

Écotoxicité de l'exposition des larves du poisson zèbre aux mélanges EE2/A6: Un accent particulier sur la ligne latérale postérieure, PLL

Ahmed NASRI¹, Hamouda BEYREM¹, Ezzeddine MAHMOUDI¹, Mireille ROSSEL², Véronique PERRIER²

(Reçu le 09/10/2024; Accepté le 21/11/2024)

Résumé

La ligne latérale postérieure ou PLL est un système mécano-sensoriel présent chez les poissons et les amphibiens, qui permet la détection des mouvements de l'eau dans l'environnement. La stimulation de ce système conduit à une réponse comportementale adaptée, telle que la nage contre le sens du courant, la parade sexuelle, la détection des proies et des prédateurs. Il a disparu chez les organismes terrestres, notamment chez la plupart des tétrapodes, où il a été remplacé par une autre structure, l'oreille interne. L'objectif de notre présente étude est d'évaluer les effets des mélanges de perturbateurs endocriniens sur la régénération de la PLL du poisson zèbre. L'exposition des larves âgées de 24 h pendant 6 jours aux composés d'éthinylestradiol EE2 et de biopesticide A6 a provoqué un retard de la régénération de nerf et des cellules ciliées. Ces résultats pourraient conduire à des effets graves à long terme sur la plasticité et la réparation neuronale et suggèrent que la perte de cellules ciliées auditives est irréparable chez les mammifères, plus particulièrement chez l'être humain.

Mots clés: Ligne latérale postérieure (PLL), mélange d'EE2/A6, exposition, régénération, nerf, cellules ciliées

Ecotoxicity of EE2/A6 mixture to zebrafish larvae: Special emphasis on the posterior lateral line, PLL

Abstract

Posterior lateral line or PLL is a mechanosensory system present in fish and amphibians, which allows the detection of water movements in the environment. Stimulation of this system leads to an adapted behavioral response, such as swimming against the direction of the current, sexual display, detection of prey and predators. It has disappeared in terrestrial organisms, particularly in most tetrapods, where it has been replaced by another structure, the inner ear. The aim of our present study is to evaluate the effects of endocrine disruptor mixtures on zebrafish PLL regeneration. Exposure of 24-h-old larvae for 6 days to ethinylestradiol compounds EE2 and biopesticide A6 caused delayed nerve and hair cell regeneration. These results could lead to severe long-term effects on neuronal plasticity and repair and suggest that auditory hair cell loss is irreparable in mammals, especially in humans.

Keywords: Posterior lateral line (PLL), EE2/A6 mix, exposure, regeneration, nerve, hair cells

INTRODUCTION

Les milieux aquatiques représentent souvent l'exutoire ultime de nombreuses substances d'origine anthropique (Sumpter, 1998). Plusieurs travaux, menés en laboratoire ou dans le milieu naturel ont révélé des effets néfastes de ces substances sur la faune et notamment sur les poissons (Vos *et al.*, 2000). De nombreuses études ont établi un lien direct entre la présence de composés à action perturbateur endocrinien dans ces milieux et l'apparition des effets délétères de nombreuses fonctions vitales chez certains organismes aquatiques (Vos *et al.*, 2000).

La ligne latérale postérieure (PLL) du poisson zèbre est constituée d'un ensemble d'organes mécano-sensoriels, les neuromastes, disposés sur la surface du corps et répartis de manière équidistante à partir de la région otique jusqu'au niveau de la queue où on observe deux à trois neuromastes terminaux. Ces organes sont composés d'un groupe de cellules ciliées, entourées de cellules supports et qui sont innervées par des neurones sensoriels localisés dans les ganglions de la ligne latérale au niveau de la tête du poisson. Le signal nerveux est déclenché par la vibration des cils sous l'effet des mouvements de l'eau.

La ligne latérale postérieure (PLL) est formée par un nerf long et superficiellement localisé, et par des cellules ciliées des neuromastes qui sont localisées le long de la surface de corps et innervées par les axones sensoriels formant le nerf de la PLL (Ghysen et Dambly-Chaudière, 2004). Le

développement superficiel du nerf permet d'effectuer une lésion localisée. La dynamique de la régénération complète des axones a été étudiée chez les larves du poisson zèbre 24 heures après axotomie (Villegas *et al.*, 2012).

