., Flint, A.C., Weissman, T.A., Wong, W.S., Clinton, B.K., Kriegstein, A.R., 2002. Dividing precursor cells of the embryonic cortical ventricular zone have morphological and molecular characteristics of radial glia. *J. Neurosci.* 22, 3161–3173.
- Palevitch, O., Abraham, E., Borodovsky, N., Levkowitz, G., Zohar, Y., Gothilf, Y., 2009. Nasal embryonic LHRH factor plays a role in the developmental migration and projection of gonadotropin-releasing hormone 3 neurons in zebrafish. *Dev. Dyn.* 238, 66–75.
- Palevitch, O., Abraham, E., Borodovsky, N., Levkowitz, G., Zohar, Y., Gothilf, Y., 2010. Cxcl12a-Cxcr4b signaling is important for proper development of the forebrain GnRH system in zebrafish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165, 262–268.
- Palevitch, O., Kight, K., Abraham, E., Wray, S., Zohar, Y., Gothilf, Y., 2007. Ontogeny of the GnRH systems in zebrafish brain: in situ hybridization and promoter-reporter expression analyses in intact animals. *Cell Tissue Res.* 327, 313–322.
- Parhar, I.S., Ogawa, S., Sakuma, Y., 2004. Laser-captured single digoxigenin-labeled neurons of gonadotropin-releasing hormone types reveal a novel G protein-coupled receptor (Gpr54) during maturation in cichlid fish. *Endocrinology* 145, 3613–3618.
- Pasmanik, M., Callard, G.V., 1985. Aromatase and 5 alpha-reductase in the teleost brain, spinal cord, and pituitary gland. *Gen. Comp. Endocrinol.* 60, 244–251.
- Pasmanik, M., Callard, G.V., 1988. Changes in brain aromatase and 5 alpha-reductase activities correlate significantly with seasonal reproductive cycles in goldfish (*Carassius auratus*). *Endocrinology* 122, 1349–1356.
- Pellegrini, E., Menuet, A., Lethimonier, C., Adrio, F., Gueguen, M.M., Tascon, C., Anglade, I., Pakdel, F., Kah, O., 2005. Relationships between aromatase and estrogen receptors in the brain of teleost fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 142, 60–66.
- Pellegrini, E., Mouriec, K., Anglade, I., Menuet, A., Le Page, Y., Gueguen, M.M., Marmignou, M.H., Brion, F., Pakdel, F., Kah, O., 2007. Identification of aromatase-positive radial glial cells as progenitor cells in the ventricular layer of the forebrain in zebrafish. *J. Comp. Neurol.* 501, 150–167.
- Powell, J.F., Krueckl, S.L., Collins, P.M., Sherwood, N.M., 1996. Molecular forms of GnRH in three model fishes: rockfish, medaka and zebrafish. *J. Endocrinol.* 150, 17–23.
- Powell, J.F., Zohar, Y., Elizur, A., Park, M., Fischer, W.H., Craig, A.G., Rivier, J.E., Lovejoy, D.A., Sherwood, N.M., 1994. Three forms of gonadotropin-releasing hormone characterized from brains of one species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 12081–12085.
- Sawyer, S.J., Gerstner, K.A., Callard, G.V., 2006. Real-time PCR analysis of cytochrome P450 aromatase expression in zebrafish: gene specific tissue distribution, sex differences, developmental programming, and estrogen regulation. *Gen. Comp. Endocrinol.* 147, 108–117.
- Schäfers, C., Teigeler, M., Wenzel, A., Maack, G., Fenske, M., Segner, H., 2007. Concentration- and Time-dependent Effects of the Synthetic Estrogen, 17 $\alpha$ -ethinylestradiol, on Reproductive Capabilities of the Zebrafish, *Danio rerio*. *J. Toxicol. Environ. Health A* 70, 768–779.
- Servili, A., Lethimonier, C., Lareyre, J.-J., López-Olmeda, J.F., Sánchez-Vázquez, F.J., Kah, O., Muñoz-Cueto, J.A., 2010. The highly conserved GnRH-2 form acts as a melatonin-releasing factor in the pineal of a teleost fish, the European sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Endocrinology* 151, 2265–2275.
- Shivers, B.D., Harlan, R.E., Morrell, J.L., Pfaff, D.W., 1983. Absence of oestradiol concentration in cell nuclei of LHRH-immunoreactive neurones. *Nature* 304, 345–347.
- Soma, K.K., Francis, R.C., Wingfield, J.C., Fernald, R.D., 1996. Androgen regulation of hypothalamic neurons containing gonadotropin-releasing hormone in a cichlid fish: integration with social cues. *Horm. Behav.* 30, 216–226.
- Steven, C., Lehnen, N., Kight, K., Ijiri, S., Klenke, U., Harris, W.A., Zohar, Y., 2003. Molecular characterization of the GnRH system in zebrafish (*Danio rerio*): cloning of chicken GnRH-II, adult brain expression patterns and pituitary content of salmon GnRH and chicken GnRH-II. *Gen. Comp. Endocrinol.* 133, 27–37.
- Tchoudakova, A., Kishida, M., Wood, E., Callard, G.V., 2001. Promoter characteristics of two *cyp19* genes differentially expressed in the brain and ovary of teleost fish. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 78, 427–439.
- Ternes, T.A., Stumpf, M., Mueller, J., Haberer, K., Wilken, R.D., Servos, M., 1999. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants—I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *Sci. Total Environ.* 225, 81–90.
- Tong, S.K., Mouriec, K., Kuo, M.W., Pellegrini, E., Gueguen, M.M., Brion, F., Kah, O., Chung, B.C., 2009. A *cyp19a1b-gfp* (aromatase B) transgenic zebrafish line that expresses GFP in radial glial cells. *Genesis* 47, 67–73.
- Trant, J.M., Gavasso, S., Ackers, J., Chung, B.C., Place, A.R., 2001. Developmental expression of cytochrome P450 aromatase genes (*CYP19a* and *CYP19b*) in zebrafish fry (*Danio rerio*). *J. Exp. Zool.* 290, 475–483.
- Tsai, P.S., Jones, J.T., 2005. Steroid-induced changes in the morphology of GnRH neurons in the male leopard frog, *Rana pipiens*: correlation with plasma gonadotropin and gonadal size. *Gen. Comp. Endocrinol.* 141, 152–160.
- Volkoff, H., Peter, R.E., 1999. Actions of two forms of gonadotropin-releasing hormone and a GnRH antagonist on spawning behavior of the goldfish *Carassius auratus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 116, 347–355.
- Vos, J.G., Dybing, E., Greim, H.A., Ladefoged, O., Lambre, C., Tarazona, J.V., Brandt, I., Vethaak, A.D., 2000. Health effects of endocrine-disrupting chemicals on

- wildlife, with special reference to the European situation. *Crit. Rev. Toxicol.* 30, 71–133.
- White, S.A., Fernald, R.D., 1993. Gonadotropin-releasing hormone-containing neurons change size with reproductive state in female *Haplochromis burtoni*. *J. Neurosci.* 13, 434–441.
- Wirsig-Wiechmann, C.R., Lee, C.E., 1999. Estrogen regulates gonadotropin-releasing hormone in the nervus terminalis of *Xenopus laevis*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 115, 301–308.
- Zohar, Y., Munoz-Cueto, J.A., Elizur, A., Kah, O., 2010. Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165, 438–455.

## **Chapitre III**

*La perturbation du système à GnRH  
implique des récepteurs ERs*

### *Contexte*

Dans le chapitre précédent, nous avons montré pour la première fois que l'ontogenèse du système à GnRH du poisson zèbre était affectée par une exposition précoce à des concentrations faibles d'EE2. En outre, nous avons montré que l'EE2 induisait l'expression de l'aromatase B illustrant l'extrême sensibilité du gène *cyp19a1b* aux œstrogènes.

### *Objectifs et démarche expérimentale*

Pour aller plus loin, nous avons cherché à répondre à deux questions :

- La perturbation du développement du système à GnRH se limite-t-elle à l'EE2 ou peut-elle être induite par des xénobiotiques de plus faible affinité pour les récepteurs des œstrogènes ?
- Les récepteurs des œstrogènes sont-ils impliqués dans les effets induits par les xéno-œstrogènes sur l'ontogenèse du système à GnRH ?

Pour y répondre, nous avons choisi d'étudier les effets d'une exposition embryonnaire à l'EE2 et au nonylphénol (NP), seul ou associé à l'ICI 182-780 un antagoniste pur des ERs, sur le nombre de neurones GnRH. Parallèlement, l'expression de l'aromatase B a été suivie par immunohistochimie.

### *Résultats principaux*

Ces travaux sont présentés ci-après dans un manuscrit rédigé en anglais qui a été soumis au journal *Reproductive Toxicology*.

**17 $\alpha$ -Ethinylestradiol and Nonylphenol affect the development of forebrain GnRH neurons through an estrogen receptors-dependent pathway**

*Mélanie Vosges, Olivier Kah, Nathalie Hinfray, Edith Chadili, Yves Combarnous, Jean-Marc Porcher and François Brion*

Nous montrons tout d'abord que l'expression de la protéine aromatase B est induite dans les cellules gliales radiaires par l'EE2 et le NP de manière concentration-dépendante. Les inductions de l'aromatase B sont inhibées dans le cas de co-expositions à l'ICI confirmant que l'expression de l'aromatase B est ER-dépendante. D'autre part, ces données indiquent que

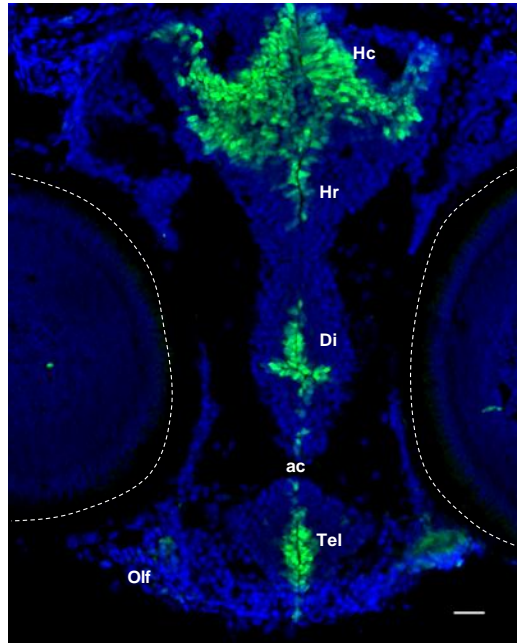
dans nos conditions expérimentales, les traitements aux xéno-œstrogènes et à l'antagoniste des ERs sont efficaces pour perturber la signalisation œstrogéniques dans le cerveau des poissons.

Chez ces mêmes individus, nous confirmons que l'exposition entre 0 et 7 jpf à l'EE2 0,5 nM induit une augmentation du nombre de neurones à GnRH-ir dans le cerveau antérieur et montrons que le NP induit de manière concentrations-dépendante des effets similaires à ceux de l'EE2. Une seconde expérimentation, nous a permis d'une part de confirmer les effets induits par l'EE2 et le NP sur le nombre de neurones à GnRH et d'autre part de mettre en évidence l'implication de récepteurs des œstrogènes fonctionnels dans les effets médiés par ces composés, puisque la co-exposition avec l'ICI bloque totalement l'augmentation du nombre de neurones GnRH.

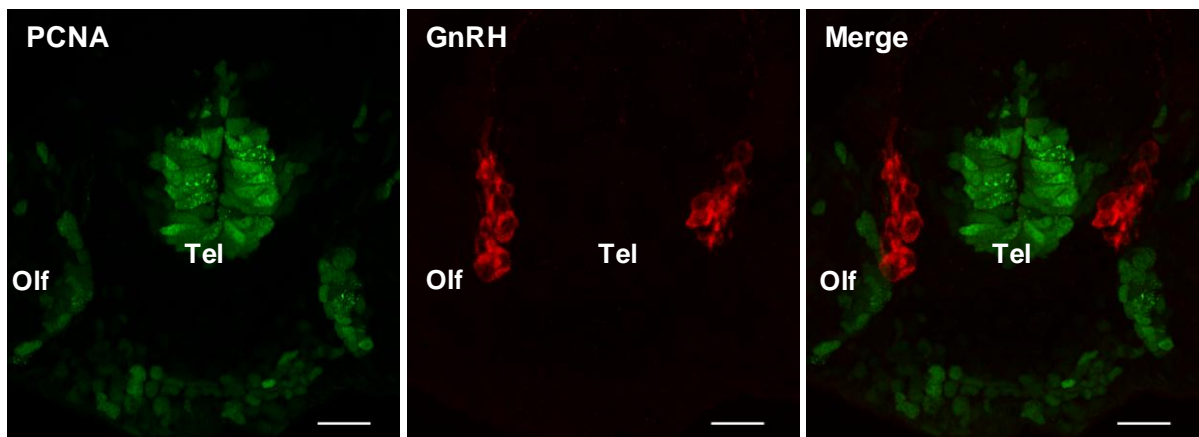
### *Conclusions*

L'ensemble de ces résultats montre que l'exposition précoce de poisson zèbre à des composés de natures et de structures différentes présentant une forte ou une faible affinité pour les récepteurs des œstrogènes, perturbent, via les ERs, l'ontogenèse et l'expression de circuits neuroendocrines clés impliqués dans le développement et la fonction de reproduction des poissons. Etant donné le nombre important de substances œstrogènes mimétiques présentes dans l'environnement aquatique, ces résultats soulèvent la question de leurs effets potentiels, éventuellement additifs voire synergiques, sur ces circuits neuroendocrines. Il sera important à l'avenir notamment dans une perspective d'évaluation du danger et des risques écotoxicologiques des perturbateurs endocriniens de prendre en compte ces effets centraux.





**Figure 14 : Immunodétection du PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) dans le cerveau d'une larve de poisson zèbre contrôle de 5 jpf.** Coupe coronale (x200). Olf, région olfactive; Tel, région télencéphalique; ac, commissure antérieure; Di, région diencéphalique; Hr, hypothalamus rostral; Hc, hypothalamus caudal. Les lignes pointillées indiquent les yeux. Bleu: immunomarquage Hoechst. Echelle = 20  $\mu\text{m}$ .



**Figure 15 : Immunodétection du PCNA (vert) et de la GnRH (rouge) dans le cerveau d'une larve de poisson zèbre contrôle de 5 jpf.** Projection d'intensité maximale (400x ; section optiques = 0.35 $\mu\text{m}$ ). Olf, région olfactive; Tel, région télencéphalique. Echelle = 20  $\mu\text{m}$ .



### *Données expérimentales supplémentaires*

Les données acquises posent aussi la question des mécanismes qui sous-tendent l'augmentation du nombre de neurones à GnRH. Etant donné le rôle suspecté des œstrogènes dans la neurogenèse, nous avons entrepris des travaux complémentaires afin d'étudier la prolifération dans le cerveau antérieur des larves de poissons zèbres témoins et exposées de 0 à 5 jpf à l'EE2 (0.5nM) ou au NP (0.5µM). Pour cela, nous avons réalisé des marquages immunohistochimiques en utilisant le marqueur de prolifération cellulaire PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen).

Dans l'ensemble des groupes, de nombreuses cellules PCNA-ir ont été mises en évidence dans les régions périventriculaires soulignant l'existence d'une activité proliférative dans le cerveau post-embryonnaire du poisson zèbre. Cependant aucune différence manifeste de distribution n'a été mise en évidence entre les groupes expérimentaux. La **figure 14** représente l'immunomarquage au PCNA dans le cerveau d'une larve contrôle. Des cellules PCNA-ir ont été détectées au niveau de la région télencéphalique (sous-pallium), de la région diencephalique (région préoptique) mais également dans la région mésencéphalique et plus caudalement dans plusieurs régions hypothalamiques. De manière intéressante, des cellules PCNA-ir ont également été mise en évidence dans la région olfactive indiquant une activité de prolifération cellulaire dans la région d'origine des neurones à GnRH.

Nous avons ensuite réalisé des doubles marquages immunohistochimiques GnRH et PCNA, afin de détecter l'éventuelle prolifération des cellules GnRH-ir. Cependant, bien que les corps cellulaires GnRH-ir soient très souvent observés à proximité de cellules en prolifération dans la région olfactive (**Figure 15**), aucune cellule GnRH-ir n'a été co-marqué avec le PCNA, quelque soit le groupe considéré. Ces données suggèrent que l'ensemble des cellules GnRH-immunoréactives sont des cellules post-mitotiques. Il est d'ailleurs probable que, si prolifération il y a, les précurseurs des neurones à GnRH ne soient pas identifiables par notre approche expérimentale. Ainsi, il est impossible de conclure quant à l'effet prolifératif des xéno-œstrogènes sur les neurones à GnRH. D'autres expérimentations sont en cours afin de tester cette hypothèse en utilisant le BrdU (Bromo-déoxy-uridine) qui permet de marquer les cellules en prolifération puis d'en étudier le devenir.

# **17 $\alpha$ -Ethinylestradiol and Nonylphenol affect the development of forebrain GnRH neurons through an estrogen receptors-dependent pathway**

**Mélanie Vosges<sup>1</sup>, Olivier Kah<sup>2</sup>, Nathalie Hinfray<sup>1</sup>, Edith Chadili<sup>1</sup>, Yann Le Page<sup>2</sup>, Yves Combarrous<sup>3</sup>, Jean-Marc Porcher<sup>1</sup> and François Brion<sup>1,\*</sup>**

<sup>1</sup> *Unité d'évaluation des risques écotoxicologiques, Direction des Risques Chroniques, Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS), BP 2. F-60550 Verneuil-en-Halatte, France.*

<sup>2</sup> *Neurogenesis and Oestrogens, Université de Rennes 1, UMR CNRS 6026, IFR140, Campus de Beaulieu, 35042 Rennes cedex, France.*

<sup>3</sup> *INRA, CNRS, Université François Rabelais de Tours, Physiologie de la Reproduction et des Comportements Nouzilly, France.*

\* Corresponding author:

François Brion:

Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS),  
Direction des Risques Chroniques, Unité d'évaluation des risques écotoxicologiques,  
BP 2, F-60550 Verneuil-en-Halatte, France.

Tel.: +(33) 3 44 55 65 12; Fax: +(33) 3 44 55 67 67.

E-mail: francois.brion@ineris.fr

**Keywords:** Gonadotropin-releasing-hormone (GnRH), aromatase B (*cyp19a1b*), zebrafish (*Danio rerio*), 17 $\alpha$ -ethinylestradiol (EE2), nonylphenol (NP), endocrine disruption.

## Abstract

To date, most studies on reproductive effects of endocrine disrupting chemicals (EDCs) have focused primarily on the gonads and peripheral organs. However, there is growing evidence that neuroendocrine circuits controlling development and reproduction are also targeted by EDCs. We have previously demonstrated that early exposure of zebrafish (*Danio rerio*) to low concentrations of the synthetic EDC 17 $\alpha$ -ethinylestradiol (EE2) disrupt the development of forebrain GnRH neurons, notably by increasing the number of GnRH-immunoreactive (ir) neurons. The objectives of the present study were to determine whether the weak estrogenic compound, nonylphenol (NP), could elicit effects similar to EE2 and to what extent the estrogen receptors are involved in mediating these effects. Using immunohistochemistry, we investigated the effect of early exposure of zebrafish to EE2 (0.5 nM) and to graded concentrations of NP (0.125, 0.25, 0.5  $\mu$ M) in the development of forebrain GnRH system. We confirm that EE2 exposure induces an increase in the number of GnRH-ir neurons and we demonstrate that NP is able to produce similar effects in a concentration-dependent manner. The effects of both NP and EE2 were shown to be blocked by the estrogen receptors (ERs) antagonist ICI 182-780, demonstrating the involvement of functional ERs in the EE2 and NP-mediated increase in the number of GnRH-ir neurons. In parallel, inducing effects of EE2 and NP were shown on the expression of the ER-regulated brain cytochrome P450 aromatase B (AroB) protein.

Together, these data demonstrate that both strong and weak estrogenic compounds acting through ERs, disrupt the ontogeny of the GnRH neuroendocrine network that is essential for the development and regulation of reproduction. Our results highlight the need to consider neuroendocrine networks as critical and sensitive endpoints in the field of endocrine disruption.

# 1. Introduction

Endocrine disrupting chemicals (EDCs) are known to interfere with the endocrine system leading to adverse effects on the development and the reproductive health of organisms (Colborn et al. 1993; Kavlock et al. 1996; Vos et al. 2000). To date, most of studies dedicated to the actions of EDCs on the reproductive axis were focused on their effects on the gonads and peripheral tissues (for review see, Hotchkiss et al. 2008). However, there is emerging evidence that neuroendocrine circuits controlling development and reproduction could be targeted by EDCs (Bourguignon et al. 2010; Diamanti-Kandarakis et al. 2009; Dickerson and Gore 2007). Among these neuroendocrine networks, the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) system appeared as a critical target. Indeed, GnRH is the key factor controlling the activity of the reproductive axis in vertebrates. The development and the activity of GnRH neurons are finely tuned by a series of factors, notably sex steroids, making these neurons prime targets for EDCs.

We have recently shown that the ontogeny of forebrain GnRH neurons is affected by the synthetic estrogen 17 $\alpha$ -ethinylestradiol (EE2) during zebrafish early life stages (Vosges et al. 2010). Notably, we demonstrated an increase in the number of GnRH-ir neurons and GnRH fibers immunoreactivity that occurred in early life stage and at low concentrations of EE2. We also showed a dramatic concentration-dependent effect of EE2 on the ER-regulated brain aromatase (AroB) protein expression in radial glial cells of developing zebrafish brain, illustrating the extreme sensitivity of the AroB protein to exogenous estrogen.

Based on these results, we sought to determine whether disruption of GnRH ontogeny was restricted to the synthetic estrogen EE2 or could be induced by xenobiotics with much weaker estrogenic activity. The underlying assumption relies on the possible involvement of estrogen receptors in mediating estrogen-induced effects on GnRH system. For that purpose,

we first analyzed, by immunohistochemistry, the effect of the alkylphenolic compound, nonylphenol (NP), in comparison with EE2, on the number of forebrain GnRH neurons during zebrafish early life stages. NP is a breakdown product of alkylphenol polyethoxylates (APEs), an important class of non-ionic surfactants that are widely used in detergent formulations and plastic products for industrial and domestic use (Giger et al. 1984). NP is a widespread contaminant of aquatic environments (David et al. 2009; Soares et al. 2008) and is considered as a model endocrine disrupting compound, known to act as an agonist on estrogen receptors, thereby modifying the expression of estrogen-dependent genes *in vitro* and *in vivo* in various biological models, including fish (Goksoyr 2006; Soares et al. 2008).

In order to determine the involvement of the estrogen receptor (ER) pathway in the disruption of GnRH neurons development induced by xenoestrogens, the pure ER antagonist ICI 182-780 was used. To ensure the effectiveness of our (co)-exposures experiments, expression of the ER-regulated brain aromatase AroB protein was analyzed in parallel by means of immunohistochemistry in the entire brain of fish.

## 2. Materials and methods

### 2.1 *Animals and egg production*

All animal protocols in this study were approved by the ethical committee of the National Institute of Industrial Environment and Risks. Sexually mature male and female zebrafish (*Danio rerio*, AB strain) were used as breeding stocks. The fish were raised in a recirculated water system at 27°C under a controlled photoperiod (14h light/ 10h dark cycle). They were fed twice daily with TetraMin fish flake and live brine shrimp (*Artemia* spp.; Ocean Nutrition). For breeding, a spawning tray was placed in each aquarium (sex ratio: 1 female: 2 males) and spawning of fish was stimulated by light. The following morning, eggs were collected, cleaned and randomly distributed into experimental groups.

### 2.2 *Exposure to chemicals*

#### 2.2.1 *Experiment 1: Zebrafish exposure to xenoestrogens from 0 to 7dpf*

Zebrafish eggs of 0 dpf were exposed to 0.5 nM of 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol (EE2, Sigma-Aldrich, France), to 0.125  $\mu$ M, 0.25  $\mu$ M and 0.5  $\mu$ M of a nonylphenol mixture (NP, Fluka, France), or to solvent control (DMSO; 0.01 % v/v) for 7 days. Each experimental group consisted of 15 embryos (in duplicate) in 100ml of water. Zebrafish embryos were kept in an incubator at 28°C, under semi-static conditions with 50% of daily water renewal.

#### 2.2.2 *Experiment 2: Zebrafish exposure to xenoestrogens and pure ER antagonist alone or in combination from 0 to 5dpf*

Zebrafish eggs were exposed from 0 dpf to 5 dpf to 0.5 nM of EE2, 0.5  $\mu$ M of NP, 1  $\mu$ M of the pure estrogen receptor antagonist ICI 182-780 (ICI, Sigma-Aldrich, France), 0.5 nM of EE2 with 1  $\mu$ M of ICI, 0.5  $\mu$ M of NP with 1  $\mu$ M of ICI or to solvent control (DMSO; 0.01 %

v/v). Each experimental group consisted of 15 embryos (in duplicate) in 100ml of water. Zebrafish embryos were kept at 28°C, under semi-static conditions with 50% of daily water renewal.

### ***2.3 Tissue processing***

At the end of the each exposure period, zebrafish larvae were euthanized and fixed 24h in 4% paraformaldehyde in saline phosphate buffer (PBS) at 4°C. After rinsing in PBS, samples were successively transferred to 10%, 20% and 30 % sucrose-PBS solution at 4°C and they were then embedded in Neg-50 cryo-compound (Microm Microtech, France). Frozen-sections of larvae were performed at a thickness of 12µm.

### ***2.4 Immunohistochemistry***

#### *2.4.1 Antibodies*

The GnRH antibody BB8 (Breton et al. 1986) used for this study was raised in rabbit against salmon GnRH. BB8 was used at a dilution of 1:2000. The purified aromatase B (AroB) antibody (Menuet et al. 2005) was raised in rabbit against zebrafish AroB and was used at a 1:300 dilution. AlexaFluor 594-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:200; Invitrogen, France) was used as secondary antibody. To ascertain staining specificity, control sections were processed without the primary antibody.

#### *2.4.2 Immunofluorescence staining*

Frozen sections were rinsed 2 times in PBS for 5 minutes at room temperature. After rinsing, they were incubated for 1 hour in a PBS solution containing 0.2% triton X-100 and 0.5% milk powder. Incubation with the primary antibody was performed overnight in 0.5% milk powder in PBS. Sections were then washed three times during 10 minutes in PBS solution containing

0.2% triton X-100 before being incubated for 2h with the secondary AlexaFluor 594-conjugated antibody. After rinsing the sections in PBS (3x10min), nuclear staining was performed using 3 µg/ml Hoechst 33342 (Invitrogen, France) in PBS for 5 min. Finally the slides were rinsed in PBS for 10 minutes and coverslipped using a fluorescence mounting medium (DAKO, France).

### 2.4.3 Analysis

Immunofluorescence staining were observed using a Zeiss AxioImager.Z1 fluorescence microscope combined with an ApoTome (Zeiss GmbH, Göttingen, Germany). Micrographs were analyzed using the Axiovision Imaging software. For 40x objective, series of optical sections along the z-axis were acquired at 0.35 µm intervals and projected in a single image (maximum-intensity projection). Neuroanatomical localization and nomenclature of brain nuclei followed that of Mueller and Wullimann (2005).

#### Brain aromatase (AroB) immunohistochemistry

AroB labeling was observed on the entire brain of 3 larvae per exposure conditions and microphotographs were captured using the 20x objective. Localization of AroB-immunopositive structures was compared between experimental groups.

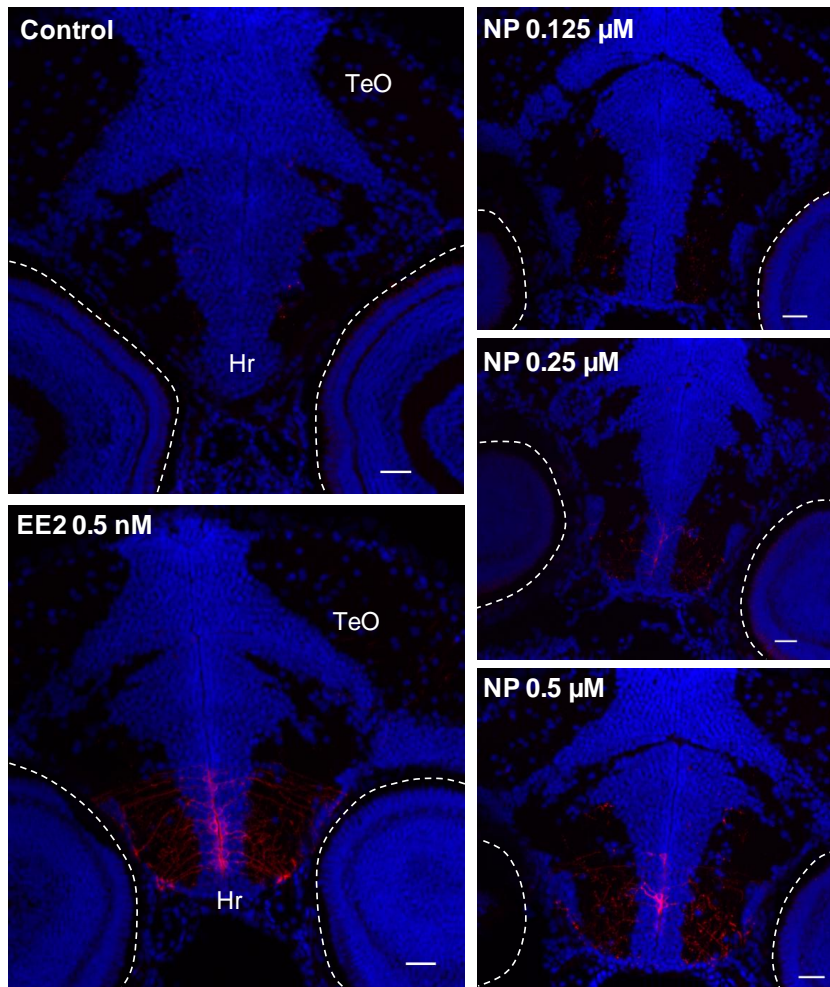
#### GnRH immunohistochemistry

GnRH immunostaining was analyzed on the entire brain of 8 to 10 larvae per exposure conditions. Every field containing GnRH-immunopositive neurons was photographed with 40x objective. These digitized images were then used to determine the total number of GnRH cell bodies by manually counting every nucleated GnRH-ir neurons for each larva. This analysis was blindly performed without a priori knowledge of the specimen identity.



