

47

Études chez les poissons et les amphibiens

Comme dans le cas des mammifères, relativement peu d'études ont encore été consacrées aux effets des RFB sur les poissons et les amphibiens. En termes d'espèces, c'est le zebrafish (*Danio rerio*) qui a été le plus largement utilisé, mais d'autres espèces comme le medaka (*Oryzias latipes*), le vairon (*Pimephales promelas*), le barbeau (*Barbus graellsii*), le flet (*Platichthys flesus*) ou les salmonidés ont été étudiées plus marginalement. Chez les amphibiens, de nombreuses études ont été menées chez *Xenopus laevis* et *Xenopus tropicalis* et sur plusieurs espèces de grenouilles. Ces études se sont concentrées sur la métamorphose et donc sur l'interférence avec les hormones thyroïdiennes. Devant le nombre de molécules différentes testées, les protocoles d'exposition utilisés et les différentes espèces choisies, il est encore difficile d'avoir une vue globale de la gamme d'effets générés par ces produits.

Effets sur la reproduction

Les effets des retardateurs de flammes sur la reproduction ne semblent pas majeurs, d'après les quelques études qui ont été publiées, qui rapportent des résultats contradictoires.

Un certain nombre de travaux indiquent des effets faibles ou carrément négatifs des PBDE seuls ou en mélange sur la reproduction. Ainsi, Kuiper et coll. (2008) ont traité des flets et des zebrafish adultes avec du penta-BDE (DE-71), les modes d'exposition étant via la nourriture (zebrafish, flet) et/ou via le sédiment (flet). Les doses cumulées retrouvées dans les animaux traités varient de 0,10 à 71 µg/g de poids sec. Aucun changement histopathologique n'a été observé au niveau des gonades des poissons traités ; aux plus fortes doses, une légère baisse de la production des œufs et de la survie larvaire est rapportée mais sa significativité n'est pas évidente. Dans une étude similaire, les mêmes auteurs rapportent une légère augmentation de l'activité aromatase, mais aucun effet sur la production de vitellogénine (Kuiper et coll., 2007b). Les auteurs concluent à un risque limité de ce mélange en termes de reprotoxicité des poissons aux doses retrouvées dans l'environnement. Les effets du BDE 47 sur le zebrafish ont été étudiés par Chou et coll. (2010) : le

composé a été administré via la nourriture depuis la période juvénile (21 jours après la naissance) jusqu'au jour 90. Des doses de 2,7 à 409 ng/g de tissus ont été mesurées chez les poissons traités mais aucun effet sur la fertilité, la taille des animaux ou leur taux de survie n'a été observé. L'histologie des gonades était normale.

Ces données contrastent avec celles de Muirhead et coll. (2006) qui ont traité des medaka et des vairons avec du BDE 47. Le type d'exposition a été différent chez les deux espèces, les medaka ayant reçu une dose unique oralement alors que les vairons ont été traités chaque jour pendant 25 jours. Dans les deux cas, le BDE 47 a été encapsulé dans des crustacés (*Artemia salina*) utilisés comme source de nourriture pour les poissons dans lesquels des doses significatives de BDE 47 ont été retrouvées (60 µg/g chez les femelles de vairon, 15 µg/g chez les mâles). Les femelles de vairon ont arrêté de produire des œufs après 10 jours d'exposition et globalement ont montré une production d'œufs inférieure à celle des témoins. Par ailleurs, les mâles présentaient une réduction de 50 % de la quantité de sperme mature comparés aux poissons non traités. De façon similaire, Kuiper et coll. (2007a) ont observé un effet reprotoxique du TBBPA chez le zebrafish. Dans cette étude, les poissons ont été traités pendant 30 jours à des doses allant jusqu'à 1,5 µM dans l'eau et les embryons issus de ces animaux traités ont été exposés aux mêmes concentrations jusqu'à 47 jours après l'éclosion. La production des œufs par les poissons traités (0,047 µM) est diminuée et l'histologie des ovaires révèle un accroissement des ovocytes prématures. L'éclosion des embryons traités est également diminuée et ces embryons présentent des anomalies morphologiques. De façon intéressante, les embryons traités montraient une dominance des femelles. Ces données suggèrent donc un effet reprotoxique prononcé dans les deux sexes ; la raison des différences avec les études précédentes n'est pas clarifiée.