Les cellules ciliées des neuromastes du poisson zèbre présentent une morphologie et exécutent une fonction très semblables à celles de l'oreille interne des mammifères (Nicolson, 2005). Ces cellules sont externes et directement exposées à l'eau, où elles sont utilisées pour détecter la direction ainsi que les fluctuations et les changements de débit, ce qui aide le poisson à éviter les obstacles et les prédateurs et facilite également la détection des proies. Ces cellules ciliées peuvent se régénérer après des lésions via une trans-différenciation ou une prolifération des cellules supports (Burns et Corwin, 2013; Rubel *et al.*, 2013).

Plusieurs chercheurs ont démontré que les cellules ciliées de la ligne latérale sont sensibles à l'exposition à des composés chimiques. Le système de la ligne latérale du poisson zèbre est donc un modèle rapide et efficace pour évaluer les effets d'un grand nombre de molécules environnementales sur la régénération du nerf et des cellules ciliées mécano-sensorielles (Froehlicher *et al.*, 2009; Ou *et al.*, 2010). Dans ce contexte, une exposition des larves du poisson zèbre durant 6 jours a été effectuée, suivie soit d'une coupure laser du nerf ou d'une incubation des cellules ciliées à la CuSO₄ le 7^{ème} jour de développement, afin d'évaluer la régénération de ces organes les jours suivants.

¹ Laboratoire de Bio-surveillance de l'Environnement, Unité d'Écologie et Éco-toxicologie Côtières, Faculté des Sciences de Bizerte, Université de Carthage, Zarzouna, Tunisie

² Unité Mécanismes Moléculaires des Maladies Neuro-dégénératives, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Université de Montpellier, France

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Déclaration d'éthique

Les animaux ont été traités dans le laboratoire Inserm U1198 conformément aux directives éthiques nationales et européennes. Le présent protocole expérimental a été approuvé par l'INSERM et l'Université de Montpellier sous le numéro de permis (accord n° A34-172-37). Le poisson zèbre est un poisson d'eau douce originaire d'Asie du Sud-Est (Engeszer *et al.*, 2007). Sa petite taille, sa fécondité élevée, son cycle de vie court et sa reproduction facile en laboratoire sont des avantages pour les bio-essais toxicologiques. Le poisson zèbre est utilisé pour une variété d'études comportementales, développementales et éco-toxicologiques (Hill et Janz, 2003; Segner, 2009).

Expériences de traitement des embryons

Les poissons ont été manipulés selon la procédure standard du laboratoire (Westerfield, 2000). Les poissons adultes ont été maintenus à 28 °C, avec un rythme circadien de 14 h de lumière et 10 h d'obscurité, dans un système de recirculation et de flux continu où l'eau du réservoir est constamment filtrée. Les animaux ont été nourris deux fois par jour. Les embryons ont été obtenus à partir d'accouplements par paires. Les neurones chez les larves ont été visualisés dans la lignée *nbt-dsred* (Peri et Nüsslein-Volhard, 2008), et la régénération des cellules ciliées a été évaluée dans les larves *Brn3c:GFP*, où toutes les cellules ciliées expriment la protéine fluorescente verte GFP (DeCarvalho *et al.*, 2004). Les embryons ont été déchorionisés à 24 hpf pour des expositions expérimentales, puis maintenus dans l'incubateur dans des plaques à 6 puits. Dix à vingt embryons dans 2 ml de solution dans chaque puits ont été utilisés pour les études de la régénération des cellules nerveuses axonales (nerf) ou des cellules ciliées.

Évaluation des effets de mélange EE2/A6 sur la PLL

Régénération du nerf

Les embryons du poisson zèbre de lignée *nbt-dsred* ont été exposés entre 1 et 7 jpf (jours post fécondation) aux mélanges d'EE2/A6: MIX1= 0,5 nM/10 pM et MIX2= 50 nM/1000 pM ou au solvant témoin C (DMSO). Le nerf de la PLL des larves *nbt-dsred* exposées à ces concentrations a été coupé le 7^{ème} jour avec un système laser Micropoint (Photonics Instruments, Pittsfield, MA, USA) adapté à un microscope Zeiss Axioplan 2 équipé d'un objectif (×40) à immersion dans l'eau. Pour visualiser la régénération axonale les jours suivants (8, 9 et 10 jours), les larves ont d'abord été incubées pendant 5 min dans de l'iodure de 4-(4-diéthylaminostyryl)-N-méthylpyridinium (DiAsp 2 g/mL, Sigma), un colorant vital absorbé par les cellules ciliées des neuromastes (Graciarena *et al.*, 2014).