## **2.5 *Statistical analysis***

The total number of GnRH-ir cell bodies was expressed as means  $\pm$  standard error of the mean (SEM) of n independent observations. Data were statistically analyzed using the Kruskal-Wallis non-parametric test followed by the post hoc Dunn's test for multiple comparisons (Anastats software). A p value of less than 0.05 was considered to be statistically significant.



**Figure 1 : AroB expression (red) in the brain of 7 dpf-old zebrafish from control and treated groups with either EE2 0.5 nM, NP 0.125 μM, NP 0.25μM or NP 0. 5μM.** Microphotographs of transverse sections at the level of the rostral hypothalamus (200x magnification). TeO, tectum opticum; Hr, rostral hypothalamus. Dotted lines indicate eyes. Blue: Hoechst staining. Scale bars = 20 μm.

### 3. Results

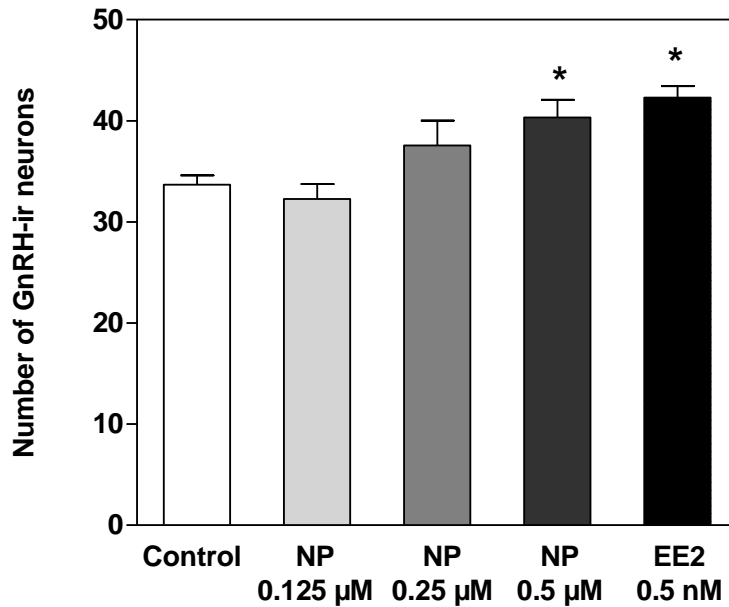
#### 3.1 Experiment 1: Effects of xenoestrogens during zebrafish early development

##### *Xenoestrogens up-regulate brain aromatase (AroB) expression*

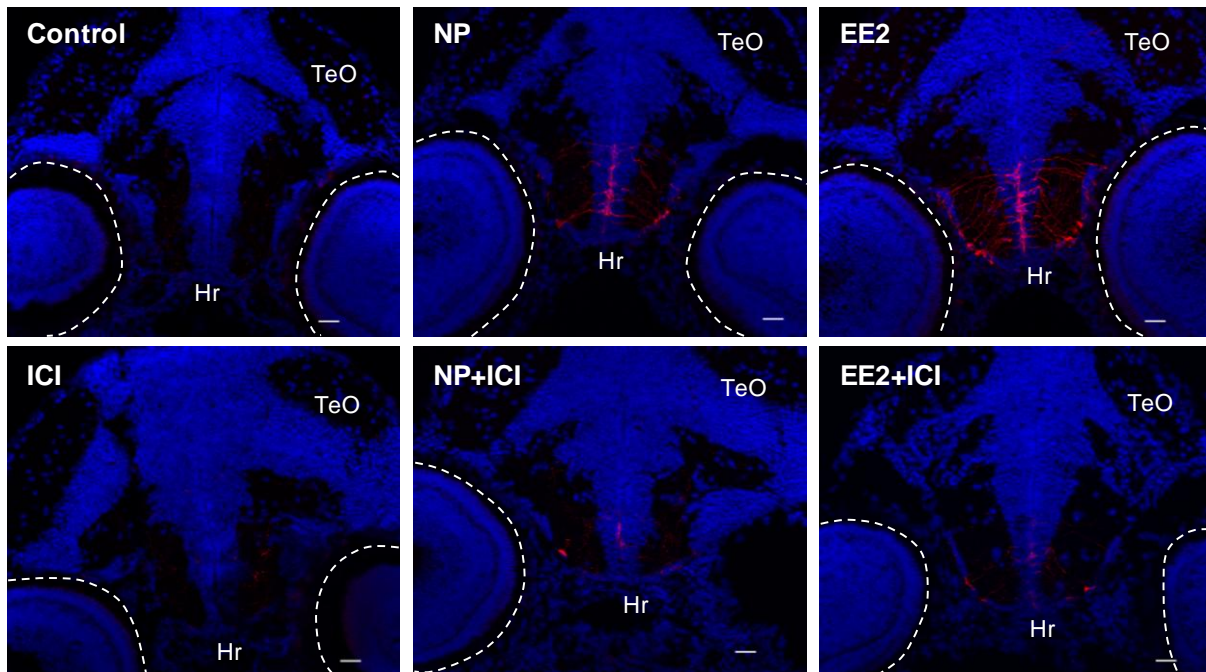
The AroB expression was explored by immunohistochemistry in the brain of zebrafish larvae exposed from 0 dpf to 7 dpf to NP and EE2. In all experimental groups, including control group, a strong AroB immunoreactivity was observed in the pituitary (data not shown). In the brain, the analysis of AroB immunoreactivity revealed significant differences among experimental group. **Figure 1** shows representative microphotographs of AroB expression in the rostral hypothalamus of 7 dpf zebrafish larvae. In control larvae, a faint immunoreactivity was observed in a few cytoplasmic extensions (**Fig. 1, Control**). By contrast, the exposure of fish to 0.5 nM EE2 resulted in a dramatic AroB immunoreactivity in radial glial cells (**Fig. 1, EE2**). The developmental exposure of zebrafish to NP induced a concentration-dependent up-regulation of AroB expression in radial glial cells (**Fig. 1, NP 0.125  $\mu$ M; NP 0.25  $\mu$ M; NP 0.5  $\mu$ M**). Indeed, the exposure of zebrafish to 0.125  $\mu$ M of NP produced a slight increase of AroB immunoreactivity as compared to the control group, whereas exposure to 0.25  $\mu$ M and 0.5  $\mu$ M of NP induced a strong AroB immunoreactivity in radial glial cells. AroB immunoreactivity was weaker in NP- treated groups as compared to EE2-exposed fish.

##### *Xenoestrogens affect the number of forebrain GnRH-ir neurons*

Quantitative analysis of the total number of forebrain GnRH-immunoreactive (ir) neurons was performed in the entire brain of zebrafish larvae exposed from 0 to 7 dpf to EE2 (0.5nM) or NP (0.125 $\mu$ M; 0.25 $\mu$ M ;0.5 $\mu$ M). In control larvae, the average number of GnRH-ir cell



**Figure 2: Effect of EE2 and NP exposure on forebrain GnRH-ir cell number in zebrafish larvae exposed from 0 dpf to 7 dpf.** Values are expressed as means  $\pm$  S.E.M ( $n = 8-10$  larvae per treatment group). \*\*  $p < 0.05$  compared with control group (Kruskal-Wallis nonparametric test with *post hoc* Dunn's test for multiple comparisons).



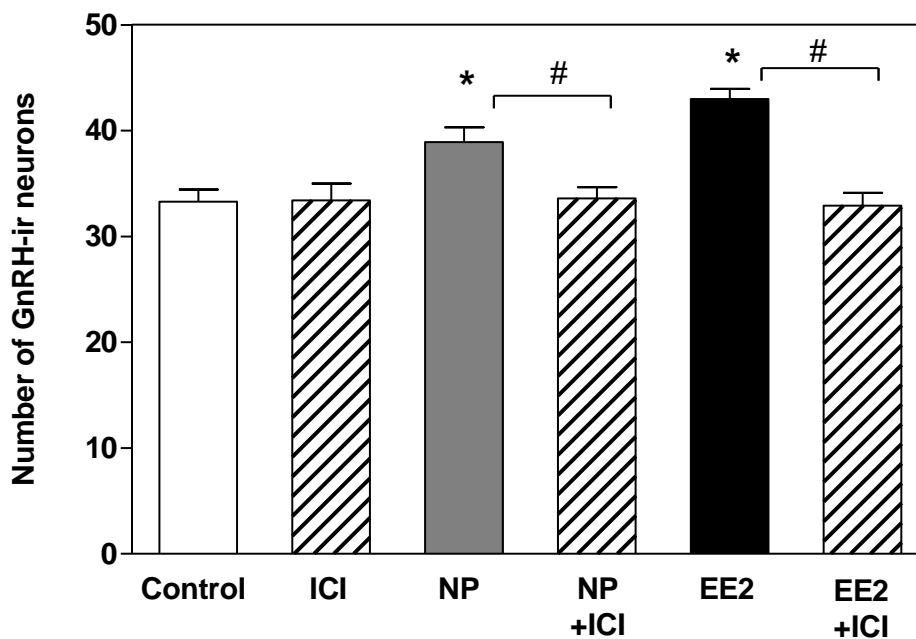
**Figure 3: AroB expression (red) in the brain of 5 dpf zebrafish control or treated with ICI 1μM (ICI), NP 0.5μM (NP), NP 0.5μM + ICI (NP+ICI), EE2 0.5 nM(EE2) or EE2 0.5 nM + ICI 1μM (EE2+ICI).** Microphotographs of transverse sections at the level of the rostral hypothalamus (200x magnifications). TeO, tectum opticum; Hr, rostral hypothalamus. Dotted lines indicate eyes. Blue: Hoechst staining. Scale bars = 20 μm.

bodies in the forebrain was  $33.7 \pm 0.9$  (n=10; **Fig. 2**). The larvae exposed to  $0.125 \mu\text{M}$  of NP showed no differences with the control group ( $32.3 \pm 1.4$ , n=8, **Fig. 2**). Similarly, in the group of  $0.25 \mu\text{M}$  NP-treated larvae, the number of GnRH-ir cell bodies did not differ significantly from the control group ( $37.6 \pm 2.5$ , n=8), although there was a clear tendency towards an increase. By contrast, the groups of larvae exposed to  $0.5 \mu\text{M}$  NP and  $0.5 \text{ nM}$  EE2 displayed a significant higher number of GnRH-ir neurons ( $40.3 \pm 1.7$  and  $42.3 \pm 1.1$  respectively, n=10; **Fig. 2**) as compared to the control group.

### ***3.2 Experiment 2: Effect of xenoestrogens, alone or in combination with the pure ER antagonist ICI 182-780 during zebrafish early development***

#### *The up-regulation of AroB expression by xenoestrogens is ER-dependent*

Using immunohistochemistry, AroB expression was investigated in the brain of zebrafish larvae exposed from 0 dpf to 5 dpf to EE2  $0.5 \text{ nM}$  and NP  $0.5 \mu\text{M}$ , alone or in combination with the pure ER antagonist ICI 182-780. In control larvae, as well as in  $1 \mu\text{M}$  of ICI exposed-larvae, the AroB immunoreactivity in the rostral hypothalamus was restricted to few cytoplasmic extensions (**Fig. 3, Control; ICI**). By contrast, zebrafish larvae exposed to xenoestrogens showed a strong AroB immunoreactivity in radial glial cells (**Fig. 3, NP; EE2**), with a higher staining in fish exposed to  $0.5 \text{ nM}$  of EE2, confirming the results of the first experiment. In larvae exposed to NP ( $0.5 \mu\text{M}$ ) or EE2 ( $0.5 \text{ nM}$ ) in combination with ICI ( $1 \mu\text{M}$ ), only a few AroB-positive cells were observed in the rostral hypothalamus (**Fig. 3, NP+ICI, EE2+ICI**). This contrasts significantly with the strong AroB immunoreactivity seen in larvae exposed to NP or EE2 alone (**Fig. 3, NP; EE2**).



**Figure 4:** Number of forebrain GnRH-ir cells in zebrafish larvae exposed from 0 dpf to 5 dpf to DMSO (control), ICI 1 $\mu$ M (ICI), EE2 0.5 nM (EE2), EE2 0.5 nM + ICI 1 $\mu$ M (EE2+ICI), NP 0.5 $\mu$ M (NP) or NP 0.5 $\mu$ M + ICI 1 $\mu$ M (NP+ICI). Values are expressed as means  $\pm$  S.E.M ( $n = 10$  larvae per treatment group). \*  $p < 0.05$  compared with control group (Kruskal-Wallis nonparametric test with *post hoc* Dunn's test for multiple comparisons); #  $p < 0.05$  (Mann Whitney U-test).

*The increase in number of forebrain GnRH-ir neurons induced by xenoestrogens involves*

*ER signalling pathway*

As reported above (see experiment 1 , **Fig. 2**), early exposure of zebrafish embryos to NP and EE2 resulted in a significant increase in the number of forebrain GnRH-ir cells bodies (**Fig. 4**). To investigate the involvement of estrogen receptor signalling pathway in these effects, zebrafish embryos were exposed to NP (0.5 $\mu$ M) or EE2 (0.5nM), alone or in combination with the pure ER antagonist, ICI 182-780 (1 $\mu$ M), from 0 dpf to 5 dpf. In control larvae, the number of GnRH-ir cell bodies was  $33.3 \pm 1.1$  (n=10, **Fig. 4**). The exposure of larvae to 1 $\mu$ M of ICI alone had no effect on the number of GnRH-ir neurons ( $33.4 \pm 1.6$ ; n=10 **Fig. 4**). In contrast, the larvae exposed to 0.5 nM of EE2 and 0.5  $\mu$ M of NP showed a significantly higher number of GnRH-ir cell bodies ( $43 \pm 0.9$  and  $39.3 \pm 1.5$  respectively,  $p < 0.05$ ; n=10 **Fig. 4**) as compared to the control larvae. Interestingly, exposure of larvae to EE2 (0.5nM) or NP (0.5 $\mu$ M) in combination with ICI (1 $\mu$ M) resulted in a number of GnRH-ir neurons similar to that of control group ( $32.9 \pm 2$  and  $33.6 \pm 1.2$  respectively; n=10 **Fig. 4**). These results indicate that the ER antagonist, ICI, totally blocked the effect induced by NP and EE2 on the number GnRH-ir neurons.

## 4. Discussion

The purpose of the present study was to investigate the effect of two xenoestrogens on key neuroendocrine networks, GnRH and brain aromatase, controlling development and reproduction in vertebrates. Using immunohistochemistry, we demonstrated that EE2, as well as the weak estrogenic compound nonylphenol (NP), affect the ontogeny of the forebrain GnRH system and the expression of the brain aromatase during zebrafish early development. In addition, we showed that the effects observed involved functional estrogen receptor (ER). To our knowledge, our results demonstrate for the first time in fish or any other vertebrates that EE2 and NP are able to disrupt GnRH ontogeny through an ER-dependent mechanism during embryogenesis. Even though the concentrations of EE2 ( $0.5\text{nM} \approx 150\text{ ng/L}$ ) and NP ( $0.125\text{-}0.5\mu\text{M} \approx 27.5\text{-}110\mu\text{g/L}$ ) used to trigger increase GnRH-ir neurons number and brain AroB expression are higher than concentrations generally found in aquatic environments, it is important to consider that, high concentrations of NP, of up to  $644\mu\text{g/l}$  have been measured locally in surface water of some rivers (Sole et al. 2000). In addition, long chronic exposure of fish to NP can result in high concentrations in tissues since NP bioaccumulate in fish (Soares et al. 2008). Regarding EE2, a recent study on the benthic fish *Moxostoma macrolepidotum* suggests that this pharmaceutical EDC bioconcentrates in fish (Al-Ansari et al. 2010). Altogether, results from this study point out that xenoestrogens can induce significant effect on neuroendocrine circuits and emphasize the relevance of considering central networks in hazard and risk assessment of EDCs in fish. Given the widespread contamination of aquatic environments by xenoestrogens, these results raise the question of their putative effect in wild fish.



### ***Xenoestrogens up-regulate AroB expression through estrogen receptor pathway***

In the present work we showed that NP and EE2 up-regulated the expression of AroB in the brain of zebrafish larvae. The induction of AroB expression by NP was shown to be concentration-dependent. Moreover, we confirmed that EE2 exposure triggered a dramatic up-regulation of AroB expression in radial glial cells. These data agree with previous studies demonstrating that both NP and EE2 enhanced *cyp19a1b* gene expression in zebrafish larvae (Hinfray et al. 2008; Kazeto et al. 2004) in juvenile atlantic salmon, *Salmo salar* (Meucci and Arukwe 2006) and in the hermaphroditic fish, *Rivulus marmoratus* (Lee et al. 2006). Interestingly, the up-regulation of AroB expression in the brain of NP-treated fish was shown to be significantly lower than in EE2-exposed larvae confirming the weak estrogenic activity of NP compared to EE2.

The estrogen-dependent regulation of AroB expression was shown to involve functional ERs and the binding of liganded-ER on estrogen-responsive elements located in the promoter region of the *cyp19a1b* gene (Le Page et al. 2006; Menuet et al. 2005). To confirm the implication of ERs in the up-regulation of AroB expression by EE2 and NP, zebrafish embryos were co-exposed to EE2 or NP and the ER pure antagonist ICI 182-780. As expected, the co-treatment with ICI resulted in a strong reduction of AroB expression as compared with xenoestrogens exposure alone. Thus, although the AroB immunoreactivity was not entirely suppressed, our results confirmed that xenoestrogens effects on AroB expression are mediated through estrogen receptors.

Overall, these results highlighted that ER signalling pathway is targeted by xenoestrogens at the central level during zebrafish early development. Therefore, other central processes depending on ER signalling may be disrupted by xenoestrogens.

*Xenoestrogens increase the number of GnRH-ir neurons through estrogen receptor  
pathway*

We previously reported that low concentrations of EE2 disrupt the ontogeny of forebrain GnRH neurons during zebrafish early development, notably by increasing the number of GnRH-ir neurons (Vosges et al. 2010). In the present study, we further confirmed our previous data on the ability of EE2 to affect the number of GnRH-ir neurons since zebrafish exposure to 0.5 nM of EE2 from 0 dpf to 5dpf, or from 0 dpf to 7dpf, resulted in higher number GnRH-ir neurons compared with the control group. Interestingly, we found in the present study that the number of GnRH-ir neurons in control larvae was similar from an experiment to another but was higher than previously reported (Vosges et al. 2010). The reason for this difference remains not fully understood but may rely on subtle changes in experimental conditions. Further studies are needed to address the potential influence of abiotic factors (e.g., temperature, photoperiod) on GnRH neurons number in zebrafish.

In addition to EE2, we investigated the effect of NP, a widespread estrogenic EDC which is known to produce adverse reproductive effects (Soares et al. 2008). We showed that NP exposure increased the number of GnRH-ir neurons in a concentration-dependent manner with a significant effect at 0.5  $\mu$ M of NP. These results highlight that the disruption of forebrain GnRH ontogeny in zebrafish is not restricted to EE2 but can also be induced by other xenoestrogen with a much weaker estrogenic activity.

To unravel the mechanisms underlying the effects of NP and EE2 on the ontogeny of GnRH neurons, we investigated the involvement of estrogen receptor signalling pathway using the ER antagonist ICI 182-780. The exposure of zebrafish embryo to NP or EE2 in combination with ICI was shown to significantly inhibit the increase in the number of GnRH-ir neurons induced by xenoestrogens alone. These findings demonstrate that functional ERs are involved in the effects of NP and EE2 on GnRH development.

In the zebrafish, three estrogen receptors have been characterized (ER $\alpha$ , ER $\beta$ 1 and ER $\beta$ 2) (Menuet et al. 2002) and both NP and EE2 have been shown to bind and activate these ERs *in vitro* (Cosnefroy et al. in prep.; Legler et al. 2002). Spatiotemporal expression of zebrafish ERs was recently investigated during the development and revealed that the three ERs are expressed in early steps of development (Mouriec et al. 2009). Interestingly, whole-mount *in situ* hybridization showed that ER $\beta$ 1 and ER $\beta$ 2 are early expressed in developing neuroendocrine regions, whilst ER $\alpha$  mRNAs are not detected in the brain before two weeks post fertilization (Mouriec et al. 2009). Taken together with our results, these data suggest that the effects of xenoestrogens on the development of GnRH neurons are mediated by ER $\beta$ s.

Whether these effects are direct on GnRH neurons or indirect remains to be determined. To date, ERs have not been found in teleost GnRH neurons (Navas et al. 1995), supporting the hypothesis that estrogen action is indirectly conveyed to GnRH neurons through other ERs-bearing cells. However, the GnRH promoter of the Atlantic salmon (*Salmo salar*) was found to contain estrogen response element (ERE)-like motifs suggesting potential direct estrogen regulation of the *GnRH* gene (Klungland et al. 1993).

In mammals, GnRH neurons were shown to express ER $\beta$  transcripts in prepubertal and adult mice (Herbison and Pape 2001). In addition, membrane-located receptors were found to mediate rapid action of estrogens on GnRH neurons (Abe et al. 2008; Noel et al. 2009). Together these data support direct effects of estrogens on GnRH neurons. On the other hand, several lines of evidence indicate that estrogens action on GnRH neurons is indirectly mediated through ERs-expressing neurons, glia and endothelial cells (Herbison 2008; Petersen et al. 2003; Prevot 2002). Recently, Kisspeptin neurons have been found critical to mediate estrogen action on GnRH neurons (for review, see Colledge 2009). Interestingly, Kisspeptins have been identified in several teleost fish, including zebrafish, encoded by two paralogous genes (Felip et al. 2009; Kitahashi et al. 2009; Lee et al. 2009). However, the relationships

between Kisspeptin and GnRH neurons remain unclear in fish even if the presence of the Kiss receptor GPR54 in GnRH neurons suggests potential interactions (Parhar et al. 2004).

Therefore, in the present study, the effects of the xenoestrogens EE2 and NP on GnRH neurons may involve direct as well as indirect action that need to be investigated. Anyway, the increase in the number of GnRH-ir neurons, after EE2 and NP exposures, raises the question of the mechanisms underlying the effects of xenoestrogens on GnRH neuronal development during zebrafish embryogenesis.

It is now well accepted that estrogens exert neurotrophic and neuroprotective functions that are critical for neuronal fate (Behl 2002; Brann et al. 2007; Garcia-Segura et al. 2001). *In vivo*, estradiol was shown to promote neuronal progenitor proliferation in rodent but these effects were dependent on several parameters including age, sex and estradiol levels (for review, see Galea 2008). *In vitro* studies, demonstrated that 17 $\beta$  estradiol (E2) significantly increases the proliferation of rodent embryonic neural stem cells and human neural progenitor cells (Brännvall et al. 2002; Wang et al. 2008). In addition, E2 was shown to enhance neuronal differentiation (Brännvall et al. 2002). Interestingly, the estrogen mimic, bisphenol A, was also found to increase embryonic neural stem cells proliferation in rodent (Okada et al. 2008), highlighting the capacity of environmental contaminant to affect neuronal proliferation during early life stage.

Estrogens effects on neurogenesis were shown to involve ERs (Brännvall et al. 2002; Wang et al. 2008), and more specifically the ER $\beta$  (Wang et al. 2008). Consistent with this, alterations of neurogenesis and neuronal migration have been reported in ER $\beta$  knockout mice (Wang et al. 2003).

Together, these studies supported that estrogens enhance neurogenesis through ERs pathway, which is in agreement with a proliferative effect of xenoestrogens on GnRH neurons during zebrafish development as found in this study. Interestingly, in sheep, the potential

effect of estradiol on proliferation of GnRH neurons was suggested *in vitro* following treatments of GnRH culture by E2 antagonist causing a marked decrease in GnRH neurons proliferation (Agca et al. 2008).

In addition to promote neurogenesis, there is clear evidence of neuroprotective properties of estrogens (Behl 2002; Brann et al. 2007; Garcia-Segura et al. 2001). Indeed, estrogens are well known for acting as a neuroprotective factor under brain repair conditions (Dubal et al. 1998; Suzuki et al. 2009). Estradiol has also been reported to enhance neuronal survival (Ormerod et al. 2004), and to prevent neuronal apoptosis through ERs signalling (Linford and Dorsa 2002). Thus, in the present study, the increase in number of GnRH-ir neurons induced by EE2 and NP may reflect a protective effect of xenoestrogens on GnRH neurons during zebrafish early development.

In teleost fish, the roles of estrogens in neurogenesis and/or neuroprotection are poorly documented. However, increasing evidence suggests that local production of estrogens through brain aromatase (AroB) could be involved in neurogenesis (Diotel et al. 2010; Mouriec et al. 2008; Pellegrini et al. 2005). In fish, AroB expression is restricted to radial glial cells that are known to be progenitor cells playing a critical role in neurogenesis (Pellegrini et al. 2007). Interestingly, in the present study we showed that EE2 and NP strongly stimulated AroB expression in radial glial cells. Moreover, we previously demonstrated that EE2 exposure induced close associations between GnRH-ir neurons and radial glial cells expressing AroB-GFP in transgenic zebrafish *cyp19a1b*-GFP (Vosges et al. 2010). Together, these data strongly suggest functional link between the up-regulation of AroB expression in radial glial cells and the increase in the number of GnRH-ir neurons that we reported after xenoestrogens exposure. Extensive investigations will be required to disclose the mechanisms linking AroB and GnRH disruption during zebrafish development.

In summary, our study demonstrates that short-term embryonic exposure to weak or potent xenoestrogens disrupts the ontogeny of key central networks involved in the development and the regulation of reproductive function of fish. We demonstrated for the first time the implication of estrogen receptors signalling in mediating these effects. Given the great number of compounds in the aquatic environment that possess estrogenic activities, it appears relevant to consider their potential effects at the central level to improve our understanding on their endocrine disrupting effect in fish as well as in other vertebrate model. Our results also highlight the need to consider neuroendocrine networks as critical and sensitive endpoints that could be use to improve the hazard and the risk assessment of EDCs.

## **Acknowledgements**

This work was supported by the French Ministry of Ecology and Sustainable Development (grant 189\_09 DRC01 and the NEMO project), the French National Research Agency (Project Neuroendocrine Effect of Endocrine Disruptors NEED, CES 2008-011).

## References

- Abe H, Keen KL, Terasawa E. 2008. Rapid Action of Estrogens on Intracellular Calcium Oscillations in Primate Luteinizing Hormone-Releasing Hormone-1 Neurons. *Endocrinology* 149(3):1155-1162.
- Agca E, Batailler M, Tillet Y, Chemineau P, Duittoz AH. 2008. Modulation of estrogen receptors during development inhibits neurogenesis of precursors to GnRH-1 neurones: in vitro studies with explants of ovine olfactory placode. *Brain Res* 1223:34-41.
- Al-Ansari AM, Saleem A, Kimpe LE, Sherry JP, McMaster ME, Trudeau VL, Blais JM. 2010. Bioaccumulation of the pharmaceutical 17 alpha-ethinylestradiol in shorthead redhorse suckers (*Moxostoma macrolepidotum*) from the St. Clair River, Canada. *Environmental Pollution* 158(8):2566-2571.
- Behl C. 2002. Oestrogen as a neuroprotective hormone. *Nat Rev Neurosci* 3(6):433-442.
- Bourguignon J-P, Rasier G, Lebrethon M-C, Gérard A, Naveau E, Parent A-S. 2010. Neuroendocrine disruption of pubertal timing and interactions between homeostasis of reproduction and energy balance. *Molecular and Cellular Endocrinology* 324(1-2):110-120.
- Brann DW, Dhandapani K, Wakade C, Mahesh VB, Khan MM. 2007. Neurotrophic and neuroprotective actions of estrogen: Basic mechanisms and clinical implications. *Steroids* 72(5):381-405.
- Brännvall K, Korhonen L, Lindholm D. 2002. Estrogen-Receptor-Dependent Regulation of Neural Stem Cell Proliferation and Differentiation. *Molecular and Cellular Neuroscience* 21(3):512-520.
- Breton B, Motin A, Billard R, Kah O, Geoffre S, Precigoux G. 1986. Immunoreactive gonadotropin-releasing hormone-like material in the brain and the pituitary gland during the periovulatory period in the brown trout (*Salmo trutta* L.): relationships with the plasma and pituitary gonadotropin. *Gen Comp Endocrinol* 61(1):109-19.
- Colborn T, vom Saal FS, Soto AM. 1993. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ Health Perspect* 101(5):378-84.
- Colledge WH. 2009. Kisspeptins and GnRH neuronal signalling. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 20(3):115-121.
- Cosnefroy A, Brion F, Maillot-Maréchal E, Porcher J, Balaguer P, Aït-Aïssa S. in prep. Development of fish in vitro reporter gene models using zebrafish estrogen receptors in a zebrafish cell line.
- David A, Fenet H, Gomez E. 2009. Alkylphenols in marine environments: Distribution monitoring strategies and detection considerations. *Marine Pollution Bulletin* 58(7):953-960.



- Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon J-P, Giudice LC, Hauser R, Prins GS, Soto AM, Zoeller RT, Gore AC. 2009. Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocr Rev* 30(4):293-342.
- Dickerson SM, Gore AC. 2007. Estrogenic environmental endocrine-disrupting chemical effects on reproductive neuroendocrine function and dysfunction across the life cycle. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders* 8(2):143-159.
- Diotel N, Page YL, Mouriec K, Tong S-K, Pellegrini E, Vaillant C, Anglade I, Brion F, Pakdel F, Chung B-c and others. 2010. Aromatase in the brain of teleost fish: Expression, regulation and putative functions. *Front Neuroendocrinol* 31(2):172-192.
- Dubal DB, Kashon ML, Pettigrew LC, Ren JM, Finklestein SP, Rau SW, Wise PM. 1998. Estradiol protects against ischemic injury. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 18(11):1253-1258.
- Felip A, Zanuy S, Pineda R, Pinilla L, Carrillo M, Tena-Sempere M, Gomez A. 2009. Evidence for two distinct KiSS genes in non-placental vertebrates that encode kisspeptins with different gonadotropin-releasing activities in fish and mammals. *Mol Cell Endocrinol* 312(1-2):61-71.
- Galea LAM. 2008. Gonadal hormone modulation of neurogenesis in the dentate gyrus of adult male and female rodents. *Brain Research Reviews* 57(2):332-341.
- Garcia-Segura LM, Azcoitia I, DonCarlos LL. 2001. Neuroprotection by estradiol. *Progress in Neurobiology* 63(1):29-60.
- Giger W, Brunner PH, Schaffner C. 1984. 4-nonylphenol in sewage-sludge - accumulation of toxic metabolites from nonionic surfactants. *Science* 225(4662):623-625.
- Goksoyr A. 2006. Endocrine disruptors in the marine environment: Mechanisms of toxicity and their influence on reproductive processes in fish. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part a-Current Issues* 69(1-2):175-184.
- Herbison AE. 2008. Estrogen positive feedback to gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons in the rodent: The case for the rostral periventricular area of the third ventricle (RP3V). *Brain Research Reviews* 57(2):277-287.
- Herbison AE, Pape JR. 2001. New evidence for estrogen receptors in gonadotropin-releasing hormone neurons. *Frontiers in Neuroendocrinology* 22(4):292-308.
- Hinfray N, Cheshenko K, Ait-Aissa S, Palluel O, Porcher JM, Pakdel F, Eggen RIL, Kah O, Brion F. 2008. Brain and gonadal aromatases as molecular and biochemical targets of endocrine disruptors in a model species, the zebrafish (*Danio rerio*). *Cybiurn* 32(2):34-36.
- Hotchkiss AK, Rider CV, Blystone CR, Wilson VS, Hartig PC, Ankley GT, Foster PM, Gray CL, Gray LE. 2008. Fifteen years after "Wingspread" - environmental endocrine disruptors and human and wildlife health: where we are today and where we need to go. *Toxicol Sci* 105(2):235-59.

- Kavlock RJ, Daston GP, DeRosa C, Fenner-Crisp P, Gray LE, Kaattari S, Lucier G, Luster M, Mac MJ, Maczka C and others. 1996. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environ Health Perspect* 104 Suppl 4:715-40.
- Kazeto Y, Place AR, Trant JM. 2004. Effects of endocrine disrupting chemicals on the expression of CYP19 genes in zebrafish (*Danio rerio*) juveniles. *Aquat Toxicol* 69(1):25-34.
- Kitahashi T, Ogawa S, Parhar IS. 2009. Cloning and expression of kiss2 in the zebrafish and medaka. *Endocrinology* 150(2):821-31.
- Klungland H, Andersen Ø, Kisen G, Aleström P, Tora L. 1993. Estrogen receptor binds to the salmon GnRH gene in a region with long palindromic sequences. *Molecular and Cellular Endocrinology* 95(1-2):147-154.
- Le Page Y, Scholze M, Kah O, Pakdel F. 2006. Assessment of xenoestrogens using three distinct estrogen receptors and the zebrafish brain aromatase gene in a highly responsive glial cell system. *Environ Health Perspect* 114(5):752-8.
- Lee YM, Seo JS, Kim IC, Yoon YD, Lee JS. 2006. Endocrine disrupting chemicals (bisphenol A, 4-nonylphenol, 4-tert-octylphenol) modulate expression of two distinct cytochrome P450 aromatase genes differently in gender types of the hermaphroditic fish *Rivulus marmoratus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 345(2):894-903.
- Lee YR, Tsunekawa K, Moon MJ, Um HN, Hwang JI, Osugi T, Otaki N, Sunakawa Y, Kim K, Vaudry H and others. 2009. Molecular evolution of multiple forms of kisspeptins and GPR54 receptors in vertebrates. *Endocrinology* 150(6):2837-46.
- Legler J, Zeinstra LM, Schuitemaker F, Lanser PH, Bogerd J, Brouwer A, Vethaak AD, De Voogt P, Murk AJ, Van der Burg B. 2002. Comparison of in vivo and in vitro reporter gene assays for short-term screening of estrogenic activity. *Environmental Science & Technology* 36(20):4410-4415.
- Linford NJ, Dorsa DM. 2002. 17[ $\beta$ ]-Estradiol and the phytoestrogen genistein attenuate neuronal apoptosis induced by the endoplasmic reticulum calcium-ATPase inhibitor thapsigargin. *Steroids* 67(13-14):1029-1040.
- Menuet A, Pellegrini E, Anglade I, Blaise O, Laudet V, Kah O, Pakdel F. 2002. Molecular characterization of three estrogen receptor forms in zebrafish: Binding characteristics, transactivation properties, and tissue distributions. *Biology of Reproduction* 66(6):1881-1892.
- Menuet A, Pellegrini E, Brion F, Gueguen MM, Anglade I, Pakdel F, Kah O. 2005. Expression and estrogen-dependent regulation of the zebrafish brain aromatase gene. *J Comp Neurol* 485(4):304-20.

- Meucci V, Arukwe A. 2006. Transcriptional modulation of brain and hepatic estrogen receptor and P450arom isotypes in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) after waterborne exposure to the xenoestrogen, 4-nonylphenol. *Aquatic Toxicology* 77(2):167-177.
- Mouriec K, Lareyre JJ, Tong SK, Le Page Y, Vaillant C, Pellegrini E, Pakdel F, Chung BC, Kah O, Anglade I. 2009. Early regulation of brain aromatase (*cyp19a1b*) by estrogen receptors during zebrafish development. *Dev Dyn* 238(10):2641-51.
- Mouriec K, Pellegrini E, Anglade I, Menuet A, Adrio F, Thieulant ML, Pakdel F, Kah O. 2008. Synthesis of estrogens in progenitor cells of adult fish brain: Evolutionary novelty or exaggeration of a more general mechanism implicating estrogens in neurogenesis? *Brain Research Bulletin* 75(2-4):274-280.
- Mueller and Wullimann TMaMFW, Amsterdam (2005). editor. 2005. *Atlas of Early Zebrafish Brain Development: A Tool for Molecular Neurogenetics*. Amsterdam: Elsevier Publishing Company.
- Navas JM, Anglade I, Bailhache T, Pakdel F, Breton B, Jegou P, Kah O. 1995. Do gonadotrophin-releasing hormone neurons express estrogen receptors in the rainbow trout? A double immunohistochemical study. *J Comp Neurol* 363(3):461-74.
- Noel SD, Keen KL, Baumann DI, Filardo EJ, Terasawa E. 2009. Involvement of G Protein-Coupled Receptor 30 (GPR30) in Rapid Action of Estrogen in Primate LHRH Neurons. *Mol Endocrinol* 23(3):349-359.
- Okada M, Murase K, Makino A, Nakajima M, Kaku T, Furukawa S, Furukawa Y. 2008. Effects of estrogens on proliferation and differentiation of neural stem/progenitor cells. *Biomedical Research-Tokyo* 29(3):163-170.
- Ormerod BK, Lee TTY, Galea LAM. 2004. Estradiol enhances neurogenesis in the dentate gyri of adult male meadow voles by increasing the survival of young granule neurons. *Neuroscience* 128(3):645-654.
- Parhar IS, Ogawa S, Sakuma Y. 2004. Laser-captured single digoxigenin-labeled neurons of gonadotropin-releasing hormone types reveal a novel G protein-coupled receptor (Gpr54) during maturation in cichlid fish. *Endocrinology* 145(8):3613-8.
- Pellegrini E, Menuet A, Lethimonier C, Adrio F, Gueguen MM, Tascon C, Anglade I, Pakdel F, Kah O. 2005. Relationships between aromatase and estrogen receptors in the brain of teleost fish. *Gen Comp Endocrinol* 142(1-2):60-6.
- Pellegrini E, Mouriec K, Anglade I, Menuet A, Le Page Y, Gueguen MM, Marmignon MH, Brion F, Pakdel F, Kah O. 2007. Identification of aromatase-positive radial glial cells as progenitor cells in the ventricular layer of the forebrain in zebrafish. *J Comp Neurol* 501(1):150-67.
- Petersen SL, Ottem EN, Carpenter CD. 2003. Direct and Indirect Regulation of Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons by Estradiol. *Biology of Reproduction* 69(6):1771-1778.

- Prevot V. 2002. Glial–Neuronal–Endothelial Interactions are Involved in the Control of GnRH Secretion. *Journal of Neuroendocrinology* 14(3):247-255.
- Soares A, Guieysse B, Jefferson B, Cartmell E, Lester JN. 2008. Nonylphenol in the environment: A critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. *Environment International* 34(7):1033-1049.
- Sole M, de Alda MJL, Castillo M, Porte C, Ladegaard-Pedersen K, Barcelo D. 2000. Estrogenicity determination in sewage treatment plants and surface waters from the Catalonian area (NE Spain). *Environmental Science & Technology* 34(24):5076-5083.
- Suzuki S, Brown CM, Wise PM. 2009. Neuroprotective effects of estrogens following ischemic stroke. *Frontiers in Neuroendocrinology* 30(2):201-211.
- Vos JG, Dybing E, Greim HA, Ladefoged O, Lambre C, Tarazona JV, Brandt I, Vethaak AD. 2000. Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation. *Crit Rev Toxicol* 30(1):71-133.
- Vosges M, Le Page Y, Chung B-c, Combarous Y, Porcher J-M, Kah O, Brion F. 2010. 17[alpha]-Ethinylestradiol disrupts the ontogeny of the forebrain GnRH system and the expression of brain aromatase during early development of zebrafish. *Aquatic Toxicology* 99(4):479-491.
- Wang JM, Liu L, Brinton RD. 2008. Estradiol-17beta -Induced Human Neural Progenitor Cell Proliferation Is Mediated by an Estrogen Receptor -Phosphorylated Extracellularly Regulated Kinase Pathway. *Endocrinology* 149(1):208-218.
- Wang L, Andersson S, Warner M, Gustafsson J-Å. 2003. Estrogen receptor (ER)beta knockout mice reveal a role for ERbeta in migration of cortical neurons in the developing brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(2):703-708.

# DISCUSSION GENERALE

---

Ce travail de thèse s'est inscrit dans la problématique générale de l'étude des effets des perturbateurs endocriniens sur la reproduction chez les poissons. Durant ces deux dernières décennies, de nombreux travaux ont été menés pour étudier les mécanismes d'actions des PE et en évaluer le risque pour les populations. Ces travaux, principalement axés sur les organes périphériques, n'ont pas pris en compte l'impact potentiel des PE sur les circuits neuroendocrines impliqués dans le développement et la reproduction.

Cette thèse s'est inscrite dans une démarche originale visant à étudier les effets neuroendocrines de perturbateurs endocriniens. Plus spécifiquement, il s'agissait d'évaluer l'impact potentiel des xéno-œstrogènes sur le système à GnRH chez le poisson zèbre (*Danio rerio*). Parallèlement, nous avons étudié l'expression de l'aromatase B, codée par le gène *cyp19a1b*, qui est une cible centrale avérée des composés œstrogènes mimétiques (Cheshenko et al. 2007; Hinfray et al. 2006; Kazeto et al. 2004). Nos travaux se sont structurés autour d'axes complémentaires. Nous nous sommes d'une part attachés à obtenir une cartographie générale de la distribution de l'expression de la GnRH (Article 1) et d'autre part à acquérir des connaissances précises sur l'ontogenèse des neurones à GnRH et l'expression de l'aromatase B (Article 2). Nous avons en particulier apporté des données quantitatives qui, à notre connaissance, sont originales chez cette espèce.

Cette étape de caractérisation du système GnRH chez des poissons non contaminés était indispensable pour appréhender les effets des xéno-œstrogènes dont nous montrons qu'ils affectent la mise en place du système GnRH au cours du développement précoce (Articles 2, et 3) selon un mécanisme qui implique des récepteurs des œstrogènes fonctionnels (Article 3). L'étude de la perturbation de l'expression de l'aromatase au cours du développement précoce du poisson nous a permis de confirmer l'extrême sensibilité de l'induction de l'aromatase B dans le cas d'une exposition aux xéno-œstrogènes et l'intérêt de cette variable comme marqueur biologique des xéno-œstrogènes (Article 2 et Article 3).

Ce dernier chapitre a pour objectif de replacer les résultats présentés et discutés dans les différents manuscrits du chapitre « Résultats » dans la problématique générale de cette thèse et également de discuter la démarche méthodologique, en soulignant les points qui mériteraient d'être approfondis.

## I. Caractérisation neuroanatomique du système à GnRH par immunohistochimie

L'approche par immunohistochimie que nous avons menée pour étudier le système à GnRH du poisson zèbre a l'avantage d'apporter des informations spatiales mais également quantitatives sur ce réseau neuroendocrine.

L'anticorps anti-GnRH BB8 que nous avons utilisé pour nos travaux reconnaît les deux formes de GnRH du poisson zèbre. En effet, selon les travaux d'hybridation *in situ* de Steven *et al.* (2003) les neurones immunoréactifs détectés dans les bulbes olfactifs, l'aire préoptique et l'hypothalamus sont des neurones à GnRH-3, alors que les corps cellulaires immunoréactifs identifiés dans le mésencéphale sont des neurones à GnRH-2. Le manque de spécificité de l'anticorps BB8, reconnaissant à la fois la GnRH-2 et la GnRH-3, est très certainement lié à la forte homologie qu'il existe entre les séquences peptidiques de ces deux formes de GnRH (voir **Tableau III**). Cependant, notre volonté était d'étudier plus particulièrement la GnRH-3 qui correspond à la forme hypophysiotrope de la GnRH chez le poisson zèbre. Ainsi, notre première intention a été de produire un anticorps permettant de d'identifier les neurones à GnRH hypophysiotropes.

Notre stratégie a consisté à développer un anticorps dirigé contre le fragment GAP (GnRH associated peptide) du précurseur de la GnRH-3 dont la séquence peptidique diffère fortement de celle de la GnRH-2. Cependant, malgré nos efforts expérimentaux de caractérisation, cet anticorps n'a pas permis de révéler la GnRH-3 du poisson zèbre. Nous avons donc poursuivi notre étude en utilisant l'anticorps BB8 qui, malgré son manque de spécificité au regard de la GnRH-3, nous a permis d'effectuer une caractérisation générale du système à GnRH chez le poisson zèbre adulte. De plus, au cours des stades précoces du développement, les neurones qui expriment la GnRH-2 et la GnRH-3 ont des origines embryologiques bien distinctes permettant de les différencier (Palevitch *et al.* 2007). Ainsi, seuls les neurones issus de la région olfactive, connus pour exprimer la GnRH-3, ont été considérés.

Chez le poisson zèbre adulte, le travail de caractérisation du système à GnRH réalisé au cours de cette thèse a permis d'apporter de nouvelles connaissances neuroanatomiques mais également morphométriques. Nous avons ainsi montré que les neurones à GnRH sont peu

nombreux et très dispersés principalement dans le cerveau antérieur. Nous avons également démontré pour la première fois l'absence de dimorphisme sexuel dans la distribution, le nombre et la taille des neurones à GnRH.

Nous avons également apporté des informations sur l'ontogenèse du système à GnRH au cours du développement embryon-larvaire du poisson zèbre confirmant que les neurones à GnRH-ir sont d'abord détectés à proximité de la région olfactive et migrent, au cours de développement, en direction de l'hypothalamus. Ces données sont en accord avec les travaux menés sur le poisson zèbre transgénique *GnRH3:EGFP* (Abraham et al. 2008; Palevitch et al. 2007). Cependant, contrairement à ce qui est décrit chez le modèle transgénique, dans notre étude aucun corps cellulaire GnRH-ir n'est détecté dans la région hypothalamique à 30 jpf. Il existe donc une différence de vitesse de la migration des neurones à GnRH qui peut être liée à la souche de poisson zèbre utilisée dans ces travaux mais également à des conditions expérimentales différentes.

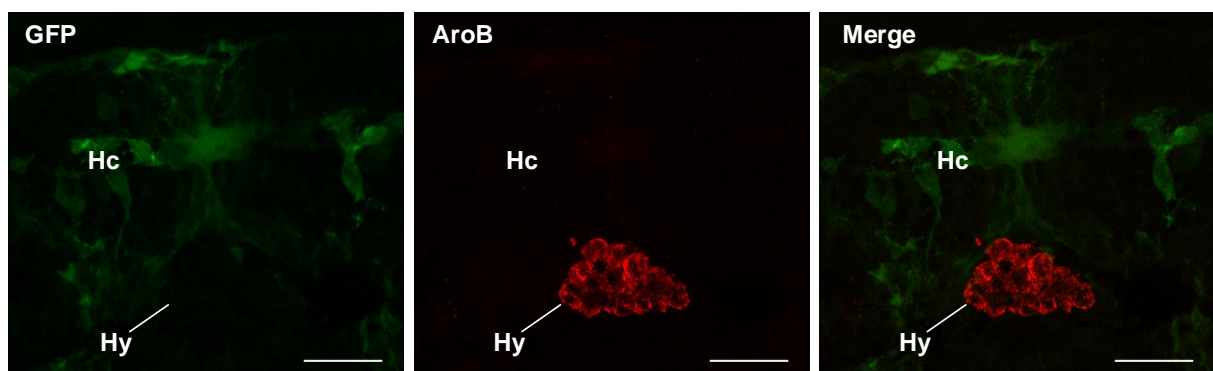
Au cours de nos travaux nous avons également observé une variation du nombre de neurones à GnRH-ir dans les groupes contrôles de 5 jpf. Il est possible que de légères modifications apportées aux conditions expérimentales soient à l'origine de ces variations. L'influence de facteurs externes sur le développement des neurones à GnRH reste donc à considérer.

Chez les mammifères et les oiseaux la photopériode est capable de modifier l'expression de la GnRH (Bernard et al. 1999; Kawamoto et al. 2000; Kuenzel and Golden 2006; Porkka-Heiskanen et al. 1997). Chez le poulet par exemple, une photopériode longue est associée à une augmentation du nombre de neurones à GnRH-1 (Kuenzel and Golden 2006). La température est également capable de moduler l'expression de la GnRH chez le hamster (Kawamoto et al. 2000).

Chez les téléostéens, plusieurs études ont montré l'influence de la photopériode sur l'expression de la GnRH (Amano et al. 1999; Choi et al. 2010; Fiszbein et al. 2010; Miranda et al. 2009). Par exemple, chez le pejerrey, *Odontesthes bonariensis*, une photopériode longue augmente l'expression de la GnRH alors que la température est sans effet (Miranda et al. 2009).

Ainsi, chez l'ensemble des vertébrés, des facteurs externes sont capables de modifier l'expression de la GnRH. Cependant, l'influence de ces facteurs sur l'ontogenèse des neurones à GnRH reste à déterminer.





**Figure 16 : Expression de la GFP et immunoréactivité de l'aromatase B chez le poisson zèbre transgénique *cyp19a1b*-GFP âgé de 3 jpf. Coupe transversale au niveau de l'hypophyse (x400). Hy : hypophyse, Hc : hypothalamus caudal. Echelle = 20µm**

## II. Expression de l'aromatase B au cours du développement

Dans ce travail nous avons apporté une description précise de l'expression de l'aromatase B au cours du développement du poisson zèbre. Nous avons montré que, dans les stades précoces du développement, l'expression de l'AroB dans le cerveau antérieur est restreinte à quelques fibres immunoréactives. En revanche, une expression intense de l'AroB a été mise en évidence au niveau de l'hypophyse. Nous avons montré que cette expression hypophysaire n'était pas modulée par l'exposition à un composé œstrogénique contrairement à ce qui est observé dans le cerveau. Ces données suggèrent l'existence d'une régulation différentielle de l'expression de l'AroB entre le cerveau et l'hypophyse.

De manière intéressante, nous avons récemment observé que les poissons transgéniques *cyp19alb*-GFP, qui expriment la GFP sous le contrôle d'une partie du promoteur du gène *cyp19alb* contenant notamment l'élément de réponse aux œstrogènes (ERE), ne présentent pas d'expression hypophysaire de la GFP dans les stades précoces du développement (**Figure 16**). Il n'est donc pas exclu qu'à l'instar des mammifères et des oiseaux, chez lesquels l'expression du gène unique *cyp19a1* est sous le contrôle de plusieurs promoteurs alternatifs tissu-spécifiques (Conley and Hinshelwood 2001), chez le poisson zèbre il existe un promoteur du gène *cyp19alb* spécifique des cellules hypophysaires. Des études futures seront nécessaires pour étudier cette hypothèse mais également pour déterminer la signification physiologique de cette expression hypophysaire précoce chez la larve.

## III. Le système à GnRH et l'aromatase B sont des cibles sensibles des PE

Un résultat très significatif de ce travail de thèse réside dans le fait que nous montrons clairement, et à l'occasion d'expérimentations indépendantes, que le 17 $\alpha$ -éthinyloestradiol (EE2) mais également le nonylphénol (NP) affectent l'ontogenèse des neurones à GnRH du cerveau antérieur et l'expression de l'aromatase cérébrale (AroB) au cours du développement précoce du poisson zèbre.

Il s'agit là de données originales et pertinentes par rapport à la question initialement posée dans le cadre de ce projet de thèse et du programme ANR dédié à l'étude des effets

neuroendocrines des perturbateurs endocriniens (ANR NEED). De manière intéressante, de récents travaux, menés dans le cadre de NEED, ont montré que chez la souris l'exposition in utero à l'EE2 (0,01, 0,1 ou 1 µg/kg/j) au cours de l'ontogenèse des neurones à GnRH-1 induit une augmentation concentration-dépendante du nombre de neurones à GnRH-1 (Pillon et al. soumis). Les résultats obtenus dans le modèle murin confortent ceux décrits chez le poisson zèbre exposé à l'EE2 (Article 2). Ils suggèrent que le poisson zèbre constitue un modèle de vertébré qui s'avère très utile pour poser la question des effets centraux des composés œstrogènes mimétiques chez les vertébrés supérieurs. En effet, l'étude des processus du développement du système à GnRH hypophysiotrope est extrêmement difficile à mener chez les espèces vivipares (Abraham et al. 2010). En ce sens, ces données militent pour la conduite d'expérimentations futures qui permettront de comparer les réponses biologiques dans différents modèles de vertébrés.

Au delà de la question de la transposition des données d'un modèle à un autre, nos résultats montrent que l'aromatase B et le système à GnRH constituent des cibles sensibles des xéno-œstrogènes au cours du développement du cerveau des poissons zèbres. Ainsi, l'expression de l'aromatase B est-elle induite par des concentrations très faibles d'EE2 (0.02nM  $\approx$  6 ng/l) qui sont proches des concentrations généralement relevées dans l'environnement comprises entre 0 et 15 ng/l (Cargouet et al. 2004; Desbrow et al. 1998; Ternes et al. 1999). De plus, des travaux complémentaires, menés récemment dans notre laboratoire, ont montré que l'exposition d'embryons de poissons zèbre entre 0 jpf et 3 jpf à 4 pM d'EE2 ( $\approx$  1 ng/l) est également capable d'induire l'expression de l'AroB. Ces dernières données soulignent l'extrême sensibilité de l'AroB aux xéno-œstrogènes et confirment que l'AroB est un marqueur biologique pertinent de l'exposition aux composés œstrogéniques.

En revanche, les concentrations d'EE2 (0.5nM  $\approx$  150 ng/L) et de NP (0.5 µM  $\approx$  110 µg/L) capables d'induire une augmentation du nombre de neurones à GnRH sont bien supérieures aux concentrations généralement détectées dans les milieux aquatiques. Il convient cependant de rappeler que localement d'importantes concentrations d'EE2 et de NP ont été mesurées dans les eaux de surface de certains fleuves (Sole et al. 2000; Ternes et al. 1999). De plus, de récentes études suggèrent que ces deux xéno-œstrogènes sont susceptibles de se bioaccumuler dans les organismes aquatiques (Al-Ansari et al. 2010; Soares et al. 2008).

Au-delà des concentrations utilisées dans notre étude, nous montrons que des composés d'œstrogénicité différentes sont capables d'affecter des réseaux centraux clés très tôt au cours du développement.

Etant donné le nombre important de composés chimiques capables d'agir en tant qu'agonistes sur les récepteurs des œstrogènes et leurs occurrences dans l'environnement aquatique, nos résultats soulèvent la question de leurs effets potentiels sur les populations de poissons. Ce point est d'autant plus important à soulever qu'il est aujourd'hui clairement admis que les composés œstrogènes mimétiques peuvent agir de manière additive. Ainsi, a-t-il été démontré que l'induction de la vitellogénine, une protéine hépatique œstrogène-réglée, suivait le modèle de concentration/addition dans le cas d'une exposition à une mixture binaire d'EE2 et de NP (Thorpe et al. 2001). Plus récemment, l'effet additif de stéroïdes naturels, de synthèse et de phyto-œstrogènes sur l'activation du promoteur du gène *cyp19a1b* de poisson zèbre dans les cellules gliales U251-MG a été démontré (Le Page et al. 2006). Ces données obtenues *in vitro* et *in vivo* sur l'expression de gènes ER-régulés dans différents contextes cellulaires (contexte neuroglial et hépatique) confirment qu'en raison de l'additivité des effets, des réponses œstrogéniques peuvent être induites même si les composés, considérés séparément, sont présents à des niveaux très faibles et sans effet.

Dans le contexte de notre étude, il s'agirait donc de déterminer si l'additivité des effets s'observe aussi sur l'expression *in vivo* de l'aromatase cérébrale et sur le nombre de neurones à GnRH afin d'évaluer le danger que représente les composés œstrogènes mimétiques de l'environnement sur ces cibles neuroendocrines.

#### IV. Les effets des xéno-œstrogènes sur les circuits neuroendocrines sont dépendants du stade de développement

Chez les poissons, l'inductibilité du gène *cyp19a1b* en fonction du stade de développement est démontré. Ainsi, pour des temps d'exposition égaux, les concentrations en xéno-œstrogènes nécessaires pour induire l'expression du *cyp19a1b* chez les embryons et les larves sont moins importantes comparativement aux adultes. De même, les taux d'inductions sont aussi beaucoup plus marqués lorsque les poissons sont exposés au stade embryonnaire ou larvaire comparativement aux adultes (Hinfray et al. 2006).