Effets sur l'axe thyroïdien

Comme certains retardateurs de flamme bromés sont capables d'interagir avec la voie de signalisation des hormones thyroïdiennes chez les mammifères, plusieurs études menées chez les poissons ont étudié cette voie de signalisation. Ainsi, Kuiper et coll. (2007b) ont exposé de façon chronique au TBBPA ou HBCD des flets à des concentrations environnementales pertinentes (0,54 à 435 ng/ml de TBBPA ; 0,3 à 3 000 µg/g de nourriture pour le HBCD). Aucun effet évident sur des paramètres reproductifs n'a été observé mais ces auteurs ont noté une augmentation de la T4 plasmatique (mais pas de la T3) sans qu'ils ne puissent noter une altération histologique de la thyroïde. En utilisant le BDE 47 ajouté à la nourriture (2,4 ou 12,3 µg/g/j) de vairons pendant 21 jours, Lema et coll. (2008) ont décrit toute une série d'anomalies de l'axe thyroïdien : diminution de T4 plasmatique accompagnée par une augmentation de TSHβ dans l'hypophyse. Au niveau des récepteurs, les

auteurs observent une augmentation d'expression des transcrits TR α dans le cerveau des femelles et une diminution de TR β dans le cerveau des deux sexes. Finalement, Yu et coll. (2010) observent que le penta-BDE (DE-71) à 1, 3 ou 10 $\mu\text{g/l}$ dans l'eau à partir de la fécondation et pendant 14 jours induit une diminution de la T4 et une augmentation du CRH (qui joue le rôle de TRH) et de TSH β d'une façon dose dépendante. La transcription de gènes impliqués dans la synthèse de ces hormones (thyroglobuline, transporteur d'iode) et la transcription de gènes impliqués dans le développement de la thyroïde a été augmentée chez les poissons traités. De même, l'expression de deux déiodinases a été observée en augmentation par rapport aux témoins, les récepteurs étant pour leur part non affectés.

Chez les amphibiens, la quasi-totalité des études se sont concentrées sur les effets des retardateurs de flammes sur l'induction de la métamorphose. Comme celle-ci est induite par les hormones thyroïdiennes, cela a conduit les auteurs à discuter des interférences possibles entre ces molécules et la voie de signalisation de ces hormones. Ainsi, les BDE 47 et 99 ont été administrés via la nourriture à des têtards de *X. tropicalis* prémétamorphiques au stade 54 (Carlsson et coll., 2007). À une dose de 1 mg/g de nourriture, les deux composés sont toxiques et les têtards montrent un poids et une longueur plus faibles que les témoins. De plus, une réduction de paramètres de métamorphose a été observée, notamment sur les têtards traités au BDE 99. Des effets encore plus prononcés ont été observés dans une autre étude menée chez *X. laevis* où les BDE 47, 71 et 99 ont été utilisés (Balch et coll., 2006). Les BDE 71 et 47 entraînent un retard fort de la métamorphose à des doses respectivement de 60 μg et de 100 μg par têtard, une inhibition complète étant observée avec le BDE 71. En revanche, aucun effet n'a été observé avec le BDE 99, ce qui semble en contradiction avec l'étude précédente sans que cela ne soit expliqué. Chez *Rana pipiens*, d'autres auteurs ont également montré un effet de BDE 71 (7 à 277 ng/g de nourriture) : le climax de la métamorphose est retardé et la taille des animaux lors de la métamorphose est plus petite (Cary Coyle et Karasov, 2010). Chez *X. laevis*, le HBCD et le BDE 206 induisent également un effet de perturbation de l'effet inducteur des hormones thyroïdiennes sur la métamorphose à des doses de 100 à 1000 nM (Schriks et coll., 2006). Un effet similaire a été observé pour le TBBPA chez *Rana rugosa* à des concentrations de 10 nM à 1 μM et cet effet a été mis en relation avec une action d'inhibition du récepteur TR α humain (Kitamura et coll., 2005). Chez la grenouille *Pseudacris regilla*, des têtards exposés à 10 nM (5,4 $\mu\text{g/l}$) de TBBPA montrent au contraire un effet activateur sur des paramètres de la métamorphose : accroissement de la résorption de la queue, augmentation de l'expression de TR α , l'expression de TR β n'étant pas modifiée (Veldhoen et coll., 2006). Les auteurs concluent que, à ces doses faibles, le TBBPA potentialise les effets de l'hormone thyroïdienne, ce qui est en contradiction avec les autres études similaires. Ainsi, chez des xénopes transgéniques rapporteurs pour les hormones thyroïdiennes (TH-bZIP-GFP), Fini et coll. (2007) observent effectivement que le TBBPA à 1 μM induit une perturbation de la