Les larves ont été ensuite anesthésiées et montées sur lame en dépression, et le nombre de neuromastes ré-innervés (détecté par la présence de branches axonales innervantes) a été évalué avec un Zeiss Axioimager équipé d'un objectif (×63) à immersion dans l'eau et d'une caméra Coolsnap. Le pourcentage de régénération fait référence au nombre de neuromastes ré-innervés par rapport au nombre total de neuromastes distaux de la coupe. Trois expériences indépendantes ont été réalisées pour l'étude de régénération du nerf de la PLL (n = 20) (Figure 1).

Régénération des cellules ciliées

Le protocole d'étude de la régénération des cellules ciliées consiste à traiter les embryons du poisson zèbre de lignée *Brn3c:GFP* âgées de 24 hpf avec les mélanges expérimentaux EE2/A6; MIX1=0,5 nM/10 pM, MIX2= 50 nM/1000 pM ou au solvant contrôle (DMSO) pendant une durée de 6 jours. Les larves ont été incubées ensuite le 7^e jour dans une

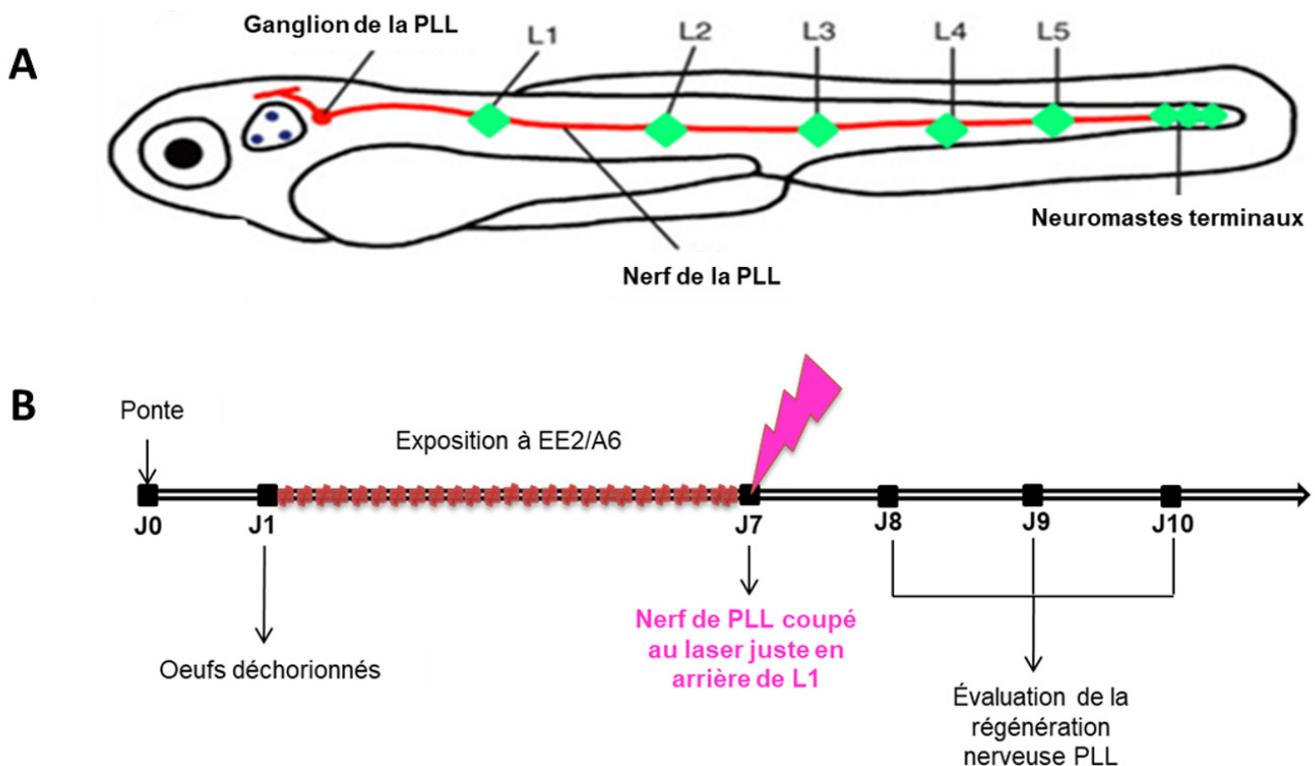


Figure 1: A) Ligne latérale postérieure PLL chez la larve du poisson zèbre de lignée *nbt-dsred*. (L1.....L5: neuromastes de la PLL), B) Protocole expérimentale d'exposition des larves du poisson zèbre au mélange EE2/A6