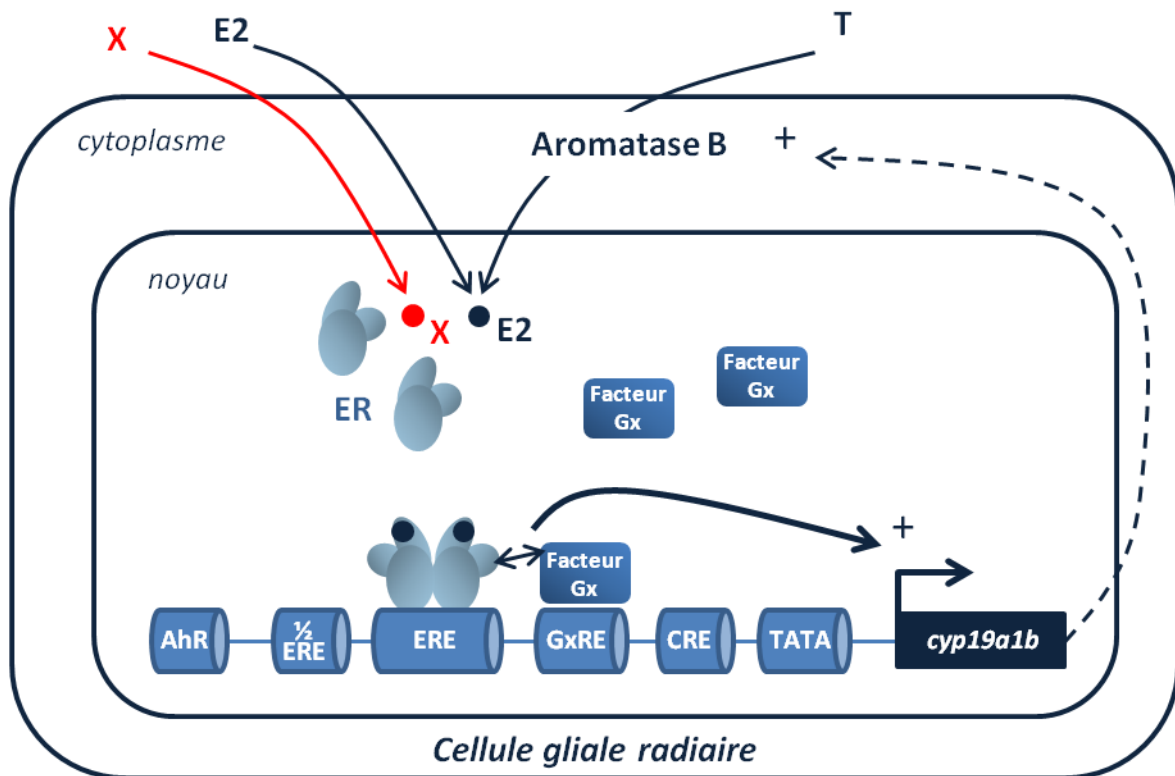
S'agissant des effets des xéno-œstrogènes sur le système GnRH chez le poisson, l'influence du stade de développement n'était pas renseignée à notre connaissance. Dans le cadre de ce travail, nous montrons que l'exposition de poissons zèbre adultes durant 7 jours à 1nM d'EE2 n'induit pas d'effet significatif sur les paramètres neuroanatomiques et morphométriques mesurés (Article 1), alors qu'une concentration de 0.5nM induit des effets significatifs sur le nombre de neurones dès 5 jours post-fécondation (Article 2 et Article 3) démontrant ainsi la plus grande sensibilité du système à GnRH chez les embryons.

De manière intéressante, l'analyse de la cinétique des effets de l'EE2 entre 5 et 20 jpf indique que l'augmentation du nombre de neurone à GnRH-ir est moins marquée à 10 jpf qu'à 5 jpf pour ne plus être significative à 20 jpf. Ces résultats démontrent qu'il existe, très tôt au cours du développement, une période particulièrement sensible durant laquelle les xéno-œstrogènes induisent précocement une augmentation du nombre de neurones à GnRH (Article 2 et Article 3). Au-delà de cette période, la sensibilité aux œstrogènes diminue s'agissant de l'augmentation du nombre de neurones. Les raisons de cette moindre sensibilité qui se traduit par une absence d'effet significatif à 20 jpf ne sont pas connues. Il est certain qu'une meilleure compréhension des mécanismes qui sous-tendent cet effet sont indispensables (voir paragraphe suivant « Mécanismes d'actions de la perturbation du système à GnRH et de l'aromatase B par les xéno-œstrogènes »). Néanmoins, nos données permettent de dire que la phase d'embryogenèse constitue une période critique du développement durant laquelle les circuits neuroendocrines étudiés présentent une sensibilité exacerbée aux xéno-œstrogènes.

## V. Mécanismes d'actions de la perturbation du système à GnRH et de l'aromatase B par les xéno-œstrogènes

Nous avons montré que la surexpression de l'AroB et l'augmentation du nombre de neurones à GnRH-ir induites par l'EE2 et le NP impliquent des récepteurs des œstrogènes (ERs) fonctionnels.

L'implication des ERs dans la régulation de l'expression de l'aromatase cérébrale par les (xéno-)œstrogènes a été démontrée chez le poisson zèbre et les mécanismes d'action moléculaires sont aujourd'hui bien caractérisés (Le Page et al. 2008; Le Page et al. 2006; Menuet et al. 2005).



**Figure 17 : Représentation schématique de la régulation du gène *cyp19a1b* par l'œstradiol dans les cellules gliales radiaires.** Adapté d'après Mouriec *et al.* (2008). AhR: site de liaison pour le récepteur aux aryl hydrocarbures ; CRE: élément de réponses à l'AMP cyclique ; ERE: élément de réponse aux œstrogènes ; GxRE: élément de réponse au facteur glial-spécifique (Gx) ; TATA : boîte TATA ; E2 : œstradiol ; T : testostérone ; X : xéno-œstrogènes.

Ils sont schématiquement résumés sur la **figure 17**. Ainsi, la régulation positive de l'expression du gène *cyp19a1b* dans les cellules gliales radiaires implique la coopération entre les ERs et un facteur spécifique des cellules gliales radiaires, le facteur Gx (non identifié à ce jour), qui se fixe sur un élément de réponse appelé GxRE situé en amont de l'élément de réponse aux œstrogènes (ERE).

En revanche, l'implication des ERs dans les effets induits par les xéno-œstrogènes sur le système à GnRH apporte un nouvel élément de compréhension de l'action de ces substances sur le système GnRH.

Qu'il s'agisse de l'aromatase B ou du système GnRH, ces résultats soulèvent des questions qu'il s'agirait de prendre en compte dans la suite de ce travail.

### **V.1 Quelle(s) sous-forme(s) des récepteurs des œstrogènes est (sont) impliquée(s) dans les effets médiés par les xéno-œstrogènes ?**

Si chez les mammifères ce sont seulement deux formes des récepteurs des œstrogènes (ER $\alpha$  et ER $\beta$ ) qui ont été caractérisées, ce sont trois formes (ER $\alpha$ , ER $\beta$ 1 et ER $\beta$ 2) qui ont été identifiées et caractérisées chez diverses espèces de téléostéens tels que le poisson rouge (Marlatt et al. 2008) et le poisson zèbre (Menuet et al. 2002). Ces récepteurs sont exprimés et régulés de manière tissu- (et sexe-) spécifique par les œstrogènes que ce soit dans le cerveau ou le foie suggérant que les sous-types des récepteurs ERs jouent des rôles différents dans la modulation de gènes œstrogène-régulés au niveau du système nerveux central et du foie des poissons (Marlatt et al. 2010; Menuet et al. 2004).

Très récemment, l'expression spatio-temporelle des zfERs a été étudiée au cours du développement précoce du poisson zèbre et montre que les trois formes des zfERs sont exprimées très tôt (Mouriec et al. 2009b). Le suivi de l'expression de l'aromatase B chez le poisson zèbre au cours de l'embryogenèse indique que cette expression est temporellement corrélée à celles des récepteurs ERs (Mouriec et al. 2009b). De manière intéressante, l'étude par hybridation *in toto* a montré que les zfER $\beta$ 1 et zfER $\beta$ 2 sont exprimés précocement dans des régions neuroendocrines, tandis que les ARNm zfER $\alpha$  ne sont pas détectés dans le cerveau avant 14 jours post-fécondation (Mouriec et al. 2009b). L'ensemble de ces données suggère que les effets de l'EE2 et du NP sur le développement des neurones à GnRH et l'expression de l'aromatase B sont médiés par les zfER $\beta$ .

Dans le contexte de la perturbation endocrinienne, la question de l'implication des sous-formes des récepteurs zfERs est importante à considérer notamment si l'on souhaite correctement appréhender le danger des molécules à l'aide de la mesure de l'induction de l'aromatase chez l'embryon de poisson (voir section VII. « Impact des PE sur l'aromatase B et le GnRH : quelles implications dans l'évaluation du risque des PE ? »).

La sélectivité de certains xéno-œstrogènes vis-à-vis des différents sous-types du récepteurs des œstrogènes humain (hER $\alpha$  et hER $\beta$ ) a été mise en évidence (e.g. Molina-Molina et al. 2008), mais peu d'informations sont disponibles pour les différentes sous-formes des ERs chez le poisson zèbre. Néanmoins, dans les cellules gliales U251-MG co-transfectées avec les trois formes des zfERs et le gène rapporteur de la luciférase sous le contrôle du promoteur du gène *cyp19a1b*, il a été démontré que les récepteurs zfER $\beta$  pouvaient être plus sensibles à certains xéno-œstrogènes comme l'EE2 comparativement aux zfER $\alpha$  (Le Page et al. 2006). A l'aide de modèles cellulaires nouvellement établis au laboratoire, la sélectivité de certains xéno-œstrogènes vis-à-vis des zfER $\beta$ s a pu être évaluée dans des lignées cellulaires ZFL (Zebrafish liver cell) de type gène rapporteur exprimant stablement les trois sous-formes du récepteurs des œstrogènes du poisson zèbre (Cosnefroy et al. in prep.). C'est le cas par exemple de l'EE2, confirmant les données de Le Page et al. (2006), et de certains dérivées de la benzophénone, utilisés en tant que filtre anti-UV. De manière très intéressante, des dérivées de la benzophénone présentant une forte affinité pour le zfER $\beta$ 2 et une faible affinité pour les zfER $\beta$ 1 et ZfER $\alpha$  ce sont avérés être particulièrement actifs pour induire l'expression *in vivo* de l'aromatase B chez le poisson zèbre, suggérant un rôle préférentiel de cette sous-forme dans la régulation de l'expression du gène *cyp19a1b* du poisson zèbre.

Dans la suite de ce travail, il conviendra par conséquent de définir plus spécifiquement la ou les sous-type(s) des zfER impliqué(s) dans les effets des xéno-œstrogènes en utilisant, par exemple, une approche d'invalidation transitoire par la méthode des morpholinos antisens.

## **V.2 Les effets des xéno-œstrogènes s'exercent-ils directement ou sont-ils indirects ?**

L'implication des récepteurs ERs dans les effets induits par les xéno-œstrogènes sur le système à GnRH soulève une question essentielle : ces effets s'exercent-ils directement sur les neurones à GnRH ou sont-ils indirects ?



Chez les mammifères, l'expression de transcrite du récepteur ER $\beta$  a été mise en évidence dans les neurones à GnRH de souris prépubères et adultes (Herbison and Pape 2001). De plus, des récepteurs membranaires, capables de médier l'action rapide des œstrogènes, ont été identifiés sur les neurones à GnRH (Abe et al. 2008; Noel et al. 2009). Ces données soutiennent une possible action directe des xéno-œstrogènes sur les neurones à GnRH. Cependant, chez les téléostéens, bien que le promoteur du gène de la *GnRH* du saumon atlantique (*Salmo salar*) contienne un élément de réponse ERE-like (Klungland et al. 1993), les ERs n'ont pas été identifiés dans les neurones à GnRH (Navas et al. 1995) suggérant une action indirecte des œstrogènes par l'intermédiaire de cellules possédant des ERs. De nombreuses études ont montré que des neurones, mais également de cellules gliales et endothéliales sont capables de transmettre l'information œstrogéniques aux neurones à GnRH (Herbison 2008; Petersen et al. 2003; Prevot 2002).

Parmi ces réseaux neuroendocrines, on peut notamment citer les neurones à NPY, les neurones GABAergiques et également les neurones dopaminergiques qui sont autant de candidats dans la médiation des effets des xéno-oestrogènes aux neurones à GnRH.

Les neurones à kisséptine (Kiss), récemment identifiés, ont également une place cruciale dans la transmission de l'information œstrogénique aux neurones à GnRH chez les mammifères (pour revue, voir Colledge 2009). Chez les téléostéens le Kiss a été identifié très récemment chez plusieurs espèces dont le poisson zèbre (Biran et al. 2008; van Aerle et al. 2008). De plus, le récepteur de Kiss, GPR54, a été identifié sur les neurones à GnRH (Parhar et al. 2004) suggérant un lien fonctionnel étroit entre les deux réseaux neuroendocrines.

Au début de cette thèse, nous avons entrepris des travaux pour caractériser le système Kiss du poisson zèbre et ses relations neuroanatomiques avec le système à GnRH par immunohistochimie. Ces travaux avaient été rendus possibles grâce un anticorps polyclonal anti-Kiss10 généré chez le lapin contre le décapeptide Kiss de souris<sup>2</sup> dont l'identité avec la séquence peptidique du Kiss du poisson zèbre atteint 90%. Seules de rares relations de proximité entre les neurones à GnRH et les neurones à Kiss ont été mises en évidence (Voir **Annexe 1**). Entre-temps, un second gène Kiss (*Kiss 2*), moins conservé que le *Kiss 1*, a été mis en évidence chez les téléostéens (Felip et al. 2009; Kitahashi et al. 2009; Lee et al. 2006). Il apparaît que le Kiss 2 est plus impliqué dans la régulation de la fonction hypophysiotrope que son homologue Kiss 1 (Felip et al. 2009). Ainsi nos travaux préliminaires n'ont pas été

---

<sup>2</sup> Anticorps anti-Kiss10 fournis généreusement par A. Caraty (INRA, Nouzilly)

poursuivis, faute d'outils adaptés. Le développement d'anticorps Kiss spécifiques du poisson zèbre, permettra d'étudier précisément les relations neuroanatomiques entre les deux systèmes Kiss et le système à GnRH-3 et ainsi d'étudier les conséquences de l'exposition à des composés œstrogènes mimétiques sur ces éventuelles relations.

### **V.3 Quels sont les mécanismes impliqués dans l'augmentation du nombre de neurones à GnRH-ir ?**

De nombreuses études *in vitro* et *in vivo*, menées chez les mammifères, ont montré que les (xéno-) œstrogènes augmentent la prolifération des cellules progénitrices neuronales mais également la différenciation neuronale (Brännvall et al. 2002; Galea 2008; Okada et al. 2008; Wang et al. 2008). De manière intéressante, une récente étude de culture *in vitro* d'explants de placode olfactive d'embryon ovin montre que l'exposition à un antagoniste œstrogénique entraîne une réduction de la prolifération des neurones à GnRH-1 (Agca et al. 2008). L'ensemble de ces données soulignent l'implication des œstrogènes dans le processus de neurogenèse. Ainsi, l'augmentation du nombre de neurones à GnRH-ir observée dans notre étude est peut être liée à un effet prolifératif des xéno-œstrogènes. Nos travaux préliminaires menés avec le marqueur de prolifération cellulaire PCNA n'ont pas permis de vérifier cette hypothèse, cependant une étude avec le marqueur de prolifération BrdU est en cours et permettra certainement d'apporter des éléments de réponse.

Par ailleurs, les œstrogènes sont également connus pour exercer des effets neuroprotecteurs (Behl 2002; Brann et al. 2007; Garcia-Segura et al. 2001). Par exemple, l'œstradiol favorise la survie neuronale (Ormerod et al. 2004) et prévient l'apoptose neuronale (Linford and Dorsa 2002). Il n'est donc pas exclu que l'augmentation du nombre de neurones à GnRH-ir que nous avons observée soit liée à un effet neuroprotecteur des xéno-œstrogènes.

Chez les poissons téléostéens, le rôle des œstrogènes dans la neurogenèse et la neuroprotection est pour le moment peu documenté. Cependant, plusieurs travaux tendent à suggérer que les œstrogènes synthétisés localement via l'aromatase B sont impliqués dans le processus de neurogenèse (Diotel et al. 2010; Mouriec et al. 2008; Pellegrini et al. 2005). De manière intéressante, l'expression de l'aromatase B, chez ces espèces, est restreinte aux cellules gliales radiaires qui sont des cellules progénitrices neuronales (Pellegrini et al. 2007). Or dans notre étude nous avons montré que l'EE2 et le NP stimulent l'expression de l'aromatase B dans les cellules gliales radiaires. De plus, chez le poisson zèbre transgénique

*cyp19a1b*-GFP nous montrons que l'exposition à l'EE2 induit la mise en place de relations de proximité entre les prolongements des cellules gliales radiaires exprimant la GFP et les neurones à GnRH-ir. L'ensemble de ces données suggèrent l'existence d'un lien entre la surexpression de l'aromatase B dans les cellules gliales radiaires et l'augmentation du nombre de neurones à GnRH observées chez les larves exposées aux xéno-œstrogènes. Des travaux supplémentaires seront nécessaires pour étudier précisément la nature de ce lien.

## VI. Conséquences fonctionnelles des effets centraux des xéno-œstrogènes

Dans le cadre de cette thèse, les conséquences de la perturbation du développement des neurones à GnRH et de l'expression de l'aromatase B sur la physiologie et la reproduction des poissons n'ont pu être abordées. Il est cependant important de déterminer les conséquences éventuelles des perturbations que nous avons pu mesurer sur la physiologie de la reproduction. Ces questions sont relativement délicates à appréhender mais essentielles si l'on souhaite pouvoir utiliser efficacement ces variables dans le cadre d'une démarche d'évaluation du risque des substances chimiques (Ankley et al. 2005).

### VI.1 Conséquences fonctionnelles de la perturbation du développement des neurones à GnRH

Le système à GnRH tient une place cruciale dans la fonction de reproduction chez les vertébrés (Voir section II. de la Synthèse Bibliographique). La perturbation de l'ontogenèse des neurones à GnRH par les xéno-œstrogènes pose donc la question des conséquences sur la physiologie reproductive des individus.

De nombreux travaux ont montré les effets délétères de l'exposition précoce à des composés œstrogènes mimétiques sur la fonction de reproduction des poissons (Brion et al. 2004; Lange et al. 2008; Nash et al. 2004; Schafers et al. 2007). Une étude menée dans notre laboratoire a montré que l'exposition précoce de poissons zèbres à de faibles concentrations d'EE2 altère le développement gonadique, la majorité des individus présentant des gonades indifférenciées (Brion et al., 2008 communication orale *SETAC*). Dans une étude similaire, il a été montré que cet arrêt du développement gonadique était réversible lorsque les poissons

étaient replacés en eau claire mais qu'il se manifestait par un retard très significatif dans l'âge de première ponte des poissons exposés à l'éthinylœstradiol comparativement aux groupes contrôles (Schafers et al. 2007). Bien que les mécanismes qui sous tendent les effets de l'EE2 puissent faire intervenir une action directe sur la gonade en modulant par exemple l'expression d'enzymes de la stéroïdogénèse gonadique (Filby et al. 2007), il n'est pas exclu que ces effets soient liés, du moins en partie, à un impact sur les circuits neuroendocrines qui régulent la fonction de reproduction, notamment le système à GnRH.

A l'heure actuelle, peu de données sont disponibles sur les conséquences de la perturbation du développement des neurones à GnRH sur la physiologie des individus. Cependant, plusieurs exemples en condition pathologiques ou expérimentales apportent des éléments de compréhension.

Chez l'Homme, le syndrome de Kallmann est associé à un défaut de migration des neurones à GnRH et se traduit par une déficience en gonadotropines ayant pour conséquence un désordre de la fonction gonadique (Schwanzel-Fukuda et al. 1989). De même, plusieurs modèles expérimentaux de souris invalidés pour des gènes impliqués dans le syndrome de Kallmann présentent des défauts de migration des neurones à GnRH aux conséquences délétères sur la fonction de reproduction (Chung and Tsai 2010; Matsumoto et al. 2006; Pitteloud et al. 2007). Par exemple, les souris invalidées pour le gène de la prokinéticine-2 présentent une hypoplasie des organes reproducteurs, un défaut de spermatogénèse ou de folliculogénèse et des taux circulants d'hormones gonadotrope réduits (Pitteloud et al. 2007).

La migration inappropriée des neurones à GnRH hypophysiotrope affecte donc sévèrement le devenir reproducteur des organismes. Ainsi, les modifications du profil de migration des neurones à GnRH observées dans notre étude suite à l'exposition à l'EE2 sont susceptibles d'avoir des conséquences délétères sur la fonction de reproduction.

Chez le poisson, peu d'études se sont intéressées aux conséquences physiologiques de la perturbation du développement des neurones à GnRH. Chez le médaka, l'inactivation transitoire du gène *Kall.2*, orthologue du gène *Kall* impliqué dans le syndrome de Kallmann, produit une perturbation de la migration des neurones à GnRH, mais compte tenu de la technique utilisée les conséquences physiologiques chez l'adulte n'ont pu être étudiées (Okubo et al. 2006). La mise en place d'inactivation totale de gènes, qui est pour le moment difficile à mener chez les poissons, permettra à l'avenir d'étudier plus précisément ces conséquences.

Chez le poisson zèbre, une étude tout à fait originale a montré que l'ablation des neurones à GnRH-3 dans la région olfactive au cours du développement précoce se traduit un développement ovocytaire anormal et une stérilité (Abraham et al. 2010). L'ablation unilatérale des neurones à GnRH-3 produit quant à elle un développement ovocytaire normal mais une réduction significative de la fécondité chez la femelle. De manière surprenante, l'ablation unilatérale des neurones à GnRH-3 induit une augmentation considérable du taux de femelle par rapport aux mâles et l'ablation totale des neurones à GnRH-3 se traduit par une population entièrement femelle de poissons (Abraham et al. 2010). Ces observations suggèrent une implication de la GnRH-3 dans le déterminisme sexuel du poisson zèbre. Ainsi, dans notre étude, l'augmentation du nombre de neurones à GnRH observée chez les larves exposées aux xéno-œstrogènes est susceptible d'avoir également des conséquences sur le déterminisme sexuel.

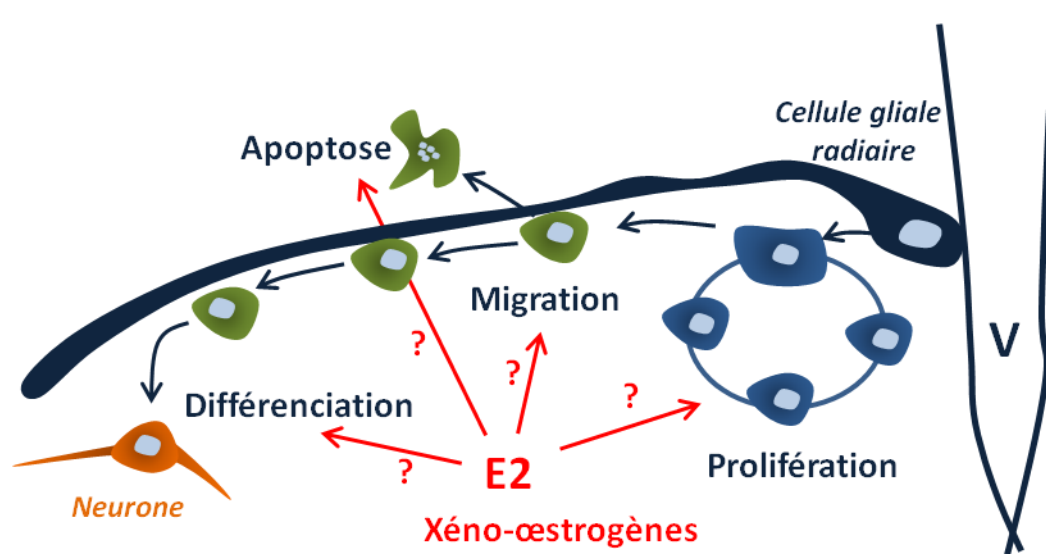
L'ensemble de ces études montrent d'une part que les xéno-œstrogènes affectent la reproduction des poissons et d'autre part que la perturbation du développement du système à GnRH a des conséquences délétères sur la physiologie reproductive des individus. Le lien qui existe entre ces deux observations reste cependant à élucider.

## **VI.2 Conséquences fonctionnelles de la perturbation de l'expression de l'aromatase B**

L'aromatase cérébrale est impliquée dans de nombreuses fonctions physiologiques telles que la différenciation sexuelle, le contrôle de la fonction de reproduction, le comportement mais également la neurogenèse (Voir section III.5 de la Synthèse Bibliographique). Les rôles de l'aromatase cérébrale sont intimement liés aux rôles des œstrogènes qu'elle produit localement. Ainsi, la perturbation de l'expression de l'aromatase cérébrale, et *in fine* la perturbation de la synthèse d'œstrogènes, est susceptible d'affecter de nombreux processus physiologiques. Cependant, le rôle de l'aromatase cérébrale et des œstrogènes au cours du développement du cerveau ne sont que peu documentés chez les téléostéens.

### Sexualisation du cerveau

Chez les mammifères et les oiseaux l'aromatase semble jouer un rôle clé dans certains mécanismes de différenciation sexuelle du cerveau (Fusani and Gahr 2006; Lephart 1996). Il est donc possible que la surexpression de l'aromatase B que nous avons mise en évidence suite à l'exposition précoce aux xéno-œstrogènes ait des conséquences sur le processus de



**Figure 18 : Représentation schématique des rôles présumés des œstrogènes dans les processus de neurogène et impact potentiel des xéno-œstrogènes.** Adapté d'après Mouriec *et al.* (2008). V : ventricule, E2 : œstradiol

sexualisation du cerveau des poissons. Cependant, chez les téléostéens l'implication de l'aromatase B dans la différenciation sexuelle cérébrale au cours du développement reste à élucider.

L'étude des niveaux d'expression cérébraux de l'aromatase B couplées à l'analyse du dimorphisme sexuel de certaines régions cérébrales impliquées dans la reproduction (*i.e.* aire préoptique) en conditions contrôle et exposées à des xéno-œstrogènes pourrait constituer une approche expérimentale intéressante pour déterminer l'implication de l'enzyme dans la sexualisation du cerveau et les conséquences d'une perturbation.

### Neurogenèse

Plusieurs études s'accordent à suggérer l'implication de l'aromatase cérébrale, et des œstrogènes localement produits, dans la neurogenèse chez les téléostéens (Diotel et al. 2010; Mouriec et al. 2008; Pellegrini et al. 2005). La **figure 18** présente schématiquement les rôles potentiels des œstrogènes synthétisés dans le cerveau les processus de neurogenèse.

Ainsi l'induction de l'expression de l'aromatase B observée dans notre étude à la suite d'expositions précoces aux xéno-œstrogènes est susceptible d'affecter la prolifération cellulaire, la migration, l'apoptose et la différenciation neuronale. Ainsi les xéno-œstrogènes en perturbant l'expression de l'aromatase B peuvent potentiellement affecter le développement de nombreux réseaux neuroendocrines. Il n'est donc pas exclu que l'augmentation du nombre de neurones à GnRH-ir observée dans notre étude chez les larves exposées à l'EE2 et au NP soit liée à la perturbation de l'expression de l'aromatase B.

Des travaux futurs s'efforceront de vérifier cette hypothèse en étudiant d'une part la prolifération des précurseurs des neurones à GnRH chez des embryons exposés aux xéno-œstrogènes et d'autre part l'effet de la modulation de l'activité de l'aromatase sur cette prolifération.

## VII. Impact des PE sur l'aromatase B et le GnRH : quelles implications dans l'évaluation du risque des PE ?

Nous venons de voir que des xéno-œstrogènes étaient capables d'affecter très tôt au cours du développement du poisson l'ontogenèse de cibles neuroendocrines impliquées dans la reproduction et le développement. Ces résultats soulèvent de nombreuses questions qui sont autant de perspectives de recherche.

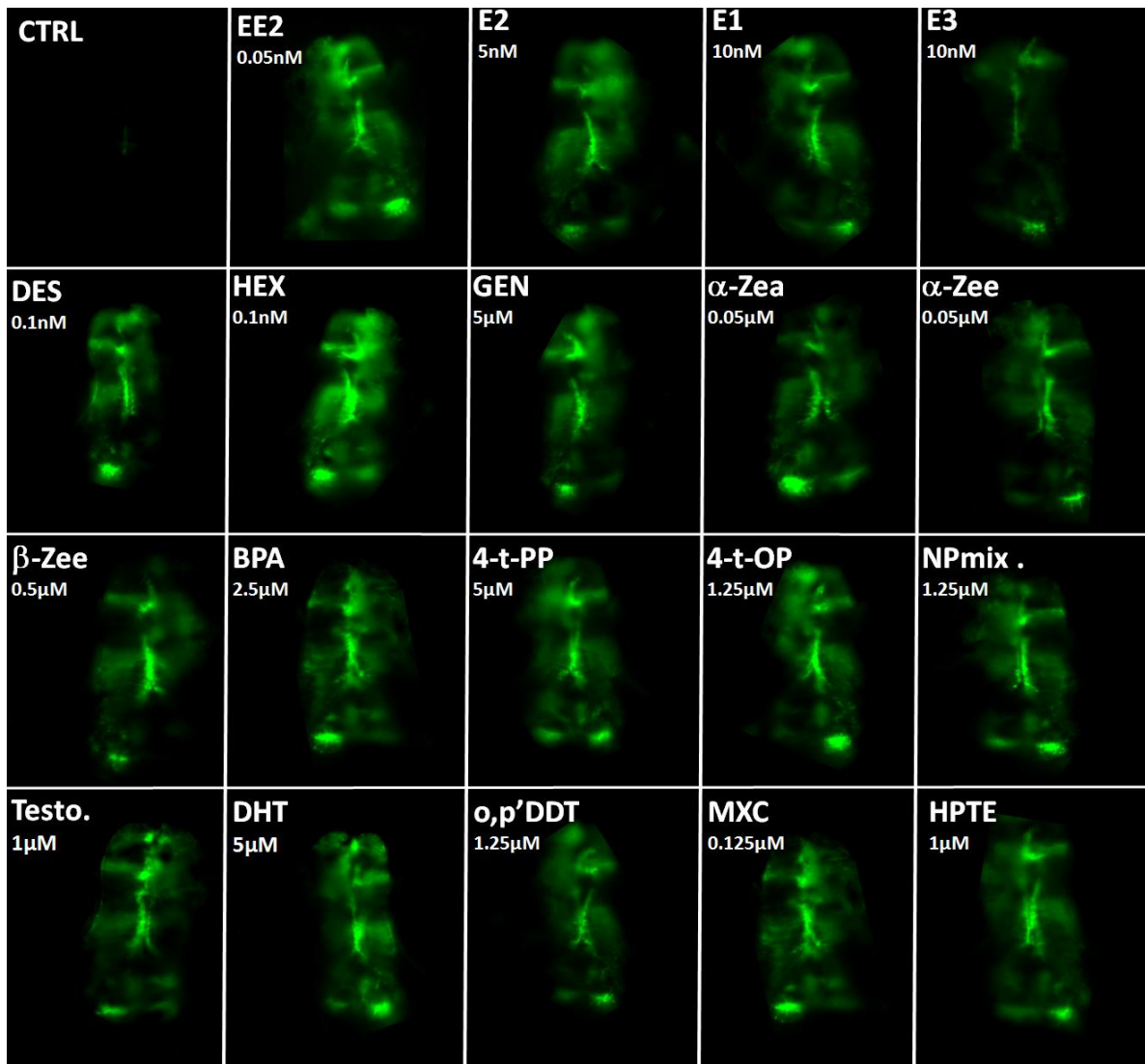
Dans cette partie, il nous a semblé intéressant de discuter la place de ces données dans le contexte de l'évaluation du danger et des risques des perturbateurs endocriniens telle qu'elle est actuellement envisagée au niveau international.

La conception actuelle de la stratégie d'évaluation des PE en toxicologie et écotoxicologie repose sur 5 niveaux (ou Tiers) dans lesquels les tests mis en jeu présentent une complexité biologique croissante depuis des tests simples, *in silico* et *in vitro*, jusqu'aux essais *in vivo* sur plusieurs générations (Knacker et al. 2010). Les tests *in vitro* et *in vivo* de screening (Tier 2 et 3) visent à apporter des informations sur le potentiel PE d'une substance chimique en se basant sur leur mode d'action vis-à-vis du système endocrinien (e.g. interaction avec les récepteurs ER, AR, effets sur la stéroïdogénèse). Chez le poisson, deux types de tests *in vivo* ont été validés ou sont en cours de validation. Il s'agit du "Fish Screening Assays" (test de screening *in vivo*, Tier 3) et du Fish Sexual Development test (test de confirmation, Tier 4) qui visent entre autre à détecter le potentiel œstrogénique des composés chimiques via la mesure de l'induction de la vitellogénine.

Ainsi, la conception des stratégies actuelles d'évaluation des risques des PE ne prend pas en compte leurs effets potentiels au niveau du système nerveux central. En effet, les tests *in vivo* chez le poisson sont lourds à mettre en œuvre, notamment en raison de la durée d'exposition et ne semblent pas appropriés au screening d'un grand nombre de substances chimiques. Il existe donc des manques qu'il s'agirait de combler, notamment en développant des tests *in vivo* adaptés au screening d'un grand nombre de molécules.

Or, nous avons montré que le système à GnRH et l'aromatase B sont des cibles neuroendocrines sensibles de PE œstrogènes mimétiques et de plus que les effets de l'EE2 et du NP sur l'ontogenèse du système à GnRH et l'expression de l'aromatase B sont spécifiques d'un mode d'action impliquant les récepteurs ER fonctionnels. Nos travaux révèlent en outre des effets précoces survenant après seulement 120 h d'exposition au stade





**Figure 19 : Effets de différents composés à activité œstrogénique sur l'expression de la GFP chez des poissons zèbres *cyp19a1b*-GFP exposés entre 0 et 5 jpf. D'après Brion *et al.* - Annexe 3 -. Tel : télencéphale, POA : aire préoptique, LH : lobe inférieur de l'hypothalamus. CTRL: contrôle DMSO , EE2: 17 $\alpha$ -éthinyloestradiol, E2: 17 $\beta$ -œstradiol, E1: estrone, E3: estriol, DES: diéthylstilbestrol, HEX: hexestrol, GEN: génistéine,  $\alpha$ -ZEA:  $\alpha$ -zéaralanol,  $\alpha$ -ZEE:  $\alpha$ -zéaralanol,  $\beta$ -ZEE:  $\beta$ -zéaralanol, BPA: bisphénol A, 4-t-PP: 4-t-pentylphénol, 4-t-OP, 4-t octylphénol, NPmix: mélange de nonylphénol, Testo: testostérone, DHT: dihydrotestostérone, o,p' DDT: 1,1,1-trichloro-2-(2-chlorophényl)-2-4-chlorophényl)ethane, MXC: méthoxychlore, HPTE 2,2-bis(p-hydroxyphényl)-1,1,1-trichloroethane.**

embryonnaire. Ainsi ces mesures chez l'embryon semblent appropriées pour développer des tests à court terme et peu encombrants pour détecter le potentiel œstrogénique de composés chimiques. Néanmoins, il faut concéder que l'analyse par immunohistochimie couplée à la microscopie constitue une approche expérimentale lourde et relativement longue. Pour pallier ces inconvénients, les modèles de poissons zèbres transgéniques exprimant la GFP peuvent constituer une alternative expérimentale intéressante.

Le modèle de poisson zèbre transgénique *cyp19a1b*-GFP, a d'ailleurs fait l'objet de récents travaux qui ont permis de développer un test biologique d'évaluation des composés œstrogéniques (Brion et al. *in prep* ; **Annexe 3**). La **figure 19** présente l'effet de différents composés sur l'expression de la GFP chez des poissons zèbres *cyp19a1b*-GFP exposés entre 0 et 5 jpf. Ce test *in vivo* présente l'avantage d'être spécifique, rapide, et très sensible. A titre d'exemple, la concentration d'EE2 la plus faible induisant un effet significatif est de 5 pM, ce qui est très proche de la concentration d'EE2 la plus faible qui est capable d'induire l'expression la protéine aromatase B dans la lignée sauvage (Article 2). Etant donné les capacités métaboliques des larves, ce test permet aussi de détecter des composés pro-œstrogéniques, c'est -à-dire nécessitant une activation métabolique préalable. C'est le cas du métoxychlore qui ne présente pas d'affinité pour le récepteur ER mais dont la métabolisation conduit à la formation de métabolites dont l'HPTE qui sont œstrogéniques.

A l'exemple du modèle transgénique *cyp19a1b*-GFP, l'utilisation d'un modèle de poisson zèbre *GnRH-3*-GFP pourrai faciliter l'évaluation des effets œstrogéniques de composés PE sur cette cible neuroendocrine. Ce modèle, décrit dans la littérature comme un outil pertinent pour l'étude de la perturbation de l'ontogenèse du système à GnRH (Abraham et al. 2009; Palevitch et al. 2007), a été récemment développé dans le laboratoire du Professeur Chung<sup>3</sup>. L'étape préalable de caractérisation et de validation de ce modèle est en cours (Kah et Le Page, communication personnelle). Il est donc envisageable de développer une approche expérimentale d'évaluation comparable à celle mise en place avec le poisson *cyp19a1b*-GFP. Cependant, il convient de noter qu'à la différence de l'aromatase B, les connaissances sur les mécanismes d'action des PE sur le système à GnRH chez le poisson au cours du développement n'ont pas acquis toute la maturité nécessaire pour entreprendre dès maintenant une démarche de validation de test basée sur ces mesures et de nombreux travaux de recherche restent à entreprendre. Dans ce contexte, l'utilisation du modèle *GnRH-3*-GFP s'avérerait particulièrement pertinente.

---

<sup>3</sup> Institut de Biologie moléculaire Academia Sinica, Taipei, Taiwan

## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

---

Les perturbateurs endocriniens sont des molécules aux modes d'actions complexes qui sont capables d'agir sur des étapes très variées de la régulation endocrine provoquant ainsi des effets délétères sur le développement et la reproduction des organismes. Jusqu'à maintenant, la plupart des études consacrées aux effets des PE sur la fonction de reproduction ce sont focalisées sur leurs effets sur les gonades et les tissus périphériques. Cependant, il apparaît que les circuits neuroendocrines impliqués dans le développement et la régulation de la fonction de reproduction sont des cibles potentielles des PE.

Dans le cadre de ce travail nous nous sommes attachés à étudier l'effet de composés œstrogènes mimétiques modèles, le 17 $\alpha$ -éthynylœstradiol et le nonylphénol, sur des circuits centraux impliqués dans le développement et la fonction de reproduction : le système à GnRH et l'aromatase B.

Notre travail s'est structuré autour d'axes complémentaires et a permis d'acquérir des résultats significatifs par rapport à la problématique générale des effets neuroendocrines des PE:

- (i) En tout premier lieu, nos travaux ont permis d'apporter des connaissances nouvelles sur le système à GnRH du poisson zèbre en réalisant une cartographie détaillée de la distribution neuroanatomique du système à GnRH mais également en apportant des données quantitatives sur ce circuit central chez le poisson adulte.
- (ii) L'analyse spatiale et temporelle des neurones à GnRH et de l'expression de l'aromatase B a permis de définir précisément l'ontogenèse des neurones à GnRH du cerveau antérieur et l'expression de l'aromatase B dans le cerveau et l'hypophyse au cours du développement précoce du poisson zèbre.
- (iii) Outre l'acquisition de connaissances précises de ces réseaux chez des poissons non contaminés, nous montrons, pour la première fois, que le 17 $\alpha$ -éthynylœstradiol et le nonylphénol affectent l'ontogenèse du système à GnRH ainsi que l'expression de l'aromatase B dans les stades précoces du développement du poisson zèbre. Il est remarquable de noter que ces effets ont été observés à des concentrations faibles et des temps d'exposition très courts.

- (iv) Enfin, nous démontrons que les effets induits par les xéno-œstrogènes sur les neurones à GnRH et l'expression de l'aromatase B sont médiés par des récepteurs des œstrogènes fonctionnels. Sur la base de ces données, il est raisonnable de penser que d'autres contaminants œstrogènes mimétiques de l'environnement aquatique sont capables d'induire des effets similaires à ceux décrits pour le 17 $\alpha$ -éthinyloestradiol et le nonylphénol.

Globalement, l'objectif que nous nous étions fixé de définir si l'exposition aux PE avait un impact sur des cibles neuroendocrines, choisies en fonction de leur implication dans le développement et la régulation de l'axe reproducteur a été atteint puisque nous montrons que les xéno-œstrogènes d'affinité variable pour les récepteurs des œstrogènes affectent des circuits centraux impliqués dans le développement et la fonction de reproduction, *i.e.* le système GnRH et l'aromatase B.

Cependant, ces résultats soulèvent d'importantes questions qui n'ont pu être abordées dans le cadre de ce travail et qui sont autant de perspectives de recherche dans le domaine de l'(éco)-toxicologie.

D'une part, il sera important de s'attacher à définir les mécanismes qui sous-tendent les effets des xéno-œstrogènes notamment sur l'ontogenèse des neurones à GnRH. Il sera ainsi nécessaire de déterminer si l'augmentation du nombre de neurones à GnRH-ir dans les stades précoces est liée à un effet prolifératif des xéno-œstrogènes et/ou à un effet neuroprotecteur.

D'autre part il s'agirait de définir précisément l'implication de la ou des sous-forme(s) des ER qui sont impliquée(s) dans les effets induits par les œstrogènes mimétiques ce qui paraît pertinent sachant la sélectivité de composés œstrogènes mimétiques pour certaines sous-formes des récepteurs ER de poisson.

Il convient aussi de rappeler que le système à GnRH est finement régulé par de nombreux réseaux neuroendocrines impliquant des neurotransmetteurs et des neuropeptides. Parmi ces facteurs régulateurs on peut notamment citer la dopamine, la sérotonine, le GABA le neuropeptide Y ou encore le Kiss. Il n'est pas du tout exclu que les effets des xéno-œstrogènes sur les neurones à GnRH observés chez le poisson zèbre soient indirectement liés à la perturbation de ces circuits régulateurs. De récentes études démontrent en effet que des composés PE tels que les polychlorobiphényles (PCB), les hydrocarbures aromatiques polycycliques ou encore des composés pharmaceutiques tels que des antidépresseurs

(fluoxétine) perturbent les circuits sérotoninergiques et/ou dopaminergiques chez le poisson (Gesto et al. 2009; Khan and Thomas 2001; Mennigen et al. 2008). De même, chez les mammifères de récents travaux ont montré que les phyto-œstrogènes affectent le développement du système Kiss (Losa et al. in press). Ainsi, la mise en place d'une approche intégrative qui inclurait l'ensemble de ces réseaux centraux permettrait de mieux appréhender les effets neuroendocrines des PE. En ce sens, l'utilisation et le développement de modèles biologiques transgéniques constituent des outils important dans cette perspective.

Enfin, les conséquences physiologiques de la perturbation du développement du système à GnRH et de l'expression de l'aromatase B par les xéno-œstrogènes, notamment sur la fonction de reproduction, n'ont pas été abordées dans le cadre de ce travail et il conviendra de travailler dans ce sens pour correctement interpréter les effets observés aux niveaux moléculaires et cellulaires en termes d'effets avérés sur la reproduction des individus.

Il faut donc constater que les champs d'investigations sont vastes ce qui souligne la nécessité d'étudier plus avant les effets neuroendocrines des perturbateurs endocriniens. Cette question est essentielle pour améliorer la compréhension de l'impact de ces composés sur la fonction de reproduction des vertébrés. Dans cette optique, le poisson apparait comme un modèle biologique pertinent pour étudier les effets neuroendocrines des PE qui constituent une problématique émergente dans le domaine de la perturbation endocrinienne.

## ANNEXES

---

# Characterization of a Kisspeptin-10 system and relationship with GnRH systems in the Zebrafish (*Danio rerio*) brain

Vosges M (1), Bou Ezz Edine F (2), Brion F (1), Lareyre JJ (3), Le Gac F (3), Caraty A (4), Kah O (2)

(1) INERIS, Evaluation des risques écotoxicologiques, Verneuil-en-Halatte, France ; (2) Université de Rennes 1, UMR CNRS 6026, IFR 140, Rennes ; (3) Sexualité et Reproduction des Poissons, INRA SCRIBE, IFR 140, Rennes, France ; (4) Physiologie et Comportements de la Reproduction, INRA, Nouzilly, France

## BACKGROUND AND OBJECTIVES

This study is part of a broader project which aim at characterizing the effect of environmental contaminants (e.g. xeno-estrogens) on neuronal circuits controlling the fish reproduction, notably the GPR54/ kisspeptin pathway and GnRH systems. The GPR54/kisspeptin pathway plays a critical role in the onset of puberty and in the control of reproductive function in mammals. Indeed, this pathway is involved in the neuroendocrine regulation of GnRH which is the key neuropeptide controlling the hypothalamus-pituitary-gonadal axis (1-4). The GPR54/kisspeptin system exists in the teleost fish as evidenced by homologous sequences as in mammals (5), e.g., the zebrafish genome holds a decapeptide with 90% of homology (YNLNSFGLRY) with the mouse Kisspeptin-10 (YWNNSFGLRY).

As a first step, the present work aimed at characterizing the neuroanatomical distribution of the kisspeptin-10 and GnRH neurons in a model fish species, the zebrafish (*Danio rerio*) and the potential interaction between these two systems using mouse kisspeptin-10 (6) and GnRH antibodies.

## METHODS

### Animals

Adult male and female zebrafish (n=10) were used for this study.

### Tissue processing

- Zebrafish brains were collected, fixed in 4% PFA and transferred successively to 10%, 20% and 30% sucrose.
- Brains were embedded in O.C.T. compound and stored at -80°C.
- 12µm transversal cryosections were done.

### Immunodetection

Single and double immunofluorescence staining were performed with the following antibodies :

#### Primary antibodies :

- Kisspeptin antibody raised against mouse Kisspeptin-10
- GnRH antibody raised against mammalian-GnRH

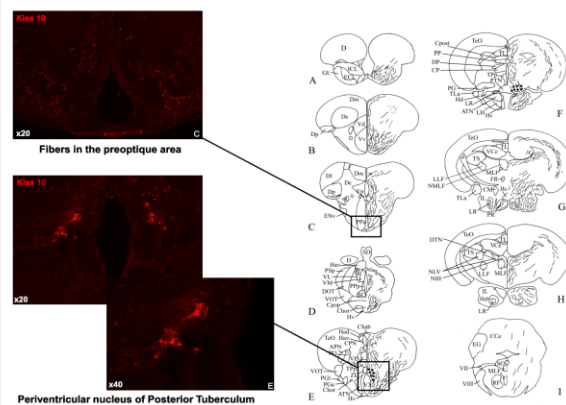
#### Secondary antibodies :

- Alexa Fluor® 488 conjugated
- Alexa Fluor® 594 conjugated

## RESULTS

### Neuroanatomical distribution of Kisspeptin-10

Fluorescent microphotographs and representatives transverse sections (7)



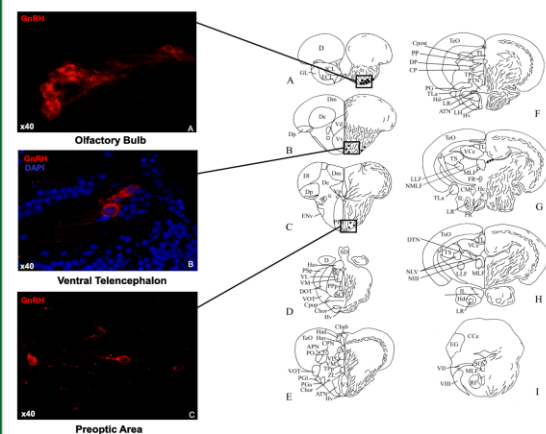
We revealed a group of Kisspeptin-10-immunopositive cells in the periventricular nucleus of posterior tuberculum (E). These cells projected varicose fibers primarily in the forebrain (C).

The specificity of the mouse kisspeptin-10 antibody was characterized :

- (1) Western blotting revealed that the antibody recognized the zebrafish kisspeptin peptide this latter being not recognized by GnRH antibody.
- (2) Preabsorption of the antiserum with the mouse kiss-10 peptide (100ng/ml) resulted in no staining in IHC.

### Neuroanatomical distribution of GnRH

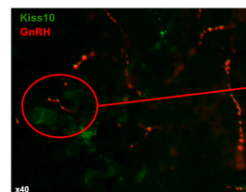
Fluorescent microphotographs and representatives transverse sections (7)



We revealed GnRH-immunopositive cells in the olfactory bulb (A), the ventral telencephalon (B) and the preoptic area (C) (salmon-GnRH neurons).

Cells bodies were also found near the telencephalic ventricle (chicken-GnRH-II). These perikarya projected many varicose fibers in the forebrain especially in the ventral telencephalon, the preoptic area and the mediobasal hypothalamus.

### Relationships : Double immunofluorescence staining



Sparses contacts between the two neuronal networks were highlighted.

Example of contacts between GnRH-immunopositive fibers (red) and Kisspeptin-10-immunopositive cells (green) in the periventricular nucleus of posterior tuberculum.

## CONCLUSIONS

In this study we described for the first time the localization of Kisspeptin-10-immunopositive structures in the zebrafish brain using a mouse kisspeptin-10 antibody. In contrast to data obtained in medaka on brain kisspeptin's mRNA distribution (8), only one group of about one hundred immunopositive cells was revealed in the periventricular nucleus of posterior tuberculum without any sex differences. We also fully characterized the neuroanatomical distribution of GnRH systems, the mapping obtained in this study using immunofluorescence experiments being in perfect agreement with these described in this species by means of *in situ* hybridization (9). Further, we revealed very few contacts between GnRH-immunopositive fibers and kisspeptin perikarya suggesting the existence of interaction between these two neuronal networks but additional double immunostaining experiments are needed to confirm these preliminary observations.

## REFERENCES

- 1 - Clarkson, J., and Herbison, A.E. 2008; Endocrinology 147, 5817-5825.
- 2 - Navarro, 2004. Endocrinology 145, 4565-4574.
- 3 - Gottsch, M.L. et al. 2004; Endocrinology 145, 4073-4077.
- 4 - Messager, S. et al. 2005; Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102, 1761-1766.
- 5 - van Aerle R. et al. 2008; Peptides, 29, 57-64.
- 6 - Franceschini I. et al. 2006; Neuroscience Letters 401, 225-230.
- 7 - Wullmann M.F. et al. 1996; Neuroanatomy of the Zebrafish Brain.
- 8 - Kanda S. et al. 2008; Endocrinology 149, 2467-2476.
- 9 - Steven C. 2003; General and Comparative Endocrinology 133, 27-37.



# 17 $\alpha$ -ethinylestradiol disrupts the ontogeny of the forebrain GnRH system and the expression of brain aromatase during early development of zebrafish

Mélanie Vosges<sup>1</sup>, Nathalie Hinfray<sup>1</sup>, Yann Le Page<sup>2</sup>, Anne Cosnefroy<sup>1</sup>, Benjamin Piccini<sup>1</sup>, Turies Cyril<sup>1</sup>, Jean-Marc Porcher<sup>1</sup>, Olivier Kah<sup>2</sup>, François Brion<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INERIS, Unité d'Ecotoxicologie, Verneuil-en-Halatte, <sup>2</sup>UMR CNRS 6026, Université de Rennes 1, Rennes.

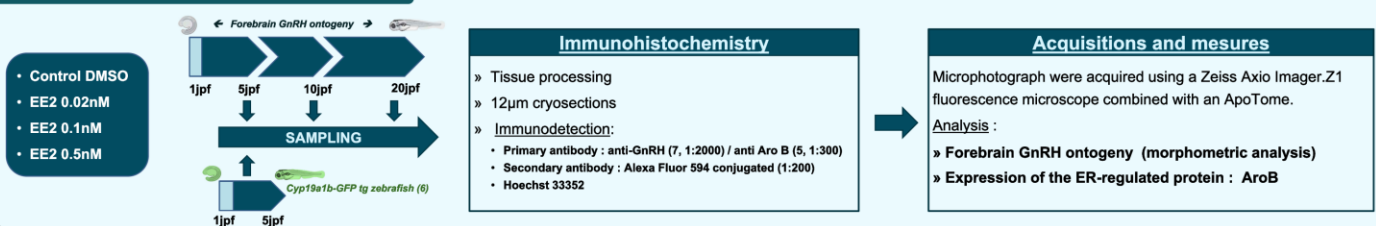
[melanie.vosges@ineris.fr](mailto:melanie.vosges@ineris.fr)

## Background and Objectives

In fish, as in any other vertebrates, **Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH)** is the key neuroendocrine factor controlling the activity of the reproductive axis (1-2). The development and functioning of the GnRH neurons are finely tuned by a series of factors (3-4), notably sex steroids, making these neurons potential targets of endocrine disruptors compounds (EDCs). However, very few studies addressed this issue especially in fish species.

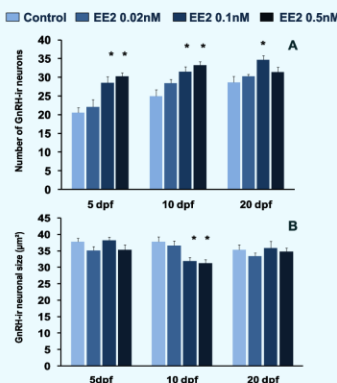
In the present work we explore the potential effects of **17 $\alpha$ -ethinylestradiol (EE2)**, a potent xeno-estrogen know to contaminate the aquatic environment, on **early development of the GnRH neurons** in zebrafish embryos. In addition, we monitored the effects of EE2 on the expression of cytochrome P450 **Aromatase B (AroB)** protein, the product of the *cyp19a1b* gene, encoding a brain form of aromatase in fish and which is strongly regulated by estrogen (5).

## Methods

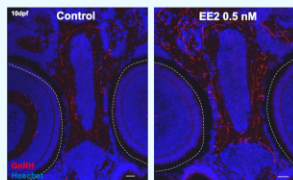


## Results

### EE2 disrupts the ontogeny of forebrain GnRH neurons in early life stages



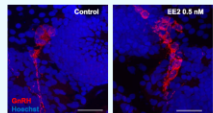
**Fig 1:** Effect of EE2 exposure on GnRH-ir cell number (A), and size (B) in zebrafish larvae. Mean  $\pm$  SD; \*  $P < 0.05$  compare with control group;  $n = 10$ .



**Fig 3:** Microphotographs of 10 dpf zebrafish larvae control and exposed to EE2 - Effect on GnRH fibers immunoreactivity - Bar : 20µm

#### Increase in number of GnRH-ir neurons

At 5 dpf and 10 dpf the number GnRH-ir neurons significantly increase in EE2 groups at 0.1nM and 0.5 nM suggesting a proliferative effect of EE2 on GnRH neurons.



**Fig 2:** Microphotographs of 10dpf zebrafish control and exposed to 0.5nM of EE2 -Effect of EE2 on the number of GnRH-ir neurons - Bar : 20µm

#### Reduction of GnRH-ir neurons size

At 10 dpf a significant reduction of GnRH-ir neurons size was observed in EE2- treated groups at 0.1nM and 0.5nM.

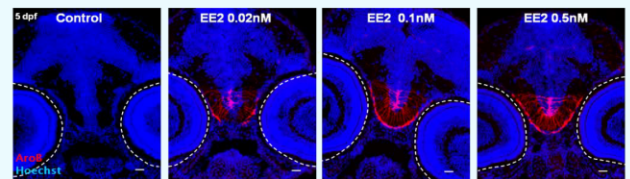
#### Increase of GnRH fibers immunoreactivity

At 5 and 10 dpf an increase of GnRH fibers immunoreactivity was observed in EE2-exposed groups (0.1 and 0.5 nM).

#### Disorders of GnRH-ir neurons migration

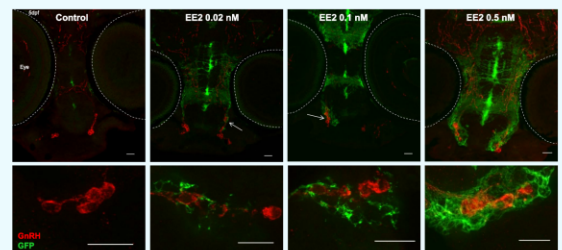
In EE2-exposed groups differences in the spatial distribution of GnRH-ir neurons were observed on adjacent brain sections compared with control group.

### EE2 induce a dose-dependent expression of AroB in radial glial cells



**Fig 4:** Microphotographs of zebrafish larvae control and exposed to EE2 - Effect of EE2on Aromatase B expression in the ventral hypothalamus - Bar : 20µm

### EE2 induce physical interactions between GnRH-ir neurons and Aromatase B expressing cells



**Fig 5:** Microphotographs of *cyp19a1b*-GFP transgenic zebrafish larvae control and exposed to EE2 - Effect on relationship between GnRH neurons and radial glial cells expressing cells AroB - Bar : 20µm

## Conclusions

In summary, we demonstrate for the first time that ontogeny of forebrain GnRH neurons can be affected by low concentrations of EE2 during the development of the zebrafish. We also show the dramatic dose-dependent effect of EE2 on AroB expression in radial glial cells of the developing brain. Furthermore, our study documents for the first time the existence of physical interactions between these GnRH and AroB-positive structures following EE2 exposure, strongly suggesting functional links between GnRH neurons and radial glial cells expressing AroB.

## References

- Kah et al. 2007; *Gen Comp Endocrinol.* 153: 346-364.
- Zohar et al. 2009; *Gen Comp Endocrinol.* 165: 438-55.
- Ando and Urano et al. 2005; *Zoolog Sci* 22(4): 379-89.
- Tobet et al. 2006; *Endocrinology* 147(3): 1159-65.
- Menuet et al. 2005; *J Comp Neurol.* 485(4):304-20.
- Tong et al. 2009; *Genesis.* 47: 67-73.
- Breton et al. 1986; *Gen Comp Endocrinol* 61(1): 109-19.

## Acknowledgment



# A novel *in vivo* assay to assess the estrogenic activity of chemical substances using transgenic *cyp19a1b*-GFP zebrafish embryos

François Brion<sup>1</sup>, Benjamin Piccini<sup>1</sup>, Yann Le Page<sup>2</sup>, Sok-Keng Tong<sup>3</sup>, Sélim Ait-Aïssa, Jean-Marc Porcher<sup>1</sup>, Mélanie Vosges<sup>1</sup>, Bon-Chu Chung<sup>3</sup>, Olivier Kah<sup>2</sup>.

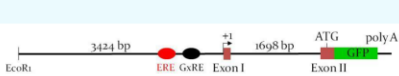
<sup>1</sup>INERIS, Unité d'Ecotoxicologie, Verneuil-en-Halatte, <sup>2</sup>UMR CNRS 6026, Université de Rennes 1, Rennes, <sup>3</sup> Institute of Molecular Biology, Taiwan. francois.brion@ineris.fr

## Background and Objectives

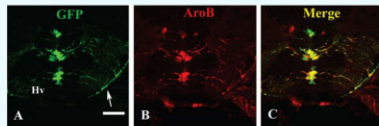
Concern about the effects of Endocrine Disrupting Chemicals (EDCs) to fish (and humans) reproductive health has stimulated the development and implementation of screening and testing procedures for EDCs. In this regards, the development of tests to identify endocrine active substances and quantify their effects in fish has become a challenge these years (1). However, there is still a need to develop rapid and cost-effective fish *in vivo* screening assays. In light of this context, our objective was to develop an *in vivo* assay based on the use of a transgenic zebrafish that expresses Green Fluorescent Protein (GFP) under the control of the *cyp19a1b* promoter (2). The *cyp19a1b* gene encodes for the brain aromatase B that is strongly expressed in the radial glial cells and is very sensitive to estrogens, through a mechanism that involves functional ERs and a well conserved ERE (3-5).