solution de sulfate de cuivre à 10 μ M durant 2 heures afin de tuer les cellules ciliées des neuromastes (d'Alençon *et al.*, 2010), puis remis de nouveau dans des puits contenant les concentrations des mélanges étudiés. Les jours suivants (8, 9 et 10), la régénération des cellules ciliées a été suivie à l'aide d'un microscope Zeiss Axioimager équipé d'un objectif ($\times 63$) à immersion dans l'eau et d'une caméra Coolsnap, en la comparant à un contrôle DMSO. Trois expériences indépendantes ont été réalisées, n = 20 larves pour chaque condition (Figure 2).

Analyse statistique des données

Une ANOVA unidirectionnelle suivie d'une HSD de Tukey a été utilisée pour des comparaisons multiples pour l'analyse de la régénération de nerf et des cellules ciliées. Les différences ont été considérées comme statistiquement significatives lorsque $p < 0,05$ (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

RÉSULTATS

Régénération axonale du nerf de la PLL

Les effets mélanges des deux composés sur la régénération des axones de la PLL ont été évalués après une coupure laser en présence d'un témoin (DMSO) à partir de 1 jpf, suivi d'une coupure du nerf PLL juste après L1 (premier neuromaste) à 7 jpf, conduisant à une dégénérescence complète du nerf distal des larves de lignée *nbt-dsred* après quelques heures. Le niveau de régénération des axones a ensuite été mesuré 24 h, 48 h et 72 h post coupure (Nasri *et al.*, 2016). La régénération axonale du nerf a été significativement retardée avec les faibles et les fortes concentrations des mixtures appliqués (Figure 3).

Régénération des cellules ciliées de la PLL

Les effets cocktail d'EE2/A6 sur la régénération des cellules ciliées ont été évalués après exposition des larves de lignée *Brn3c::GFP*. Le nombre de cellules ciliées régénérées a été compté après 24 h, 48 h et 72 h. Les résultats

montrent que le mélange testé a ralenti la régénération de ses cellules, des effets substantiels étant observés principalement avec la mixture des deux concentrations les plus élevées de deux perturbateurs endocriniens (Figure 4).

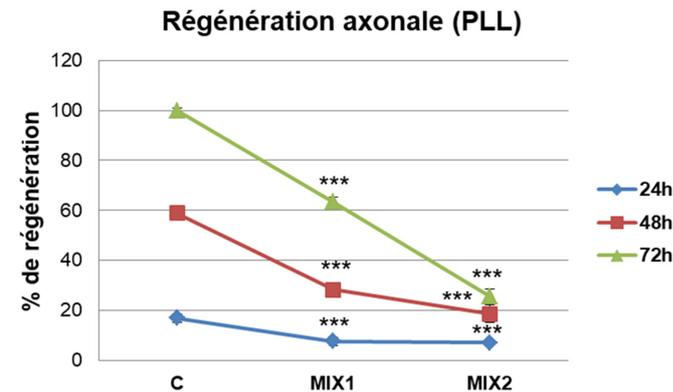


Figure 3: Régénération du nerf de la ligne latérale postérieure (PLL) des larves du poisson zèbre de lignée *nbt-dsred* après exposition au mélange de perturbateurs endocriniens EE2/A6