## Methods

### The *cyp19a1b*-GFP transgenic zebrafish model

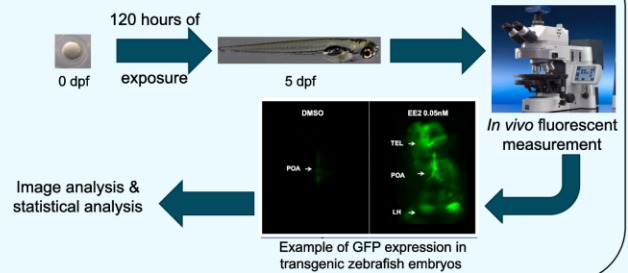


GFP expression is controlled by 3.4kb of the *cyp19a1b* proximal promoter followed by the first exon, the first intron and the beginning of the second exon comprising the ATG (4). Estrogen Responsive Element (ERE), Glial X response Element (GxRE).



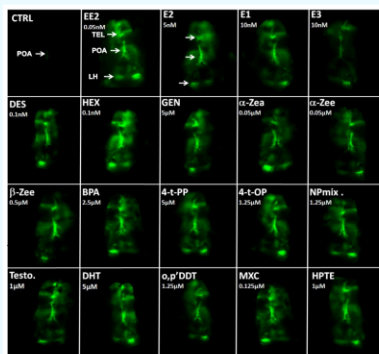
Immunohistochemistry demonstrates the perfect co-expression of GFP with the endogenous brain cytochrome P450 AroB (2).

### *In vivo* bio-assay on *cyp19a1b*-GFP zebrafish embryos



## Results

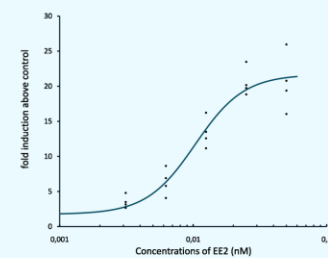
### The *cyp19a1b*-GFP embryos responds to several environmental ER ligands



**Fig 1:** Effects of various ER ligands on GFP expression in transgenic zebrafish embryos. Telencephalon (Tel), preoptic area (POA), and the inferior lobe of the hypothalamus(LH). Dorsal views with anterior to the top.

CTRL: solvent control, EE2: 17 $\alpha$ -ethinylestradiol, E2: 17 $\beta$ -estradiol, E1: estrone, E3: estriol, DES: diethylstilbestrol, HEX: hexestrol, GEN: genistein,  $\alpha$ -ZEE:  $\alpha$ -zearalanol,  $\alpha$ -ZEE:  $\alpha$ -zearalanol,  $\beta$ -ZEE:  $\beta$ -zearalanol, BPA: bisphenol A, 4-t-PP: 4-t-pentylphenol, 4-t-OP, 4-t octylphenol, NPmix: mixture of nonylphenol, Testo: testosterone, DHT: dihydrotestosterone, MXC: methoxychlor, HPTE 2,2-bis(p-hydroxyphenyl)-1,1,1-trichloroethane

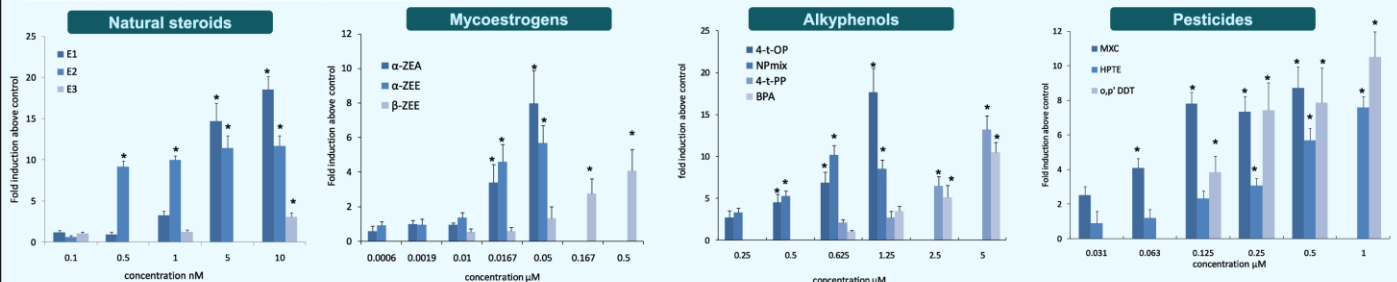
### The *cyp19a1b* transgenic zebrafish model is highly sensitive to xeno-estrogens



**Fig 2:** GFP induction in transgenic embryos exposed for 120 hours to increasing concentrations of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol. The effective concentration EC<sub>50</sub> is 0.013nM 0.004 (CV inter-assay = 35%). The lowest observed effect concentration (LOEC) is equal to 5pM.

Each point is a mean of n=10 individus, N=4 independent experiments

### The *cyp19a1b*-GFP zebrafish embryo assay allow to quantify the estrogenic activity of compounds from different chemical classes



**Fig 3:** GFP induction in transgenic embryos exposed to various environmental ER ligands. GFP inductions observed with the pesticide MXC demonstrate that the biological model biotransform the parent compound into biologically active estrogenic metabolites, probably including HPTE (mean SEM, N=2-3 independent experiments, \* P < 0.05 compare with control group).

## Conclusions

Our study demonstrates that the *cyp19a1b* transgenic zebrafish is a reliable, rapid and highly sensitive *in vivo* model to detect and to quantify estrogenic activity of EDCs. Therefore, the tg(*cyp19a1b*-GFP) embryos assay could be proposed as a future *in vivo* screening assay for hazard and risk assessment of chemical substances. In addition, we show that several environmental xeno-estrogens can affect a key neuro-endocrine target involved in reproduction and brain development of vertebrates, which raises further concerns about their effects at the central level (6).

## References

- Hotchkiss et al., *Tox. Sciences*, 2008
- Le Page et al., *Environ Health Perspect.* 2006.
- Tong et al., *Genesis*, 2009
- Le Page et al., *Mol Reprod Dev.* 2008
- Menuet et al., *J Comp Neurol.* 2005..
- Vosges et al., *Aquatic Toxicol.*, 2010.

## Acknowledgment



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Abe H, Keen KL, Terasawa E. 2008. Rapid Action of Estrogens on Intracellular Calcium Oscillations in Primate Luteinizing Hormone-Releasing Hormone-1 Neurons. *Endocrinology* 149(3):1155-1162.
- Abraham E, Palevitch O, Gothilf Y, Zohar Y. 2009. The zebrafish as a model system for forebrain GnRH neuronal development. *Gen Comp Endocrinol* 164(2-3):151-60.
- Abraham E, Palevitch O, Gothilf Y, Zohar Y. 2010. Targeted Gonadotropin-Releasing Hormone-3 Neuron Ablation in Zebrafish: Effects on Neurogenesis, Neuronal Migration, and Reproduction. *Endocrinology* 151(1):332-340.
- Abraham E, Palevitch O, Ijiri S, Du SJ, Gothilf Y, Zohar Y. 2008. Early Development of Forebrain Gonadotrophin-Releasing Hormone (GnRH) Neurones and the Role of GnRH as an Autocrine Migration Factor. *J Neuroendocrinol* 20(3):394-405.
- Adolf B, Chapouton P, Lam CS, Topp S, Tannhäuser B, Strähle U, Götz M, Bally-Cuif L. 2006b. Conserved and acquired features of adult neurogenesis in the zebrafish telencephalon. *Developmental Biology* 295(1):278-293.
- Agca E, Batailler M, Tillet Y, Chemineau P, Duittoz AH. 2008. Modulation of estrogen receptors during development inhibits neurogenesis of precursors to GnRH-1 neurones: in vitro studies with explants of ovine olfactory placode. *Brain Res* 1223:34-41.
- Ahel M, McEvoy J, Giger W. 1993. Bioaccumulation of the lipophilic metabolites of nonionic surfactants in fresh-water organisms. *Environmental Pollution* 79(3):243-248.
- Al-Ansari AM, Saleem A, Kimpe LE, Sherry JP, McMaster ME, Trudeau VL, Blais JM. 2010. Bioaccumulation of the pharmaceutical 17 alpha-ethinylestradiol in shorthead redhorse suckers (*Moxostoma macrolepidotum*) from the St. Clair River, Canada. *Environmental Pollution* 158(8):2566-2571.
- Altman J, Das GD. 1965. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124(3):319-35.
- Alvarez-Buylla A, Buskirk DR, Nottebohm F. 1987. Monoclonal antibody reveals radial glia in adult avian brain. *J Comp Neurol* 264(2):159-70.
- Alvarez-Buylla A, Theelen M, Nottebohm F. 1990. Proliferation "hot spots" in adult avian ventricular zone reveal radial cell division. *Neuron* 5(1):101-109.
- Amano M, Hyodo S, Urano A, Okumoto N, Kitamura S, Ikuta K, Suzuki Y, Aida K. 1994. Activation of salmon gonadotropin-releasing hormone synthesis by 17 alpha-methyltestosterone administration in yearling masu salmon, *Oncorhynchus masou*. *Gen Comp Endocrinol* 95(3):374-80.
- Amano M, Ikuta K, Kitamura S, Aida K. 1999. Effects of Photoperiod on Salmon GnRH mRNA Levels in Brain of Castrated Underyearling Precocious Male Masu Salmon. *Gen Comp Endocrinol* 115(1):70-75.
- Amano M, Oka Y, Aida K, Okumoto N, Kawashima S, Hasegawa Y. 1991. Immunocytochemical demonstration of salmon GnRH and chicken GnRH-II in the brain of masu salmon, *Oncorhynchus masou*. *J Comp Neurol* 314(3):587-97.

- Amano M, Oka Y, Kitamura S, Ikuta K, Aida K. 1998. Ontogenic development of salmon GnRH and chicken GnRH-II systems in the brain of masu salmon, *Oncorhynchus masou*. *Cell Tissue Res* 293(3):427-434.
- Amoss M, Burgus R, Blackwell R, Vale W, Fellows R, Guillemin R. 1971. Purification, amino acid composition and N-terminus of the hypothalamic luteinizing hormone releasing factor (LRF) of ovine origin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 44(1):205-210.
- Andersen L, Bjerregaard P, Korsgaard B. 2003. Vitellogenin induction and brain aromatase activity in adult male and female zebrafish exposed to endocrine disrupters. *Fish Physiology and Biochemistry* 28(1):319-321.
- Andersson T, Förlin L, Härdig J, Larsson Å. 1988. Biochemical and physiological disturbances in fish inhabiting coastal waters polluted with bleached kraft mill effluents. *Marine Environmental Research* 24(1-4):233-236.
- Ankley GT, Black MC, Garric J, Hutchinson TH, Iguchi T. 2005. A framework for assessing the hazard of pharmaceutical materials to aquatic species. In: Williams RT, editor. *Human Pharmaceuticals: Assessing the Impacts on Aquatic Ecosystems*. Pensacola: Setac Press. p 183-237.
- Ankley GT, Jensen KM, Kahl MD, Korte JJ, Makynen EA. 2001. Description and evaluation of a short-term reproduction test with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 20(6):1276-1290.
- Ankley GT, Kahl MD, Jensen KM, Hornung MW, Korte JJ, Makynen EA, Leino RL. 2002. Evaluation of the Aromatase Inhibitor Fadrozole in a Short-Term Reproduction Assay with the Fathead Minnow (*Pimephales promelas*). *Toxicological Sciences* 67(1):121-130.
- Antonopoulou E, Swanson P, Borg B. 2009. Effects of aromatase inhibitors and different doses of testosterone on gonadotropins in one year old male Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 153(4):408-16.
- Bakker J, Honda S, Harada N, Balthazart J. 2004. Restoration of male sexual behavior by adult exogenous estrogens in male aromatase knockout mice. *Hormones and Behavior* 46(1):1-10.
- Balthazart J, Adkins-Regan E. 2002. Sexual Differentiation of Brain and Behavior in Birds. In: Pfaff Donald W, Arnold Arthur P, Fahrbach Susan E, Etgen Anne M, Rubin Robert T, editors. *Hormones, Brain and Behavior*. San Diego: Academic Press. p 223-301.
- Balthazart J, Baillien M, Cornil CA, Ball GF. 2004. Preoptic aromatase modulates male sexual behavior: slow and fast mechanisms of action. *Physiology & Behavior* 83(2):247-270.
- Balthazart J, Ball GF. 1998. New insights into the regulation and function of brain estrogen synthase (aromatase). *Trends Neurosci* 21(6):243-9.
- Balthazart J, Cornil CA, Charlier TD, Taziaux M, Ball GF. 2009. Estradiol, a key endocrine signal in the sexual differentiation and activation of reproductive behavior in quail. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology* 311A(5):323-345.



- Barney ML, Patil JG, Gunasekera RM, Carter CG. 2008. Distinct cytochrome P450 aromatase isoforms in the common carp (*Cyprinus carpio*): sexual dimorphism and onset of ontogenic expression. *Gen Comp Endocrinol* 156(3):499-508.
- Bateman HL, Patisaul HB. 2008. Disrupted female reproductive physiology following neonatal exposure to phytoestrogens or estrogen specific ligands is associated with decreased GnRH activation and kisspeptin fiber density in the hypothalamus. *NeuroToxicology* 29(6):988-997.
- Bayley M, Junge M, Baatrup E. 2002. Exposure of juvenile guppies to three antiandrogens causes demasculinization and a reduced sperm count in adult males. *Aquatic Toxicology* 56(4):227-239.
- Behl C. 2002. Oestrogen as a neuroprotective hormone. *Nat Rev Neurosci* 3(6):433-442.
- Bellingham M, Fowler PA, Amezaga MR, Whitelaw CM, Rhind SM, Cotinot C, Mandon-Pepin B, Sharpe RM, Evans NP. 2010. Foetal Hypothalamic and Pituitary Expression of Gonadotrophin-Releasing Hormone and Galanin Systems is Disturbed by Exposure to Sewage Sludge Chemicals via Maternal Ingestion. *J Neuroendocrinol* 22(6):527-533.
- Bentivoglio M, Mazzarello P. 1999. The history of radial glia. *Brain Res Bull* 49(5):305-15.
- Bernard DJ, Abuav-Nussbaum R, Horton TH, Turek FW. 1999. Photoperiodic effects on gonadotropin-releasing hormone (GnRH) content and the GnRH-immunoreactive neuronal system of male Siberian hamsters. *Biol Reprod* 60(2):272-6.
- Biran J, Ben-Dor S, Levavi-Sivan B. 2008. Molecular Identification and Functional Characterization of the Kisspeptin/Kisspeptin Receptor System in Lower Vertebrates. *Biol Reprod* 79(4):776-786.
- Bisenius ES, Veeramachaneni DNR, Sammonds GE, Tobet S. 2006. Sex Differences and the Development of the Rabbit Brain: Effects of Vinclozolin. *Biol Reprod* 75(3):469-476.
- Blazquez M, Piferrer F. 2004. Cloning, sequence analysis, tissue distribution, and sex-specific expression of the neural form of P450 aromatase in juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Mol Cell Endocrinol* 219(1-2):83-94.
- Bogerd J, Diepenbroek WB, Hund E, van Oosterhout F, Teves AC, Leurs R, Blomenrohr M. 2002. Two gonadotropin-releasing hormone receptors in the African catfish: no differences in ligand selectivity, but differences in tissue distribution. *Endocrinology* 143(12):4673-82.
- Bourguignon J-P, Rasier G, Lebrethon M-C, Gérard A, Naveau E, Parent A-S. 2010. Neuroendocrine disruption of pubertal timing and interactions between homeostasis of reproduction and energy balance. *Mol Cell Endocrinol* 324(1-2):110-120.
- Bowe J, Li XF, Sugden D, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS, O'Byrne KT. 2003. The Effects of the Phytoestrogen, Coumestrol, on Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) mRNA Expression in GT1-7 GnRH Neurons. *J Neuroendocrinol* 15(2):105-108.
- Brann DW, Dhandapani K, Wakade C, Mahesh VB, Khan MM. 2007. Neurotrophic and neuroprotective actions of estrogen: Basic mechanisms and clinical implications. *Steroids* 72(5):381-405.

- Brännvall K, Korhonen L, Lindholm D. 2002. Estrogen-Receptor-Dependent Regulation of Neural Stem Cell Proliferation and Differentiation. *Molecular and Cellular Neuroscience* 21(3):512-520.
- Breton B, Mikolajczyk T, Danger J-M, Gonnet F, Saint-Pierre S, Vaudry H. 1989. Neuropeptide Y (NPY) modulates in vitro gonadotropin in release from rainbow trout pituitary glands. *Fish Physiology and Biochemistry* 7(1):77-83.
- Breton B, Motin A, Billard R, Kah O, Geoffre S, Precigoux G. 1986. Immunoreactive gonadotropin-releasing hormone-like material in the brain and the pituitary gland during the periovulatory period in the brown trout (*Salmo trutta* L.): relationships with the plasma and pituitary gonadotropin. *Gen Comp Endocrinol* 61(1):109-19.
- Breton B, Sambroni E. 1996. Steroid activation of the brain-pituitary complex gonadotropic function in the triploid rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Gen Comp Endocrinol* 101(2):155-64.
- Brion F, Tyler CR, Palazzi X, Laillet B, Porcher JM, Garric J, Flammarion P. 2004. Impacts of 17[beta]-estradiol, including environmentally relevant concentrations, on reproduction after exposure during embryo-larval-, juvenile- and adult-life stages in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology* 68(3):193-217.
- Bryan GW, Gibbs PE. 1991. Impact of low concentrations of tributyltin (previous term TBT) next term on marine organisms: A review.: *Metal Ecotoxicology: Concepts and Applications* Lewis Publishers Inc. pp. 323-361 p.
- Bulun SE, Sebastian S, Takayama K, Suzuki T, Sasano H, Shozu M. 2003. The human CYP19 (aromatase P450) gene: update on physiologic roles and genomic organization of promoters. *J Steroid Biochem Mol Biol* 86(3-5):219-24.
- Callard GV, Tchoudakova A. 1997. Evolutionary and functional significance of two CYP19 genes differentially expressed in brain and ovary of goldfish. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 61(3-6):387-392.
- Cargouet M, Perdiz D, Mouatassim-Souali A, Tamisier-Karolak S, Levi Y. 2004. Assessment of river contamination by estrogenic compounds in Paris area (France). *Sci Total Environ* 324(1-3):55-66.
- Cariboni A, Maggi R, Parnavelas JG. 2007. From nose to fertility: the long migratory journey of gonadotropin-releasing hormone neurons. *Trends in Neurosciences* 30(12):638-644.
- Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE. 1992. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ* 305(6854):609-13.
- Cavaco JE, Bogerd J, Goos H, Schulz RW. 2001. Testosterone inhibits 11-ketotestosterone-induced spermatogenesis in African catfish (*Clarias gariepinus*). *Biol Reprod* 65(6):1807-12.
- Chang JP, Van Goor F, Acharya S. 1991. Influences of norepinephrine, and adrenergic agonists and antagonists on gonadotropin secretion from dispersed pituitary cells of goldfish, *Carassius auratus*. *Neuroendocrinology* 54(3):202-10.
- Chang X, Kobayashi T, Senthilkumaran B, Kobayashi-Kajura H, Sudhakumari CC, Nagahama Y. 2005. Two types of aromatase with different encoding genes, tissue distribution and developmental expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *General and Comparative Endocrinology* 141(2):101-115.

- Cheshenko K, Brion F, Le Page Y, Hinfrey N, Pakdel F, Kah O, Segner H, Eggen RIL. 2007. Expression of Zebra Fish Aromatase *cyp19a* and *cyp19b* Genes in Response to the Ligands of Estrogen Receptor and Aryl Hydrocarbon Receptor. *Toxicological Sciences* 96(2):255-267.
- Cheshenko K, Pakdel F, Segner H, Kah O, Eggen RI. 2008. Interference of endocrine disrupting chemicals with aromatase CYP19 expression or activity, and consequences for reproduction of teleost fish. *Gen Comp Endocrinol* 155(1):31-62.
- Chiang EF, Yan YL, Guiguen Y, Postlethwait J, Chung B. 2001a. Two *Cyp19* (P450 aromatase) genes on duplicated zebrafish chromosomes are expressed in ovary or brain. *Mol Biol Evol* 18(4):542-50.
- Chiang EFL, Yan YL, Tong SK, Hsiao PH, Guiguen Y, Postlethwait J, Chung BC. 2001b. Characterization of duplicated zebrafish *cyp19* genes. *Journal of Experimental Zoology* 290(7):709-714.
- Chiba A, Oka S, Honma Y. 1994. Ontogenetic development of gonadotropin-releasing hormone-like immunoreactive neurons in the brain of the chum salmon, *Oncorhynchus keta*. *Neuroscience Letters* 178(1):51-54.
- Choi JY, Park JG, Jeong HB, Lee YD, Takemura A, Kim SJ. 2005. Molecular cloning of cytochrome P450 aromatases in the protogynous wrasse, *Halichoeres tenuispinis*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 141(1):49-59.
- Choi S, Lee CH, Park W, Kim D-J, Sohn YC. 2010. Effects of Shortened Photoperiod on Gonadotropin-Releasing Hormone, Gonadotropin, and Vitellogenin Gene Expression Associated with Ovarian Maturation in Rainbow Trout. *Zoological Science* 27(1):24-32.
- Chung WCJ, Tsai PS. 2010. Role of Fibroblast Growth Factor Signaling in Gonadotropin-Releasing Hormone Neuronal System Development. *Kallmann Syndrome and Hypogonadotropic Hypogonadism*. *Front Horm Res Basel: Karger*. (39):37-50.
- Clements RJ, Lawrence RC, Blank JL. 2009. Effects of intrauterine 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on the development and function of the gonadotrophin releasing hormone neuronal system in the male rat. *Reproductive Toxicology* 28(1):38-45.
- Colborn T, Clement C. 1992. Chemically-induced alterations in sexual and functional development-- the wildlife/human connection Colborn T CC, eds, editor: by Princeton Scientific Pub. Co.
- Colledge WH. 2009. Kisspeptins and GnRH neuronal signalling. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 20(3):115-121.
- Conley A, Corbin J, Smith T, Hinshelwood M, Liu Z, Simpson E. 1997. Porcine aromatases: studies on tissue-specific, functionally distinct isozymes from a single gene? *J Steroid Biochem Mol Biol* 61(3-6):407-13.
- Conley A, Hinshelwood M. 2001. Mammalian aromatases. *Reproduction* 121(5):685-95.
- Contractor R, Foran C, Li S, Willett K. 2004. Evidence of Gender-and Tissue-Specific Promoter Methylation and the Potential for Ethinylestradiol-Induced changes in Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Estrogen Receptor and Aromatase Genes. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A* 67:1-22.



- Cosnefroy A, Brion F, Guillet B, Laville N, Porcher JM, Balaguer P, Aït-Aïssa S. 2009. A stable fish reporter cell line to study estrogen receptor transactivation by environmental (xeno)estrogens. *Toxicology in Vitro* 23(8):1450-1454.
- Cosnefroy A, Brion F, Maillot-Maréchal E, Porcher J, Balaguer P, Aït-Aïssa S. in prep. Development of fish in vitro reporter gene models using zebrafish estrogen receptors in a zebrafish cell line.
- Dachs J, Van Ry DA, Eisenreich SJ. 1999. Occurrence of estrogenic nonylphenols in the urban and coastal atmosphere of the lower Hudson River estuary. *Environmental Science & Technology* 33(15):2676-2679.
- De Leeuw R, Habibi HR, Nahorniak CS, Peter RE. 1989. Dopaminergic regulation of pituitary gonadotrophin-releasing hormone receptor activity in the goldfish (*Carassius auratus*). *J Endocrinol* 121(2):239-47.
- Depaolo LV, King RA, Carrillo AJ. 1987. In Vivo and in Vitro Examination of an Autoregulatory Mechanism for Luteinizing Hormone-Releasing Hormone. p 272-279.
- Desbrow C, Routledge EJ, Brighty GC, Sumpter JP, Waldock M. 1998. Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 1. Chemical Fractionation and in Vitro Biological Screening. *Environ. Sci. Technol.* 32(11):1549-1558.
- Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon J-P, Giudice LC, Hauser R, Prins GS, Soto AM, Zoeller RT, Gore AC. 2009. Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocr Rev* 30(4):293-342.
- Dickerson SM, Guevara E, Woller MJ, Gore AC. 2009. Cell death mechanisms in GT1-7 GnRH cells exposed to polychlorinated biphenyls PCB74, PCB118, and PCB153. *Toxicology and Applied Pharmacology* 237(2):237-245.
- Diotel N, Le Page Y, Mouriec K, Tong SK, Pellegrini E, Vaillant C, Anglade I, Brion F, Pakdel F, Chung BC and others. 2010. Aromatase in the brain of teleost fish: expression, regulation and putative functions. *Front Neuroendocrinol* 31(2):172-92.
- Dubois EA, Florijn MA, Zandbergen MA, Peute J, Goos HJ. 1998. Testosterone accelerates the development of the catfish GnRH system in the brain of immature African catfish (*Clarias gariepinus*). *Gen Comp Endocrinol* 112(3):383-93.
- Dubois EA, Slob S, Zandbergen MA, Peute J, Goos HJT. 2001. Gonadal steroids and the maturation of the species-specific gonadotropin-releasing hormone system in brain and pituitary of the male African catfish (*Clarias gariepinus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 129(2-3):381-387.
- Dudas B, Merchenthaler I. 2006. Three-Dimensional Representation of the Neurotransmitter Systems of the Human Hypothalamus: Inputs of the Gonadotrophin Hormone-Releasing Hormone Neuronal System. *Journal of Neuroendocrinology* 18(2):79-95.
- Ekstrom P, Johnsson CM, Ohlin LM. 2001. Ventricular proliferation zones in the brain of an adult teleost fish and their relation to neuromeres and migration (secondary matrix) zones. *J Comp Neurol* 436(1):92-110.
- Ellinwood WE, Hess DL, Roselli CE, Spies HG, Resko JA. 1984. Inhibition of aromatization stimulates luteinizing hormone and testosterone secretion in adult male rhesus monkeys. *J Clin Endocrinol Metab* 59(6):1088-96.

- Felip A, Zanuy S, Pineda R, Pinilla L, Carrillo M, Tena-Sempere M, Gomez A. 2009. Evidence for two distinct KiSS genes in non-placental vertebrates that encode kisspeptins with different gonadotropin-releasing activities in fish and mammals. *Mol Cell Endocrinol* 312(1-2):61-71.
- Fenske M, Segner H. 2004. Aromatase modulation alters gonadal differentiation in developing zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat Toxicol* 67(2):105-26.
- Fernald RD, White RB. 1999. Gonadotropin-Releasing Hormone Genes: Phylogeny, Structure, and Functions. *Frontiers in Neuroendocrinology* 20(3):224-240.
- Fernandez M, Bianchi M, Lux-Lantos V, Libertun C. 2009. Neonatal Exposure to Bisphenol A Alters Reproductive Parameters and Gonadotropin Releasing Hormone Signaling in Female Rats. *Environ Health Perspect* 117(5).
- Filby AL, Thorpe KL, Maack G, Tyler CR. 2007. Gene expression profiles revealing the mechanisms of anti-androgen-and estrogen-induced feminization in fish. *Aquat Toxicol* 81(2):219-231.
- Fiszbein A, Cánepa M, Vázquez GR, Maggese C, Pandolfi M. 2010. Photoperiodic modulation of reproductive physiology and behaviour in the cichlid fish *Cichlasoma dimerus*. *Physiology & Behavior* 99(4):425-432.
- Flett PA, van der Kraak G, Leatherland JF. 1994. Effects of excitatory amino acids on in vivo and in vitro gonadotropin and growth hormone secretion in testosterone-primed immature rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Experimental Zoology* 268(5):390-399.
- Forlano PM, Deitcher DL, Bass AH. 2005. Distribution of estrogen receptor alpha mRNA in the brain and inner ear of a vocal fish with comparisons to sites of aromatase expression. *J Comp Neurol* 483(1):91-113.
- Forlano PM, Deitcher DL, Myers DA, Bass AH. 2001. Anatomical distribution and cellular basis for high levels of aromatase activity in the brain of teleost fish: aromatase enzyme and mRNA expression identify glia as source. *J Neurosci* 21(22):8943-55.
- Franceschini I, Lomet D, Cateau M, Delsol G, Tillet Y, Caraty A. 2006. Kisspeptin immunoreactive cells of the ovine preoptic area and arcuate nucleus co-express estrogen receptor alpha. *Neuroscience Letters* 401(3):225-230.
- Fusani L, Gahr M. 2006. Hormonal influence on song structure and organization: The role of estrogen. *Neuroscience* 138(3):939-946.
- Galea LAM. 2008. Gonadal hormone modulation of neurogenesis in the dentate gyrus of adult male and female rodents. *Brain Research Reviews* 57(2):332-341.
- Garcia-Segura LM, Azcoitia I, DonCarlos LL. 2001. Neuroprotection by estradiol. *Progress in Neurobiology* 63(1):29-60.
- Garcia-Segura LM, McCarthy MM. 2004. Minireview: Role of glia in neuroendocrine function. *Endocrinology* 145(3):1082-6.
- Garcia-Segura LM, Wozniak A, Azcoitia I, Rodriguez JR, Hutchison RE, Hutchison JB. 1999. Aromatase expression by astrocytes after brain injury: implications for local estrogen formation in brain repair. *Neuroscience* 89(2):567-78.