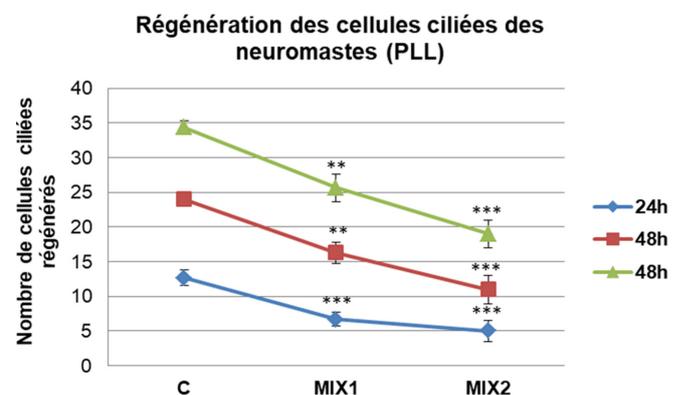


Figure 4: Régénération des cellules ciliées des neuromastes de la ligne latérale postérieure (PLL) des larves du poisson zèbre de lignée *Brn3c::GFP* après exposition au mélange de perturbateurs endocriniens EE2/A6

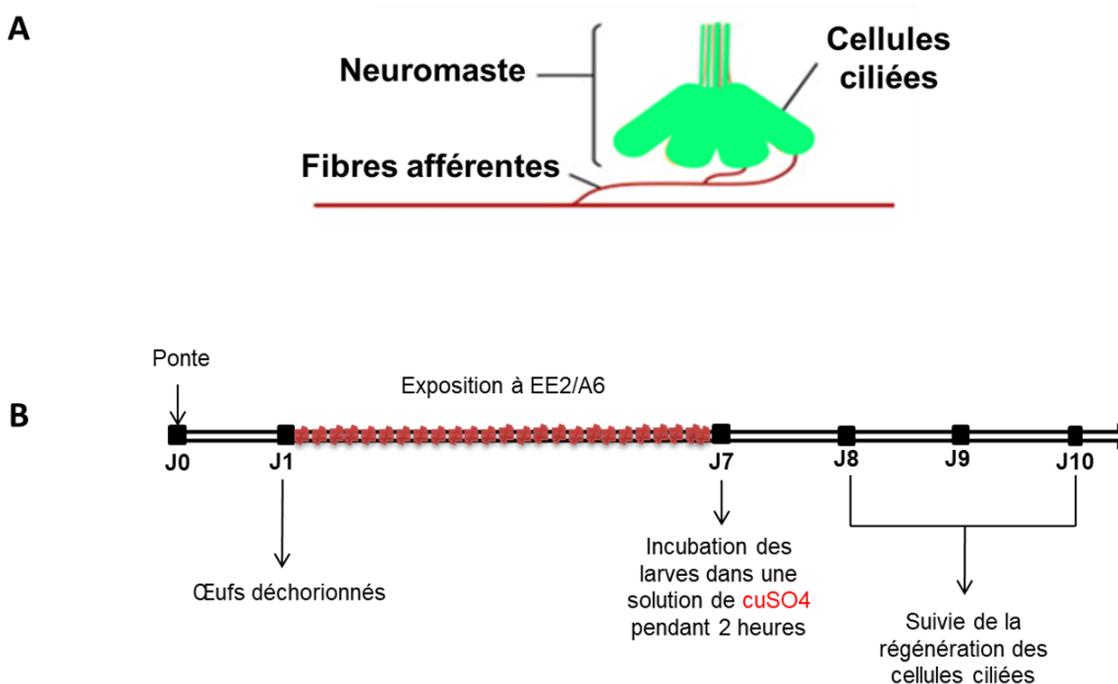


Figure 2: A: Les cellules ciliées des neuromastes de la ligne latérale postérieure PLL chez une larve du poisson zèbre de lignée *Brn3c::GFP*. B: Protocole expérimentale d'exposition des larves du poisson zèbre au mélange EE2/A6

DISCUSSION

Les perturbateurs endocriniens (PE) sont des composés qui interfèrent avec la signalisation hormonale (Zoeller *et al.*, 2012) en affectant la synthèse, la sécrétion, le transport, la liaison, l'action ou l'élimination des hormones naturelles (Kavlock *et al.*, 1996). Ce sont des molécules étrangères à l'organisme d'origine environnementale qui peuvent être des composés pharmaceutiques, des pesticides, aux modes d'actions complexes dont le plus documenté est celui de l'action via la liaison aux récepteurs à œstrogènes (ER). Toutefois, ils sont capables d'agir à de faibles concentrations, de l'ordre de nanomolaire sur des étapes très variées de la régulation endocrine, provoquant ainsi des altérations de plusieurs fonctions vitales comme le développement, la croissance et la reproduction. Jusqu'à présent, les recherches sur les PE se sont focalisées sur leurs effets sur les gonades et les tissus périphériques (la fonction de reproduction).