- Gelinas D, A. Pitoc G, V. Callard G. 1998. Isolation of a goldfish brain cytochrome P450 aromatase cDNA: mRNA expression during the seasonal cycle and after steroid treatment. *Molecular and Cellular Endocrinology* 138(1-2):81-93.
- Gesto M, Tintos A, Soengas JL, Míguez JM. 2009. [beta]-Naphthoflavone and benzo(a)pyrene alter dopaminergic, noradrenergic, and serotonergic systems in brain and pituitary of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Ecotoxicol Environ Saf* 72(1):191-198.
- Goldman SA, Nottebohm F. 1983. Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80(8):2390-2394.
- Golovine K, Schwerin M, Vanselow J. 2003. Three different promoters control expression of the aromatase cytochrome p450 gene (*cyp19*) in mouse gonads and brain. *Biol Reprod* 68(3):978-84.
- González-Martínez D, Zmora N, Zanuy S, Sarasquete C, Elizur A, Kah O, Muñoz-Cueto JA. 2002. Developmental expression of three different prepro-GnRH (Gonadotrophin-releasing hormone) messengers in the brain of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Journal of Chemical Neuroanatomy* 23(4):255-267.
- González A, Piferrer F. 2003. Aromatase activity in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) brain. Distribution and changes in relation to age, sex, and the annual reproductive cycle. *General and Comparative Endocrinology* 132(2):223-230.
- Gore AC. 2002. Organochlorine pesticides directly regulate gonadotropin-releasing hormone gene expression and biosynthesis in the GT1-7 hypothalamic cell line. *Molecular and Cellular Endocrinology* 192(1-2):157-170.
- Gore AC, Wu TJ, Oung T, Lee JB, Woller MJ. 2002. A Novel Mechanism for Endocrine-Disrupting Effects of Polychlorinated Biphenyls: Direct Effects on Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons. *J Neuroendocrinol* 14(10):814-823.
- Gothilf Y, Muñoz-Cueto JA, Sagrillo CA, Selmanoff M, Chen TT, Kah O, Elizur A, Zohar Y. 1996. Three forms of gonadotropin-releasing hormone in a perciform fish (*Sparus aurata*): complementary deoxyribonucleic acid characterization and brain localization. *Biol Reprod* 55(3):636-45.
- Goto-Kazeto R, Kight KE, Zohar Y, Place AR, Trant JM. 2004. Localization and expression of aromatase mRNA in adult zebrafish. *Gen Comp Endocrinol* 139(1):72-84.
- Götz M, Barde Y-A. 2005. Radial Glial Cells: Defined and Major Intermediates between Embryonic Stem Cells and CNS Neurons. *Neuron* 46(3):369-372.
- Graddy LG, Kowalski AA, Simmen FA, Davis SL, Baumgartner WW, Simmen RC. 2000. Multiple isoforms of porcine aromatase are encoded by three distinct genes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 73(1-2):49-57.
- Grandel H, Kaslin J, Ganz J, Wenzel I, Brand M. 2006. Neural stem cells and neurogenesis in the adult zebrafish brain: Origin, proliferation dynamics, migration and cell fate. *Developmental Biology* 295(1):263-277.
- Gray MA, Teather KL, Metcalfe CD. 1999. Reproductive success and behavior of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 4-tert-octylphenol. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18(11):2587-2594.

- Guiguen Y, Fostier A, Piferrer F, Chang CF. 2010. Ovarian aromatase and estrogens: a pivotal role for gonadal sex differentiation and sex change in fish. *Gen Comp Endocrinol* 165(3):352-66.
- Guilgur LG, Moncaut NP, Canario AV, Somoza GM. 2006. Evolution of GnRH ligands and receptors in gnathostomata. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 144(3):272-83.
- Guillette LJ, Crain DA, Gunderson MP, Kools SAE, Milnes MR, Orlando EF, Rooney AA, Woodward AR. 2000. Alligators and Endocrine Disrupting Contaminants: A Current Perspective. *Amer Zool* 40 (3): 438-452.
- Guillette LJ, Jr., Gunderson MP. 2001. Alterations in development of reproductive and endocrine systems of wildlife populations exposed to endocrine-disrupting contaminants. *Reproduction* 122(6):857-64.
- Hallgren SLE, Linderöth M, Olsén KH. 2006. Inhibition of cytochrome p450 brain aromatase reduces two male specific sexual behaviours in the male Endler guppy (*Poecilia reticulata*). *General and Comparative Endocrinology* 147(3):323-328.
- Halm S, Pounds N, Maddix S, Rand-Weaver M, Sumpter JP, Hutchinson TH, Tyler CR. 2002. Exposure to exogenous 17beta-oestradiol disrupts p450aromB mRNA expression in the brain and gonad of adult fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Aquat Toxicol* 60(3-4):285-99.
- Harries JE, Sheahan DA, Matthiessen P, Neall P, Rycroft R, Tylor T, Jobling S, Routledge EJ, Sumpter JP. 1996. A survey of estrogenic activity in United Kingdom inland waters. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15(11):1993-2002.
- Hemming JM, Waller WT, Chow MC, Denslow ND, Venables B. 2001. Assessment of the estrogenicity and toxicity of a domestic wastewater effluent flowing through a constructed wetland system using biomarkers in male fathead minnows (*Pimephales promelas rafinesque*, 1820). *Environmental Toxicology and Chemistry* 20(10):2268-2275.
- Herbison AE. 2008. Estrogen positive feedback to gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons in the rodent: The case for the rostral periventricular area of the third ventricle (RP3V). *Brain Research Reviews* 57(2):277-287.
- Herbison AE, Pape JR. 2001. New evidence for estrogen receptors in gonadotropin-releasing hormone neurons. *Frontiers in Neuroendocrinology* 22(4):292-308.
- Hinfray N, Cheshenko K, Ait-Aïssa S, Palluel O, Porcher JM, Pakdel F, Eggen RIL, Kah O, Brion F. 2008. Brain and gonadal aromatases as molecular and biochemical targets of endocrine disrupters in a model species, the zebrafish (*Danio rerio*). *Cybiurn* 32(2):34-36.
- Hinfray N, Palluel O, Piccini B, Sanchez W, Ait-Aïssa S, Noury P, Gomez E, Geraudie P, Minier C, Brion F and others. 2010. Endocrine disruption in wild populations of chub (*Leuciscus cephalus*) in contaminated French streams. *Science of The Total Environment* 408(9):2146-2154.
- Hinfray N, Palluel O, Turies C, Cousin C, Porcher JM, Brion F. 2006. Brain and gonadal aromatase as potential targets of endocrine disrupting chemicals in a model species, the zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Toxicol* 21(4):332-7.

- Honda S-i, Harada N, Ito S, Takagi Y, Maeda S. 1998. Disruption of Sexual Behavior in Male Aromatase-Deficient Mice Lacking Exons 1 and 2 of the *cyp19* Gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 252(2):445-449.
- Ijiri S, Kazeto Y, Lokman PM, Adachi S, Yamauchi K. 2003. Characterization of a cDNA encoding P-450 aromatase (CYP19) from Japanese eel ovary and its expression in ovarian follicles during induced ovarian development. *Gen Comp Endocrinol* 130(2):193-203.
- Illing N, Troskie BE, Nahorniak CS, Hapgood JP, Peter RE, Millar RP. 1999. Two gonadotropin-releasing hormone receptor subtypes with distinct ligand selectivity and differential distribution in brain and pituitary in the goldfish (*Carassius auratus*). *Proc Natl Acad Sci USA* 96(5):2526-31.
- Irwig MS, Fraley GS, Smith JT, Acohido BV, Popa SM, Cunningham MJ, Gottsch ML, Clifton DK, Steiner RA. 2004. Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of *KiSS-1* mRNA in the male rat. *Neuroendocrinology* 80(4):264-72.
- Jobling S, Beresford N, Nolan M, Rodgers-Gray T, Brighty GC, Sumpter JP, Tyler CR. 2002. Altered sexual maturation and gamete production in wild roach (*Rutilus rutilus*) living in rivers that receive treated sewage effluents. *Biol Reprod* 66(2):272-81.
- Jobling S, Casey D, Rodgers-Gray T, Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U, Pawlowski S, Baunbeck T, Turner AP, Tyler CR. 2003. Comparative responses of molluscs and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent. *Aquatic Toxicology* 65(2):205-220.
- Jobling S, Sheahan D, Osborne JA, Matthiessen P, Sumpter JP. 1996. Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15(2):194-202.
- Jodo A, Ando H, Urano A. 2003. Five different types of putative GnRH receptor gene are expressed in the brain of masu salmon (*Oncorhynchus masou*). *Zoolog Sci* 20(9):1117-25.
- Kah O, Lethimonier C, Somoza G, Guilgur LG, Vaillant C, Lareyre JJ. 2007. GnRH and GnRH receptors in metazoa: a historical, comparative, and evolutive perspective. *Gen Comp Endocrinol* 153(1-3):346-64.
- Kah O, Pontet A, Danger J, Dubourg P, Pelletier G, Vaudry H, Calas A. 1989. Characterization, cerebral distribution and gonadotropin release activity of neuropeptide Y (NPY) in the goldfish. *Fish Physiology and Biochemistry* 7(1):69-76.
- Kah O, Trudeau VL, Sloley BD, Chang JP, Dubourg P, Yu KL, Peter RE. 1992. Influence of GABA on gonadotrophin release in the goldfish. *Neuroendocrinology* 55(4):396-404.
- Kallivretaki E, Eggen R, Neuhauss S, Alberti M, Kausch U, Segner H. 2006. Aromatase in zebrafish: a potential target for endocrine disrupting chemicals. *Mar Environ Res* 62 Suppl: S187-90.
- Kallivretaki E, Eggen RI, Neuhauss SC, Kah O, Segner H. 2007. The zebrafish, brain-specific, aromatase *cyp19a2* is neither expressed nor distributed in a sexually dimorphic manner during sexual differentiation. *Developmental Dynamics* 236(11):3155-3166.

- Kanda S, Akazome Y, Matsunaga T, Yamamoto N, Yamada S, Tsukamura H, Maeda K-i, Oka Y. 2008. Identification of KiSS-1 Product Kisspeptin and Steroid-Sensitive Sexually Dimorphic Kisspeptin Neurons in Medaka (*Oryzias latipes*) 10.1210/en.2007-1503. *Endocrinology* 149(5):2467-2476.
- Kaplan MS. 1981. Neurogenesis in the 3-month-old rat visual cortex. *J Comp Neurol* 195(2):323-38.
- Kaslin J, Ganz J, Brand M. 2008. Proliferation, neurogenesis and regeneration in the non-mammalian vertebrate brain. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 363(1489):101-122.
- Kavlock RJ, Daston GP, DeRosa C, Fenner-Crisp P, Gray LE, Kaattari S, Lucier G, Luster M, Mac MJ, Maczka C and others. 1996. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environ Health Perspect* 104 Suppl 4:715-40.
- Kawamoto K, Tanaka S, Kawano M, Hayashi T, Tsuchiya K. 2000. Effects of photoperiod and ambient temperature on the gonadotropin-releasing hormone neuronal system in the gray hamster, *Tscherskia triton*. *Neuroendocrinology* 72(5):284-292.
- Kazeto Y, Goto-Kazeto R, Place AR, Trant JM. 2003. Aromatase expression in zebrafish and channel catfish brains: changes in transcript abundance associated with the reproductive cycle and exposure to endocrine disrupting chemicals. *Fish Physiology and Biochemistry* 28:29-32.
- Kazeto Y, Ijiri S, Place AR, Zohar Y, Trant JM. 2001. The 5'-flanking regions of CYP19A1 and CYP19A2 in zebrafish. *Biochem Biophys Res Commun* 288(3):503-8.
- Kazeto Y, Place AR, Trant JM. 2004. Effects of endocrine disrupting chemicals on the expression of CYP19 genes in zebrafish (*Danio rerio*) juveniles. *Aquatic Toxicology* 69(1):25-34.
- Khan IA, Thomas P. 1999. GABA exerts stimulatory and inhibitory influences on gonadotropin II secretion in the Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*). *Neuroendocrinology* 69(4):261-8.
- Khan IA, Thomas P. 2001. Disruption of Neuroendocrine Control of Luteinizing Hormone Secretion by Aroclor 1254 Involves Inhibition of Hypothalamic Tryptophan Hydroxylase Activity. *Biol Reprod* 64(3):955-964.
- King Heiden TC, Spitsbergen J, Heideman W, Peterson RE. 2009. Persistent Adverse Effects on Health and Reproduction Caused by Exposure of Zebrafish to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin During Early Development and Gonad Differentiation. p 75-87.
- Kinnberg K, Korsgaard B, Bjerregaard P, Jespersen A. 2000. Effects of nonylphenol and 17beta-estradiol on vitellogenin synthesis and testis morphology in male platyfish *Xiphophorus maculatus*. *J Exp Biol* 203(2):171-181.
- Kinoshita M, Tsukamura H, Adachi S, Matsui H, Uenoyama Y, Iwata K, Yamada S, Inoue K, Ohtaki T, Matsumoto H and others. 2005. Involvement of central metastin in the regulation of preovulatory luteinizing hormone surge and estrous cyclicity in female rats. *Endocrinology* 146(10):4431-6.

- Kishida M, Callard GV. 2001. Distinct Cytochrome P450 Aromatase Isoforms in Zebrafish (*Danio rerio*) Brain and Ovary Are Differentially Programmed and Estrogen Regulated during Early Development. *Endocrinology* 142(2):740-750.
- Kitahashi T, Ogawa S, Parhar IS. 2009. Cloning and expression of kiss2 in the zebrafish and medaka. *Endocrinology* 150(2):821-31.
- Klungland H, Andersen Ø, Kisen G, Aleström P, Tora L. 1993. Estrogen receptor binds to the salmon GnRH gene in a region with long palindromic sequences. *Molecular and Cellular Endocrinology* 95(1-2):147-154.
- Knacker T, Boettcher M, Frische T, Rufli H, Stolzenberg HC, Teigeler M, Zok S, Braunbeck T, Schäfers C. 2010. Environmental effect assessment for sexual endocrine-disrupting chemicals: Fish testing strategy. *Integrated Environmental Assessment and Management* 6(4):653-662.
- Kobayashi M, Amano M, Kim MH, Yoshiura Y, Sohn YC, Suetake H, Aida K. 1997. Gonadotropin-releasing hormone and gonadotropin in goldfish and masu salmon. *Fish Physiology and Biochemistry* 17(1):1-8.
- Kobayashi M, Sorensen P, Stacey N. 2002. Hormonal and pheromonal control of spawning behavior in the goldfish. *Fish Physiology and Biochemistry* 26(1):71-84.
- Kobayashi T, Nakamura M, Kajiura-Kobayashi H, Young G, Nagahama Y. 1998. Immunolocalization of steroidogenic enzymes (P450scc, P450c17, P450arom, and 3beta-HSD) in immature and mature testes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Cell Tissue Res* 292(3):573-7.
- Kobayashi Y, Horiguchi R, Miura S, Nakamura M. 2010. Sex- and tissue-specific expression of P450 aromatase (*cyp19a1a*) in the yellowtail clownfish, *Amphiprion clarkii*. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* 155(2):237-244.
- Kuenzel WJ, Golden CD. 2006. Distribution and change in number of gonadotropin-releasing hormone-1 neurons following activation of the photoneuroendocrine system in the chick, *Gallus gallus*. *Cell Tissue Res* 325(3):501-512.
- Kuhl AJ, Manning S, Brouwer M. 2005. Brain aromatase in Japanese medaka (*Oryzias latipes*): Molecular characterization and role in xenoestrogen-induced sex reversal. *J Steroid Biochem Mol Biol* 96(1):67-77.
- Kuroyanagi Y, Okuyama T, Suehiro Y, Imada H, Shimada A, Naruse K, Takeda H, Kubo T, Takeuchi H. 2010. Proliferation zones in adult medaka (*Oryzias latipes*) brain. *Brain Res* 1323:33-40.
- Lai KM, Scrimshaw MD, Lester JN. 2002. Prediction of the bioaccumulation factors and body burden of natural and synthetic estrogens in aquatic organisms in the river systems. *Science of The Total Environment* 289(1-3):159-168.
- Lange A, Katsu Y, Ichikawa R, Paull GC, Chidgey LL, Coe TS, Iguchi T, Tyler CR. 2008. Altered sexual development in roach (*Rutilus rutilus*) exposed to environmental concentrations of the pharmaceutical 17 alpha-ethinylestradiol and associated expression dynamics of aromatases and estrogen receptors. *Toxicological Sciences* 106(1):113-123.

- Larsson DGJ, Adolfsson-Erici M, Parkkonen J, Pettersson M, Berg AH, Olsson PE, Förlin L. 1999. Ethinyloestradiol -- an undesired fish contraceptive? *Aquatic Toxicology* 45(2-3):91-97.
- Le Page Y, Menuet A, Kah O, Pakdel F. 2008. Characterization of a cis-acting element involved in cell-specific expression of the zebrafish brain aromatase gene. *Molecular Reproduction and Development* 75(10):1549-1557.
- Le Page Y, Scholze M, Kah O, Pakdel F. 2006. Assessment of Xenoestrogens Using Three Distinct Estrogen Receptors and the Zebrafish Brain Aromatase Gene in a Highly Responsive Glial Cell System. *Environ Health Perspect* 114(5).
- Lee Y-H, Lee F-Y, Yueh W-S, Tacon P, Du J-L, Chang C-N, Jeng S-R, Tanaka H, Chang C-F. 2000. Profiles of Gonadal Development, Sex Steroids, Aromatase Activity, and Gonadotropin II in the Controlled Sex Change of Protandrous Black Porgy, *Acanthopagrus schlegelii* Bleeker. *General and Comparative Endocrinology* 119(1):111-120.
- Lee Y-M, Seo JS, Kim I-C, Yoon Y-D, Lee J-S. 2006. Endocrine disrupting chemicals (bisphenol A, 4-nonylphenol, 4-tert-octylphenol) modulate expression of two distinct cytochrome P450 aromatase genes differently in gender types of the hermaphroditic fish *Rivulus marmoratus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 345(2):894-903.
- Legler J, Zeinstra LM, Schuitemaker F, Lanser PH, Bogerd J, Brouwer A, Vethaak AD, De Voogt P, Murk AJ, Van der Burg B. 2002. Comparison of in vivo and in vitro reporter gene assays for short-term screening of estrogenic activity. *Environmental Science & Technology* 36(20):4410-4415.
- Lephart ED. 1996. A review of brain aromatase cytochrome P450. *Brain Res Rev* 22(1):1-26.
- Lethimonier C, Madigou T, Munoz-Cueto JA, Lareyre JJ, Kah O. 2004. Evolutionary aspects of GnRHs, GnRH neuronal systems and GnRH receptors in teleost fish. *Gen Comp Endocrinol* 135(1):1-16.
- Levavi-Sivan B, Safarian H, Rosenfeld H, Elizur A, Avitan A. 2004. Regulation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-receptor gene expression in tilapia: effect of GnRH and dopamine. *Biol Reprod* 70(6):1545-51.
- Linard B, Bennani S, Saligaut C. 1995. Involvement of estradiol in a catecholamine inhibitory tone of gonadotropin release in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen Comp Endocrinol* 99(2):192-6.
- Lindsey BW, Tropepe V. 2006. A comparative framework for understanding the biological principles of adult neurogenesis. *Progress in Neurobiology* 80(6):281-307.
- Linford NJ, Dorsa DM. 2002. 17[beta]-Estradiol and the phytoestrogen genistein attenuate neuronal apoptosis induced by the endoplasmic reticulum calcium-ATPase inhibitor thapsigargin. *Steroids* 67(13-14):1029-1040.
- Losa SM, Todd KL, Sullivan AW, Cao J, Mickens JA, Patisaul HB. in press. Neonatal exposure to genistein adversely impacts the ontogeny of hypothalamic kisspeptin signaling pathways and ovarian development in the peripubertal female rat. *Reproductive Toxicology In Press, Uncorrected Proof*.



- Lundholm CE. 1997. DDE-induced eggshell thinning in birds: Effects of p,p'-DDE on the calcium and prostaglandin metabolism of the eggshell gland. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 118(2):113-128.
- Lye CM, Frid CLJ, Gill ME, McCormick D. 1997. Abnormalities in the reproductive health of flounder *Platichthys flesus* exposed to effluent from a sewage treatment works. *Marine Pollution Bulletin* 34(1):34-41.
- Maack G, Segner H. 2004. Life-stage-dependent sensitivity of zebrafish (*Danio rerio*) to estrogen exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 139(1-3):47-55.
- Madigou T, Mananos-Sanchez E, Hulshof S, Anglade I, Zanuy S, Kah O. 2000. Cloning, tissue distribution, and central expression of the gonadotropin-releasing hormone receptor in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biol Reprod* 63(6):1857-66.
- Mahoney MM, Padmanabhan V. 2010. Developmental programming: Impact of fetal exposure to endocrine-disrupting chemicals on gonadotropin-releasing hormone and estrogen receptor mRNA in sheep hypothalamus. *Toxicology and Applied Pharmacology* 247(2):98-104.
- Malatesta P, Hartfuss E, Gotz M. 2000. Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage. *Development* 127(24):5253-5263.
- Mananos EL, Anglade I, Chyb J, Saligaut C, Breton B, Kah O. 1999. Involvement of gamma-aminobutyric acid in the control of GTH-1 and GTH-2 secretion in male and female rainbow trout. *Neuroendocrinology* 69(4):269-80.
- Marlatt VL, Lakoff J, Crump K, Martyniuk CJ, Watt J, Jewell L, Atkinson S, Blais JM, Sherry J, Moon TW and others. 2010. Sex- and tissue-specific effects of waterborne estrogen on estrogen receptor subtypes and E2-mediated gene expression in the reproductive axis of goldfish. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology* 156(1):92-101.
- Marlatt VL, Martyniuk CJ, Zhang D, Xiong H, Watt J, Xia X, Moon T, Trudeau VL. 2008. Auto-regulation of estrogen receptor subtypes and gene expression profiling of 17[beta]-estradiol action in the neuroendocrine axis of male goldfish. *Molecular and Cellular Endocrinology* 283(1-2):38-48.
- Marsh KE, Creutz LM, Hawkins MB, Godwin J. 2006. Aromatase immunoreactivity in the bluehead wrasse brain, *Thalassoma bifasciatum*: immunolocalization and co-regionalization with arginine vasotocin and tyrosine hydroxylase. *Brain Res* 1126(1):91-101.
- Martinez-Cerdeno V, Noctor SC, Kriegstein AR. 2006. Estradiol stimulates progenitor cell division in the ventricular and subventricular zones of the embryonic neocortex. *Eur J Neurosci* 24(12):3475-88.
- Matsumoto S-i, Yamazaki C, Masumoto K-h, Nagano M, Naito M, Soga T, Hiyama H, Matsumoto M, Takasaki J, Kamohara M and others. 2006. Abnormal development of the olfactory bulb and reproductive system in mice lacking prokineticin receptor PKR2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(11):4140-4145.
- Matsuo H, Baba Y, Nair RMG, Arimura A, Schally AV. 1971. Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 43(6):1334-1339.

- McGarvey C, Cates PS, Brooks AN, Swanson IA, Milligan SR, Coen CW, O'Byrne KT. 2001. Phytoestrogens and Gonadotropin-Releasing Hormone Pulse Generator Activity and Pituitary Luteinizing Hormone Release in the Rat. *Endocrinology* 142(3):1202-1208.
- Mennigen JA, Martyniuk CJ, Crump K, Xiong HL, Zhao E, Popesku J, Anisman H, Cossins AR, Xia XH, Trudeau VL. 2008. Effects of fluoxetine on the reproductive axis of female goldfish (*Carassius auratus*). *Physiological Genomics* 35(3):273-282.
- Menuet A, Anglade I, Le Guevel R, Pellegrini E, Pakdel F, Kah O. 2003. Distribution of aromatase mRNA and protein in the brain and pituitary of female rainbow trout: Comparison with estrogen receptor  $\alpha$ . *The Journal of Comparative Neurology* 462(2):180-193.
- Menuet A, Le Page Y, Torres O, Kern L, Kah O, Pakdel F. 2004. Analysis of the estrogen regulation of the zebrafish estrogen receptor (ER) reveals distinct effects of ER alpha, ER beta 1 and ER beta 2. *Journal of Molecular Endocrinology* 32(3):975-986.
- Menuet A, Pellegrini E, Anglade I, Blaise O, Laudet V, Kah O, Pakdel F. 2002. Molecular characterization of three estrogen receptor forms in zebrafish: Binding characteristics, transactivation properties, and tissue distributions. *Biol Reprod* 66(6):1881-1892.
- Menuet A, Pellegrini E, Brion F, Gueguen MM, Anglade I, Pakdel F, Kah O. 2005. Expression and estrogen-dependent regulation of the zebrafish brain aromatase gene. *J Comp Neurol* 485(4):304-20.
- Messenger S, Chatzidaki EE, Ma D, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Thresher RR, Malinge I, Lomet D, Carlton MBL and others. 2005. Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(5):1761-1766.
- Metcalfe CD, Metcalfe TL, Kiparissis Y, Koenig BG, Khan C, Hughes RJ, Croley TR, March RE, Potter T. 2001. Estrogenic potency of chemicals detected in sewage treatment plant effluents as determined by in vivo assays with Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 20(2):297-308.
- Meyer A, Van de Peer Y. 2005. From 2R to 3R: evidence for a fish-specific genome duplication (FSGD). *BioEssays* 27(9):937-945.
- Mills LJ, Chichester C. 2005. Review of evidence: are endocrine-disrupting chemicals in the aquatic environment impacting fish populations? *Sci Total Environ* 343(1-3):1-34.
- Miranda L, Strüssmann C, Somoza G. 2009. Effects of light and temperature conditions on the expression of GnRH and GtH genes and levels of plasma steroids in *Odontesthes bonariensis* females. *Fish Physiology and Biochemistry* 35(1):101-108.
- Molina-Molina JM, Escande A, Pillon A, Gomez E, Pakdel F, Cavailles V, Olea N, Ait-Aissa S, Balaguer P. 2008. Profiling of benzophenone derivatives using fish and human estrogen receptor-specific in vitro bioassays. *Toxicology and Applied Pharmacology* 232(3):384-395.
- Moncaut N, Somoza G, Power DM, Canario AV. 2005. Five gonadotrophin-releasing hormone receptors in a teleost fish: isolation, tissue distribution and phylogenetic relationships. *J Mol Endocrinol* 34(3):767-79.

- Mori T, Buffo A, Götz M, Gerald PS. 2005. The Novel Roles of Glial Cells Revisited: The Contribution of Radial Glia and Astrocytes to Neurogenesis. *Current Topics in Developmental Biology*: Academic Press. p 67-99.
- Mouriec K, Gueguen M-M, Manuel C, Percevault Fdr, Thieulant M-L, Pakdel F, Kah O. 2009a. Androgens Upregulate *cyp19a1b* (Aromatase B) Gene Expression in the Brain of Zebrafish (*Danio rerio*) Through Estrogen Receptors. *Biology of Reproduction* 80(5):889-896.
- Mouriec K, Lareyre JJ, Tong SK, Le Page Y, Vaillant C, Pellegrini E, Pakdel F, Chung BC, Kah O, Anglade I. 2009b. Early regulation of brain aromatase (*cyp19a1b*) by estrogen receptors during zebrafish development. *Dev Dyn* 238(10):2641-51.
- Mouriec K, Pellegrini E, Anglade I, Menuet A, Adrio F, Thieulant ML, Pakdel F, Kah O. 2008. Synthesis of estrogens in progenitor cells of adult fish brain: Evolutive novelty or exaggeration of a more general mechanism implicating estrogens in neurogenesis? *Brain Research Bulletin* 75(2-4):274-280.
- Munakata A, Kobayashi M. 2010. Endocrine control of sexual behavior in teleost fish. *Gen Comp Endocrinol* 165(3):456-68.
- Nash JP, Kime DE, Van der Ven LTM, Wester PW, Brion F, Maack G, Stahlschmidt-Allner P, Tyler CR. 2004. Long-term exposure to environmental concentrations of the pharmaceutical ethynylestradiol causes reproductive failure in fish. *Environmental Health Perspectives* 112(17):1725-1733.
- Navas JM, Anglade I, Bailhache T, Pakdel F, Breton B, Jegou P, Kah O. 1995. Do gonadotrophin-releasing hormone neurons express estrogen receptors in the rainbow trout? A double immunohistochemical study. *J Comp Neurol* 363(3):461-74.
- Nocillado JN, Elizur A, Avitan A, Carrick F, Levavi-Sivan B. 2007. Cytochrome P450 aromatase in grey mullet: cDNA and promoter isolation; brain, pituitary and ovarian expression during puberty. *Mol Cell Endocrinol* 263(1-2):65-78.
- Noctor SC, Flint AC, Weissman TA, Dammerman RS, Kriegstein AR. 2001. Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature* 409(6821):714-720.
- Noel SD, Keen KL, Baumann DI, Filardo EJ, Terasawa E. 2009. Involvement of G Protein-Coupled Receptor 30 (GPR30) in Rapid Action of Estrogen in Primate LHRH Neurons. *Mol Endocrinol* 23(3):349-359.
- Ohmuro-Matsuyama Y, Okubo K, Matsuda M, Ijiri S, Wang D, Guan G, Suzuki T, Matsuyama M, Morohashi Ki, Nagahama Y. 2007. Liver receptor homologue-1 (LRH-1) activates the promoter of brain aromatase (*cyp19a2*) in a teleost fish, the medaka, *Oryzias latipes*. *Molecular Reproduction and Development* 74(9):1065-1071.
- Okada M, Murase K, Makino A, Nakajima M, Kaku T, Furukawa S, Furukawa Y. 2008. Effects of estrogens on proliferation and differentiation of neural stem/progenitor cells. *Biomedical Research-Tokyo* 29(3):163-170.
- Okubo K, Ishii S, Ishida J, Mitani H, Naruse K, Kondo M, Shima A, Tanaka M, Asakawa S, Shimizu N and others. 2003. A novel third gonadotropin-releasing hormone receptor in the medaka *Oryzias latipes*: evolutionary and functional implications. *Gene* 314:121-31.

- Okubo K, Sakai F, Lau EL, Yoshizaki G, Takeuchi Y, Naruse K, Aida K, Nagahama Y. 2006. Forebrain Gonadotropin-Releasing Hormone Neuronal Development: Insights from Transgenic Medaka and the Relevance to X-Linked Kallmann Syndrome. *Endocrinology* 147(3):1076-1084.
- Onteniente B, Kimura H, Maeda T. 1983. Comparative study of the glial fibrillary acidic protein in vertebrates by PAP immunohistochemistry. *The Journal of Comparative Neurology* 215(4):427-436.
- Ormerod BK, Lee TTY, Galea LAM. 2004. Estradiol enhances neurogenesis in the dentate gyri of adult male meadow voles by increasing the survival of young granule neurons. *Neuroscience* 128(3):645-654.
- Örn S, Holbech H, Madsen TH, Norrgren L, Petersen GI. 2003. Gonad development and vitellogenin production in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to ethinylestradiol and methyltestosterone. *Aquatic Toxicology* 65(4):397-411.
- Ottinger MA, Lavoie ET, Thompson N, Bohannon M, Dean K, Quinn Jr MJ. 2009. Is the gonadotropin releasing hormone system vulnerable to endocrine disruption in birds? *Gen Comp Endocrinol* 163(1-2):104-108.
- Palevitch O, Abraham E, Borodovsky N, Levkowitz G, Zohar Y, Gothilf Y. 2009. Nasal embryonic LHRH factor plays a role in the developmental migration and projection of gonadotropin-releasing hormone 3 neurons in zebrafish. *Dev Dyn* 238(1):66-75.
- Palevitch O, Abraham E, Borodovsky N, Levkowitz G, Zohar Y, Gothilf Y. 2010. Cxcl12a-Cxcr4b signaling is important for proper development of the forebrain GnRH system in zebrafish. *Gen Comp Endocrinol* 165(2):262-268.
- Palevitch O, Kight K, Abraham E, Wray S, Zohar Y, Gothilf Y. 2007. Ontogeny of the GnRH systems in zebrafish brain: in situ hybridization and promoter-reporter expression analyses in intact animals. *Cell Tissue Res* 327(2):313-322.
- Pandolfi M, Munoz Cueto JA, Lo Nostro FL, Downs JL, Paz DA, Maggese MC, Urbanski HF. 2005. GnRH systems of *Cichlasoma dimerus* (Perciformes, Cichlidae) revisited: a localization study with antibodies and riboprobes to GnRH-associated peptides. *Cell Tissue Res* 321(2):219-32.
- Pandolfi M, Parhar I, Ravaglia M, Meijide F, Maggese C, Paz D. 2002. Ontogeny and distribution of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuronal systems in the brain of the cichlid fish *Cichlasoma dimerus*. *Anatomy and Embryology* 205(4):271-281.
- Parhar IS, Ogawa S, Sakuma Y. 2004. Laser-captured single digoxigenin-labeled neurons of gonadotropin-releasing hormone types reveal a novel G protein-coupled receptor (Gpr54) during maturation in cichlid fish. *Endocrinology* 145(8):3613-8.
- Parhar IS, Ogawa S, Sakuma Y. 2005. Three GnRH receptor types in laser-captured single cells of the cichlid pituitary display cellular and functional heterogeneity. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(6):2204-9.
- Parhar IS, Soga T, Ishikawa Y, Nagahama Y, Sakuma Y. 1998. Neurons synthesizing gonadotropin-releasing hormone mRNA subtypes have multiple developmental origins in the medaka. *J Comp Neurol* 401(2):217-226.
- Pasmanik M, Callard GV. 1985. Aromatase and 5 alpha-reductase in the teleost brain, spinal cord, and pituitary gland. *Gen Comp Endocrinol* 60(2):244-51.

- Pasmanik M, Callard GV. 1988. Changes in Brain Aromatase and 5 $\alpha$ -Reductase Activities Correlate Significantly with Seasonal Reproductive Cycles in Goldfish (*Carassius auratus*). *Endocrinology* 122(4):1349-1356.
- Patil JG, Gunasekera RM. 2008. Tissue and sexually dimorphic expression of ovarian and brain aromatase mRNA in the Japanese medaka (*Oryzias latipes*): implications for their preferential roles in ovarian and neural differentiation and development. *Gen Comp Endocrinol* 158(1):131-7.
- Pellegrini E, Menuet A, Lethimonier C, Adrio F, Gueguen M-M, Tascon C, Anglade I, Pakdel F, Kah O. 2005. Relationships between aromatase and estrogen receptors in the brain of teleost fish. *General and Comparative Endocrinology* 142(1-2):60-66.
- Pellegrini E, Mouriec K, Anglade I, Menuet A, Le Page Y, Gueguen MM, Marmignon MH, Brion F, Pakdel F, Kah O. 2007. Identification of aromatase-positive radial glial cells as progenitor cells in the ventricular layer of the forebrain in zebrafish. *J Comp Neurol* 501(1):150-67.
- Peng C, Chang JP, Yu KL, Wong AO, Van Goor F, Peter RE, Rivier JE. 1993a. Neuropeptide-Y stimulates growth hormone and gonadotropin-II secretion in the goldfish pituitary: involvement of both presynaptic and pituitary cell actions. *Endocrinology* 132(4):1820-9.
- Peng C, Gallin W, Peter RE, Blomqvist AG, Larhammar D. 1994. Neuropeptide-Y gene expression in the goldfish brain: distribution and regulation by ovarian steroids. *Endocrinology* 134(3):1095-103.
- Peng C, Trudeau VL, Peter RE. 1993b. Seasonal variation of neuropeptide Y actions on growth hormone and gonadotropin-II secretion in the goldfish: effects of sex steroids. *J Neuroendocrinol* 5(3):273-80.
- Petersen SL, Ottem EN, Carpenter CD. 2003. Direct and Indirect Regulation of Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons by Estradiol. *Biology of Reproduction* 69(6):1771-1778.
- Peterson RS, Fernando G, Day L, Allen TA, Chapleau JD, Menjivar J, Schlinger BA, Lee DW. 2007. Aromatase expression and cell proliferation following injury of the adult zebra finch hippocampus. *Dev Neurobiol* 67(14):1867-78.
- Peterson RS, Lee DW, Fernando G, Schlinger BA. 2004. Radial glia express aromatase in the injured zebra finch brain. *J Comp Neurol* 475(2):261-9.
- Peterson RS, Saldanha CJ, Schlinger BA. 2001. Rapid upregulation of aromatase mRNA and protein following neural injury in the zebra finch (*Taeniopygia guttata*). *J Neuroendocrinol* 13(4):317-23.
- Peterson RS, Yarram L, Schlinger BA, Saldanha CJ. 2005. Aromatase is pre-synaptic and sexually dimorphic in the adult zebra finch brain. *Proc Biol Sci* 272(1576):2089-96.
- Piferrer F, Blazquez M. 2005. Aromatase distribution and regulation in fish. *Fish Physiol Biochem* 31(2-3):215-26.
- Pillon D, Cadiou V, Combarous Y, Duittoz AH. soumis. Ethinylestradiol exposure during embryogenesis disrupted the development of GnRH neurons. *Environmental Health Perspectives*.

- Pitteloud N, Zhang C, Pignatelli D, Li JD, Raivio T, Cole LW, Plummer L, Jacobson-Dickman EE, Mellon PL, Zhou QY and others. 2007. Loss-of-function mutation in the prokineticin 2 gene causes Kallmann syndrome and normosmic idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(44):17447-17452.
- Porkka-Heiskanen T, Khoshaba N, Scarbrough K, Urban JH, Vitaterna MH, Levine JE, Turek FW, Horton TH. 1997. Rapid photoperiod-induced increase in detectable GnRH mRNA-containing cells in Siberian hamster. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 273(6):R2032-R2039.
- Powell JF, Zohar Y, Elizur A, Park M, Fischer WH, Craig AG, Rivier JE, Lovejoy DA, Sherwood NM. 1994. Three forms of gonadotropin-releasing hormone characterized from brains of one species. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(25):12081-5.
- Prevot V. 2002. Glial-neuronal-endothelial interactions are involved in the control of GnRH secretion. *J Neuroendocrinol* 14(3):247-55.
- Prevot V, Croix D, Rialas CM, Poulain P, Fricchione GL, Stefano GB, Beauvillain JC. 1999. Estradiol coupling to endothelial nitric oxide stimulates gonadotropin-releasing hormone release from rat median eminence via a membrane receptor. *Endocrinology* 140(2):652-9.
- Rakic P. 2003. Elusive radial glial cells: Historical and evolutionary perspective. *Glia* 43(1):19-32.
- Rangaraju NS, Xu JF, Harris RB. 1991. Pro-gonadotropin-releasing hormone protein is processed within hypothalamic neurosecretory granules. *Neuroendocrinology* 53(1):20-8.
- Rasier Gg, Parent A-S, Gérard A, Denooz RI, Lebrethon M-C, Charlier C, Bourguignon J-P. 2008. Mechanisms of Interaction of Endocrine-Disrupting Chemicals with Glutamate-Evoked Secretion of Gonadotropin-Releasing Hormone. *Toxicological Sciences* 102(1):33-41.
- Rasier Gg, Parent A-S, Gérard A, Lebrethon M-C, Bourguignon J-P. 2007. Early Maturation of Gonadotropin-Releasing Hormone Secretion and Sexual Precocity after Exposure of Infant Female Rats to Estradiol or Dichlorodiphenyltrichloroethane. *Biol Reprod* 77(4):734-742.
- Reinhart J, Mertz LM, Catt KJ. 1992. Molecular cloning and expression of cDNA encoding the murine gonadotropin-releasing hormone receptor. *J Biol Chem* 267(30):21281-4.
- Reynolds BA, Weiss S. 1992. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255(5052):1707-10.
- Roa J, Aguilar E, Dieguez C, Pinilla L, Tena-Sempere M. 2008. New frontiers in kisspeptin/GPR54 physiology as fundamental gatekeepers of reproductive function. *Front Neuroendocrinol* 29(1):48-69.
- Rodriguez-Mari A, Yan YL, Bremiller RA, Wilson C, Canestro C, Postlethwait JH. 2005. Characterization and expression pattern of zebrafish Anti-Mullerian hormone (Amh) relative to sox9a, sox9b, and cyp19a1a, during gonad development. *Gene Expr Patterns* 5(5):655-67.
- Roselli CE, Stadelman H, Horton LE, Resko JA. 1987. Regulation of androgen metabolism and luteinizing hormone-releasing hormone content in discrete hypothalamic and limbic areas of male rhesus macaques. *Endocrinology* 120(1):97-106.

- Safe S. 2004. Endocrine disruptors and human health: is there a problem. *Toxicology* 205(1-2):3-10.
- Sawyer SJ, Gerstner KA, Callard GV. 2006. Real-time PCR analysis of cytochrome P450 aromatase expression in zebrafish: Gene specific tissue distribution, sex differences, developmental programming, and estrogen regulation. *General and Comparative Endocrinology* 147(2):108-117.
- Schafers C, Teigeler M, Wenzel A, Maack G, Fenske M, Segner H. 2007. Concentration- and time-dependent effects of the synthetic estrogen, 17 alpha-ethinylestradiol, on reproductive capabilities of the zebrafish, *Danio rerio*. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part a-Current Issues* 70(9-10):768-779.
- Schlinger BA, Greco C, Bass A. 1999. Aromatase activity in the hindbrain vocal control region of a teleost fish: divergence among males with alternative reproductive tactics. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 266:131-136.
- Schwanzel-Fukuda M, Bick D, Pfaff DW. 1989. Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH)-expressing cells do not migrate normally in an inherited hypogonadal (Kallmann) syndrome. *Brain Res Mol Brain Res* 6(4):311-26.
- Seeburg PH, Adelman JP. 1984. Characterization of cDNA for precursor of human luteinizing hormone releasing hormone. *Nature* 311(5987):666-8.
- Segner H. 2009. Zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism for investigating endocrine disruption. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 149(2):187-195.
- Segner H, Carroll K, Fenske M, Janssen CR, Maack G, Pascoe D, Schafers C, Vandenberg GF, Watts M, Wenzel A. 2003. Identification of endocrine-disrupting effects in aquatic vertebrates and invertebrates: report from the European IDEA project. *Ecotoxicol Environ Saf* 54(3):302-14.
- Seki M, Yokota H, Maeda M, Tadokoro H, Kobayashi K. 2003. Effects of 4-nonylphenol and 4-tert-octylphenol on sex differentiation and vitellogenin induction in medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 22(7):1507-1516.
- Senthilkumaran B, Joy KP. 1996. Effects of administration of some monoamine-synthesis blockers and precursors on ovariectomy-induced rise in plasma gonadotropin II in the catfish *Heteropneustes fossilis*. *Gen Comp Endocrinol* 101(2):220-6.
- Senthilkumaran B, Okuzawa K, Gen K, Kagawa H. 2001. Effects of serotonin, GABA and neuropeptide Y on seabream gonadotropin releasing hormone release in vitro from preoptic-anterior hypothalamus and pituitary of red seabream, *Pagrus major*. *J Neuroendocrinol* 13(5):395-400.
- Servili A, Lethimonier C, Lareyre JJ, Lopez-Olmeda JF, Sanchez-Vazquez FJ, Kah O, Munoz-Cueto JA. 2010. The Highly conserved gonadotropin-releasing hormone-2 form acts as a melatonin-releasing factor in the pineal of a teleost fish, the european sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Endocrinology* 151(5):2265-75.
- Sharma TP, Blache D, Blackberry MA, Martin GB. 1999. Role of peripheral and central aromatization in the control of gonadotrophin secretion in the male sheep. *Reprod Fertil Dev* 11(4-5):293-302.
- Sherwood N, Eiden L, Brownstein M, Spiess J, Rivier J, Vale W. 1983. Characterization of a teleost gonadotropin-releasing hormone. *Proc Natl Acad Sci USA* 80(9):2794-2798.

- Simpson ER, Clyne C, Rubin G, Boon WC, Robertson K, Britt K, Speed C, Jones M. 2002. Aromatase--a brief overview. *Annu Rev Physiol* 64:93-127.
- Simpson ER, Mahendroo MS, Means GD, Kilgore MW, Hinshelwood MM, Graham-Lorence S, Amarneh B, Ito Y, Fisher CR, Michael MD and others. 1994. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr Rev* 15(3):342-55.
- Skakkebak NE, Rajpert-De Meyts E, Main KM. 2001. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects: Opinion. *Human Reproduction* 16(5):972-978
- Smith JT, Clifton DK, Steiner RA. 2006. Regulation of the neuroendocrine reproductive axis by kisspeptin-GPR54 signaling. *Reproduction* 131(4):623-630.
- Smith JT, Cunningham MJ, Rissman EF, Clifton DK, Steiner RA. 2005. Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology* 146(9):3686-92.
- Soares A, Guieysse B, Jefferson B, Cartmell E, Lester JN. 2008. Nonylphenol in the environment: A critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. *Environment International* 34(7):1033-1049.
- Soga T, Sakuma Y, Parhar IS. 1998. Testosterone differentially regulates expression of GnRH messenger RNAs in the terminal nerve, preoptic and midbrain of male tilapia. *Molecular Brain Research* 60(1):13-20.
- Sole M, de Alda MJL, Castillo M, Porte C, Ladegaard-Pedersen K, Barcelo D. 2000. Estrogenicity determination in sewage treatment plants and surface waters from the Catalonian area (NE Spain). *Environmental Science & Technology* 34(24):5076-5083.
- Soussi-Yanicostas N, Hardelin JP, Arroyo-Jimenez MM, Ardouin O, Legouis R, Levilliers J, Traincard F, Betton JM, Cabanie L, Petit C. 1996. Initial characterization of anosmin-1, a putative extracellular matrix protein synthesized by definite neuronal cell populations in the central nervous system. *J Cell Sci* 109(7):1749-1757.
- Steven C, Lehnen N, Kight K, Ijiri S, Klenke U, Harris WA, Zohar Y. 2003. Molecular characterization of the GnRH system in zebrafish (*Danio rerio*): cloning of chicken GnRH-II, adult brain expression patterns and pituitary content of salmon GnRH and chicken GnRH-II. *Gen Comp Endocrinol* 133(1):27-37.
- Strobl-Mazzulla PH, Moncaut NP, Lopez GC, Miranda LA, Canario AV, Somoza GM. 2005. Brain aromatase from pejerrey fish (*Odontesthes bonariensis*): cDNA cloning, tissue expression, and immunohistochemical localization. *Gen Comp Endocrinol* 143(1):21-32.
- Suzuki S, Brown C, Wise P. 2006. Mechanisms of neuroprotection by estrogen. *Endocrine* 29(2):209-215.
- Tello JA, Wu S, Rivier JE, Sherwood NM. 2008. Four functional GnRH receptors in zebrafish: analysis of structure, signaling, synteny and phylogeny. *Integrative and Comparative Biology* 48(5):570-587.
- Ternes TA, Stumpf M, Mueller J, Haberer K, Wilken RD, Servos M. 1999. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants--I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *Sci Total Environ* 225(1-2):81-90.



- Thorpe KL, Hutchinson TH, Hetheridge MJ, Scholze M, Sumpter JP, Tyler CR. 2001. Assessing the biological potency of binary mixtures of environmental estrogens using vitellogenin induction in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental Science & Technology* 35(12):2476-2481.
- Tobet SA, Schwarting GA. 2006. Minireview: recent progress in gonadotropin-releasing hormone neuronal migration. *Endocrinology* 147(3):1159-65.
- Tomy S, Wu GC, Huang HR, Dufour S, Chang CF. 2007. Developmental expression of key steroidogenic enzymes in the brain of protandrous black porgy fish, *Acanthopagrus schlegeli*. *J Neuroendocrinol* 19(8):643-55.
- Tong SK, Chung BC. 2003. Analysis of zebrafish *cyp19* promoters. *J Steroid Biochem Mol Biol* 86(3-5):381-6.
- Tong SK, Mouriec K, Kuo MW, Pellegrini E, Gueguen MM, Brion F, Kah O, Chung BC. 2009. A *cyp19a1b-gfp* (aromatase B) transgenic zebrafish line that expresses GFP in radial glial cells. *Genesis* 47(2):67-73.
- Trant JM, Gavasso S, Ackers J, Chung BC, Place AR. 2001. Developmental expression of cytochrome P450 aromatase genes (CYP19a and CYP19b) in zebrafish fry (*Danio rerio*). *Journal of Experimental Zoology* 290(5):475-483.
- Trudeau VL. 1997. Neuroendocrine regulation of gonadotrophin II release and gonadal growth in the goldfish, *Carassius auratus*. *Rev Reprod* 2(1):55-68.
- Trudeau VL, Sloley BD, Peter RE. 1993a. GABA stimulation of gonadotropin-II release in goldfish: involvement of GABAA receptors, dopamine, and sex steroids. *Am J Physiol* 265(2 Pt 2):R348-55.
- Trudeau VL, Sloley BD, Wong AOL, Peter RE. 1993b. Interactions of Gonadal Steroids with Brain Dopamine and Gonadotropin-Releasing Hormone in the Control of Gonadotropin-II Secretion in the Goldfish. *General and Comparative Endocrinology* 89(1):39-50.
- Tsutsumi M, Zhou W, Millar RP, Mellon PL, Roberts JL, Flanagan CA, Dong K, Gillo B, Sealfon SC. 1992. Cloning and functional expression of a mouse gonadotropin-releasing hormone receptor. *Mol Endocrinol* 6(7):1163-9.
- Tyler CR, Jobling S, Sumpter JP. 1998. Endocrine Disruption in Wildlife: A Critical Review of the Evidence. p 319-361.
- Tzchori I, Degani G, Hurvitz A, Moav B. 2004. Cloning and developmental expression of the cytochrome P450 aromatase gene (CYP19) in the European eel (*Anguilla anguilla*). *Gen Comp Endocrinol* 138(3):271-80.
- Vacher C, Ferrière F, Marmignon M-H, Pellegrini E, Saligaut C. 2002. Dopamine D2 receptors and secretion of FSH and LH: role of sexual steroids on the pituitary of the female rainbow trout. *General and Comparative Endocrinology* 127(2):198-206.
- van Aerle R, Kille P, Lange A, Tyler CR. 2008. Evidence for the existence of a functional Kiss1/Kiss1 receptor pathway in fish. *Peptides* 29(1):57-64.
- Van Der Kraak GJ, Munkittrick KR, McMaster ME, Portt CB, Chang JP. 1992. Exposure to bleached kraft pulp mill effluent disrupts the pituitary-gonadal axis of white sucker at multiple sites. *Toxicology and Applied Pharmacology* 115(2):224-233.

- Vetillard A, Bailhache T. 2006. Effects of 4-n-Nonylphenol and Tamoxifen on Salmon Gonadotropin-Releasing Hormone, Estrogen Receptor, and Vitellogenin Gene Expression in Juvenile Rainbow Trout. *Toxicological Sciences* 92(2):537-544.
- Vetillard A, Ferriere F, Jago P, Bailhache T. 2006. Regulation of salmon gonadotrophin-releasing hormone gene expression by sex steroids in rainbow trout brain. *J Neuroendocrinol* 18(6):445-53.
- Volkoff H, Peter RE. 1999. Actions of two forms of gonadotropin releasing hormone and a GnRH antagonist on spawning behavior of the goldfish *Carassius auratus*. *Gen Comp Endocrinol* 116(3):347-55.
- Vos JG, Dybing E, Greim HA, Ladefoged O, LambrÃ© C, Tarazona JV, Brandt I, Vethaak AD. 2000. Health Effects of Endocrine-Disrupting Chemicals on Wildlife, with Special Reference to the European Situation. *Critical Reviews in Toxicology* 30(1):71-133.
- Wang JM, Liu L, Brinton RD. 2008. Estradiol-17beta -Induced Human Neural Progenitor Cell Proliferation Is Mediated by an Estrogen Receptor -Phosphorylated Extracellularly Regulated Kinase Pathway. *Endocrinology* 149(1):208-218.
- Watanabe M, Tanaka M, Kobayashi D, Yoshiura Y, Oba Y, Nagahama Y. 1999. Medaka (*Oryzias latipes*) FTZ-F1 potentially regulates the transcription of P-450 aromatase in ovarian follicles: cDNA cloning and functional characterization. *Molecular and Cellular Endocrinology* 149(1-2):221-228.
- Weisbrod CJ, Kunz PY, Zenker AK, Fent K. 2007. Effects of the UV filter benzophenone-2 on reproduction in fish. *Toxicology and Applied Pharmacology* 225(3):255-266.
- White RB, Fernald RD. 1998. Ontogeny of Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Gene Expression Reveals a Distinct Origin for GnRH-Containing Neurons in the Midbrain. *Gen Comp Endocrinol* 112(3):322-329.
- Whitlock KE, Smith KM, Kim H, Harden MV. 2005. A role for *foxd3* and *sox10* in the differentiation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) cells in the zebrafish *Danio rerio*. *Development* 132(24):5491-5502.
- WHO. 2002. ICPS global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors. International Programme on Chemical Safety, WHO/PCS/EDC/02.2, Geneva, Switzerland.
- Wirsig-Wiechmann CR. 2001. Function of gonadotropin-releasing hormone in olfaction. *Keio J Med* 50(2):81-5.
- Wong TT, Ijiri S, Zohar Y. 2006. Molecular biology of ovarian aromatase in sex reversal: complementary DNA and 5'-flanking region isolation and differential expression of ovarian aromatase in the gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Biol Reprod* 74(5):857-64.
- Wray S. 2010. From Nose to Brain: Development of Gonadotrophin-Releasing Hormone -1 Neurones. *J Neuroendocrinol* 22(7):743-753.
- Xu H, Yang J, Wang YX, Jiang Q, Chen H, Song HY. 2008. Exposure to 17 alpha-ethynylestradiol impairs reproductive functions of both male and female zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology* 88(1):1-8.

- Yamamoto N, Oka Y, Kawashima S. 1997. Lesions of gonadotropin-releasing hormone-immunoreactive terminal nerve cells: effects on the reproductive behavior of male dwarf gouramis. *Neuroendocrinology* 65(6):403-12.
- Yang B, Jiang Q, Chan T, Ko WKW, Wong AOL. 2010. Goldfish kisspeptin: Molecular cloning, tissue distribution of transcript expression, and stimulatory effects on prolactin, growth hormone and luteinizing hormone secretion and gene expression via direct actions at the pituitary level. *Gen Comp Endocrinol* 165(1):60-71.
- Yu KL, Peter RE. 1990. Dopaminergic regulation of brain gonadotropin-releasing hormone in male goldfish during spawning behavior. *Neuroendocrinology* 52(3):276-83.
- Yu KL, Peter RE. 1992. Adrenergic and dopaminergic regulation of gonadotropin-releasing hormone release from goldfish preoptic-anterior hypothalamus and pituitary in vitro. *Gen Comp Endocrinol* 85(1):138-46.
- Yu KL, Rosenblum PM, Peter RE. 1991. In vitro release of gonadotropin-releasing hormone from the brain preoptic-anterior hypothalamic region and pituitary of female goldfish. *Gen Comp Endocrinol* 81(2):256-67.
- Zhang Y, Zhang W, Yang H, Zhou W, Hu C, Zhang L. 2008. Two cytochrome P450 aromatase genes in the hermaphrodite ricefield eel *Monopterus albus*: mRNA expression during ovarian development and sex change. *J Endocrinol* 199(2):317-31.
- Zupanc G. 2006. Neurogenesis and neuronal regeneration in the adult fish brain. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* 192(6):649-670.
- Zupanc GK. 2001. Adult neurogenesis and neuronal regeneration in the central nervous system of teleost fish. *Brain Behav Evol* 58(5):250-75.
- Zupanc GK, Hinsch K, Gage FH. 2005. Proliferation, migration, neuronal differentiation, and long-term survival of new cells in the adult zebrafish brain. *The Journal of Comparative Neurology* 488(3):290-319.

**Effets neuroendocrines des perturbateurs  
endocriniens chez le poisson zèbre (*Danio rerio*):**

*Etude du système à GnRH*

## Résumé

A ce jour, les effets des perturbateurs endocriniens (PE) sur les circuits neuroendocrines contrôlant la fonction de reproduction ont fait l'objet de très peu de travaux. Chez les vertébrés, l'élément majeur du contrôle central de la fonction de reproduction est la GnRH (Gonadotropin-Releasing Hormone). Le développement et l'activité des neurones à GnRH sont finement régulés, notamment par les hormones stéroïdes, ce qui les rend potentiellement sensibles aux PE. L'objectif de ce travail était d'étudier les effets neuroendocrines des xénoœstrogènes chez le poisson zèbre (*Danio rerio*). Nous montrons que le 17 $\alpha$ -éthynylestradiol (EE2) et le nonylphénol (NP) perturbent l'ontogenèse du système à GnRH au cours du développement précoce. De plus, nous démontrons que ces effets impliquent des récepteurs des œstrogènes. Parallèlement, nous mettons en évidence l'effet inducteur de l'EE2 et du NP sur l'expression de l'aromatase cérébrale, l'enzyme de synthèse des œstrogènes. L'ensemble de ces données souligne la nécessité de considérer les réseaux neuroendocrines comme des variables critiques et sensibles dans le domaine de la perturbation endocrinienne.

**Mots clés:** Gonadotropin-releasing-hormone (GnRH), aromatase B, perturbateurs endocriniens, poisson zèbre (*Danio rerio*).

## Abstract

Until now, studies dedicated to the actions of endocrine disrupting chemicals (EDCs) on the reproductive axis have focused on the gonads and peripheral organs leaving virtually unexplored their actions on neuroendocrine circuits controlling reproduction. In vertebrates, gonadotropin-releasing hormone (GnRH) is the key factor controlling the activity of the reproductive axis. The development and functioning of GnRH neurons are finely tuned, notably by sex steroids, making these neurons potential targets of EDCs. The aim of this work was to explore the neuroendocrine effects of xenoestrogens in the zebrafish (*Danio rerio*). We show that 17 $\alpha$ -ethynylestradiol (EE2) and nonylphenol (NP) disrupts the ontogeny of GnRH system during zebrafish early life stage. Moreover, we demonstrate that these effects involve functional estrogens receptors. In parallel, we report the inducing effects of EE2 and NP on the expression of brain aromatase protein, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. Altogether, these results highlight the need to consider neuroendocrine networks as critical and sensitive endpoints in the field of endocrine disruption.

**Keywords:** Gonadotropin-releasing-hormone (GnRH), aromatase B, endocrine disrupting chemicals, zebrafish (*Danio rerio*).