L'évaluation des effets de ces micropolluants est essentielle pour comprendre les conséquences biologiques à long terme. Dans ce contexte, nous avons utilisé le système sensoriel de la ligne latérale PLL facilement accessible pour évaluer les impacts de la mixture de deux perturbateurs endocriniens, le 17 α -Ethinylestradiol (EE2), un constituant actif des préparations contraceptives, qui entraîne la libération continue de cet œstrogène synthétique dans les eaux de surface, et A6, un biopesticide dérivé d'un pesticide naturel α -terthienyle (une molécule isolée des racines de la plante d'astéracée (*Tagetes erecta*) (Nivsarkar *et al.*, 2001). A6, présente des propriétés bleu-fluorescentes et susceptible d'exercer un effet perturbateur endocrinien (Nasri *et al.*, 2016) où il est relié structurellement à une autre classe de pesticides: les anilinoypyrimidines (cyprodinyle, pyriméthanyl et mepanipyrin) qui sont des PE (Fang *et al.*, 2013).

Les résultats de la présente étude ont montrés que le mélange de EE2/A6 à faible et forte concentrations a entraîné un ralentissement de la régénération des axones du nerf et des cellules ciliées des neuromastes de la ligne latérale postérieure PLL des larves du poisson zèbre après exposition durant 6 jours. Ces données suggèrent que ces composés peuvent avoir des effets graves à long terme sur la plasticité neuronale et la réparation à ces concentrations. Ces résultats peuvent donner une idée sur l'impact chez l'être humain. Cependant, la perte de cellules ciliées auditives (et les dommages auditifs ultérieurs) est irréversible chez les mammifères, et par conséquent le système auditif des mammifères ne peut pas être réparé par la régénération des cellules ciliées de toute façon que ce soit.

Nous pensons donc que le principal composant des effets neurotoxiques du mélange expérimental EE2/A6 sur les larves de poisson zèbre réside dans la capacité de ces deux composés testés de se lier aux récepteurs à œstrogènes. Les récepteurs à œstrogène ER sont exprimés dans les neuromastes (Froehlicher *et al.*, 2009), et impliqués dans le contrôle de la migration cellulaire au niveau de la ligne latérale postérieure du poisson zèbre (Gamba *et al.*, 2010). De plus, il a été démontré récemment que chez le poisson zèbre, les récepteurs à œstrogène (ER, gper) sont exprimés dans diverses régions du cerveau en développement, et que

la perturbation de l'expression de ces récepteurs entraîne un retard de croissance et des défauts morphologiques dans le cerveau en développement, avec une prolifération réduite des cellules cérébrales et des anomalies dans le développement des neurones sensoriels et moteurs (Yanan Shi *et al.*, 2013). Ces résultats sont tout à fait cohérents avec nos résultats de ralentissement de la régénération des cellules ciliées et des axones nerveuses après traitement avec le mélange EE2/A6.

CONCLUSION

En conclusion, les effets négatifs enregistrés relatifs au retard de la régénération des axones nerveuses et des cellules ciliées des neuromastes de la ligne latérale postérieure PLL sont initiés par la liaison des composés EE2/A6 aux récepteurs œstrogènes causant une altération des voies de signalisation de ces hormones. Toutes ces nouvelles données enrichissent la littérature scientifique et apportent des preuves supplémentaires sur les effets potentiels des perturbateurs endocriniens sur les organismes aquatiques et soulignent l'importance écotoxicologique des relations entre le développement nerveux et le système endocrinien.

RÉFÉRENCES

- Burns J.C., Corwin, J.T. (2013). A historical to present-day account of efforts to answer the question: what puts the brakes on mammalian hair cell regeneration? *Hearing research*, 297: 52-67.
- d'Alençon C.A., Peña O.A., Wittmann C., Gallardo V.E., Jones R.A., Loosli F., Liebel U., Grabher C., Allende M.L. (2010). A high-throughput chemically induced inflammation assay in zebrafish. *BMC biology*, 8: 151.
- DeCarvalho A.C., Cappendijk S.L., Fadool J.M. (2004). Developmental expression of the POU domain transcription factor Brn-3b (Pou4f2) in the lateral line and visual system of zebrafish. *Developmental dynamics*, 229: 869-876.
- Engeszer R.E., Patterson L.B., Rao A.A., Parichy D.M. (2007). Zebrafish in the wild: a review of natural history and new notes from the field. *Zebrafish* 4: 21-40.
- Fang C.C., Chen F.Y., Chen C.R., Liu C.C., Wong L.C., Liu Y.W., Su J.G. (2013). Cyprodinil as an activator of aryl hydrocarbon receptor. *Toxicology*, 304: 32-40.
- Froehlicher M., Liedtke A., Groh K.J., Neuhauss S.C., Segner H., Eggen R.I. (2009). Zebrafish (*Danio rerio*) neuromast: promising biological endpoint linking developmental and toxicological studies. *Aquatic toxicology*, 95: 307-319.
- Gamba L., Cubedo N., Ghysen A., Lutfalla G., Dambly-Chaudière C. (2010). Estrogen receptor ESR1 controls cell migration by repressing chemokine receptor CXCR4 in the zebrafish posterior lateral line system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107: 6358-6363.
- Ghysen A., Dambly-Chaudière C. (2004). Development of the zebrafish lateral line. *Current opinion in neurobiology*, 14: 67-73.
- Graciarena M., Dambly-Chaudière C., Ghysen A. (2014). Dynamics of axonal regeneration in adult and aging zebrafish reveal the promoting effect of a first lesion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111: 1610-1615.
- Hill R.L., Janz D.M. (2003). Developmental estrogenic exposure in zebrafish (*Danio rerio*): Effects on sex ratio and breeding success. *Aquatic toxicology*, 63: 417-429.
- 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 US EPA-sponsored workshop. *Environmental Health Perspectives*, 104: 715-740.

- Nasri A., Valverde A.J., Roche D.B., Desrumaux C., Clair P., Beyrem H., Chaloin L., Ghysen A., Perrier V. (2016.) Neurotoxicity of a Biopesticide Analog on Zebrafish Larvae at Nanomolar Concentrations. *International journal of molecular sciences*, 17: 2137.
- Nicolson T. (2005). The genetics of hearing and balance in zebrafish. *The Annual Review of Genetics*, 39: 9-22.
- Nivsarkar M., Cherian B., Padh H. (2001). Alpha-terthienyl: A plant-derived new generation insecticide. *Current Science*, 667-672.
- Ou H.C., Santos F., Raible D.W., Simon J.A., Rubel E.W. (2010). Drug screening for hearing loss: using the zebrafish lateral line to screen for drugs that prevent and cause hearing loss. *Drug discovery today*, 15: 265-271.
- Peri F., Nüsslein-Volhard C. (2008). Live imaging of neuronal degradation by microglia reveals a role for v0-ATPase a1 in Phagosomal fusion *in vivo*. *Cell*, 133: 916-927.
- Rubel E.W., Furrer S.A., Stone J.S. (2013). A brief history of hair cell regeneration research and speculations on the future. *Hearing research*, 297: 42-51.
- Segner H. (2009). Zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism for investigating endocrine disruption. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.*, 149: 187-195.
- Shi Y., Liu X., Zhu P., Li J., Sham K.W.Y., Cheng S.H., Li, S., Zhang Y., Cheng C.H.K., Lin H. (2013). G-protein-coupled estrogen receptor 1 is involved in brain development during zebrafish (*Danio rerio*) embryogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 435: 21-27.
- Sumpter J.P. (1998). Xenoendocrine disrupters - environmental impacts. *Toxicology Letters*, 103: 337-342.
- Villegas R., Martin S.M., O'Donnell K.C., Carrillo S.A., Sagasti A., Allende M.L. (2012). Dynamics of degeneration and regeneration in developing zebrafish peripheral axons reveals a requirement for extrinsic cell types. *Neural development*, 7: 19.
- Vos J.G., Dybing E., Greim H.A., Ladefoged O., Lambré 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. *Critical reviews in toxicology*, 30: 71-133.
- Westerfield M. (2000). *The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio)*. 4th ed. University of Oregon Press, Eugene, Oregon.
- Zoeller R.T., Brown T.R., Doan L.L., Gore A.C., Skakkebaek N.E., Soto A.M., Woodruff T.J., Vom Saal F.S. (2012). Endocrine-disrupting chemicals and public health protection: a statement of principles from The Endocrine Society. *Endocrinology*, 153: 4097-4110.