réponse aux hormones thyroïdiennes. L'observation inverse observée chez la grenouille *Pseudacris regilla* reste donc inexplicée à ce jour et on ne sait pas si cet effet est lié à une spécificité d'espèce. Il faut cependant noter que dans un essai en culture organotypique de queues de *Rana catesbeiana* le TBBPA (10 à 1000 nM) n'a aucune activité de modification d'induction de TR β , un marqueur précoce de la métamorphose (Hinther et coll., 2010).

Ces données permettent d'affirmer que les retardateurs de flammes bromés ont un effet sur l'axe thyroïdien. Cependant, les effets semblent variables selon l'espèce, le produit testé ou le mode d'exposition (par exemple, taux de T4 qui augmente ou diminue selon les cas), ce qui pose la question de savoir précisément à quel niveau de l'axe se produit cette interférence. Par ailleurs, il est pour l'instant impossible d'établir un lien entre les effets (développementaux, sur la reproduction) de ces molécules et ces anomalies de l'axe thyroïdien.

Effets développementaux et autres

Des tests de toxicité aiguë du TBBPA ont été menés. Liu et coll. (2007) montrent qu'à 0,14 mg/l, 50 % des embryons présentent des anomalies à 72 h de développement (heures post-fécondation). De même, Kuiper et coll. (2007a) rapportent que des zebrafish dont les parents et les embryons ont été traités à des doses de TBBPA allant jusqu'à 1,5 μ M dans l'eau, présentent des anomalies morphologiques (malformations et œdème cardiaque). À des concentrations plus élevées, aucune éclosion n'est visible. Mc Cormick et coll. (2010) ont également observé une toxicité du TBBPA sur des embryons de zebrafish à 1,5 et 3 μ M, doses auxquelles 100 % de mortalité est observée. Les embryons présentaient un œdème et des hémorragies associées à un ralentissement des battements cardiaques et des malformations de la queue. Les auteurs ont associé ces malformations à une surexpression de certaines métalloprotéases comme MMP-2, MMP-9 ou MMP-13. Une autre étude montre que des embryons de zebrafish traités à l'HBBCD à 0,5 ou 1 mg/l présentent diverses malformations et une apoptose prononcée, associée à une diminution de l'expression de gènes anti-apoptotiques (*Mdm-2* et *Bcl-2*) et à une augmentation de l'activité des caspases 3 et 9 (Deng et coll., 2009). Chez le xénope, un effet tératogène du TBBPA a été mis en évidence à une dose de 1 mg/l : anomalies des yeux avec souvent absence de la rétine, de la pigmentation, canal anal élargi, œdème péricardique, nageoires étroites (Shi et coll., 2010).

Des données sur les effets développementaux ont également été obtenues avec le BDE 47 (Lema et coll., 2007). Des embryons exposés à des doses de 500 à 5 000 μ g/l montrent un délai d'éclosion, une courbure anormale du corps, une croissance ralentie, une arythmie cardiaque et des défauts de formation du système nerveux. Une étude similaire portant sur 4 PBDE

différents (BDE 47, 99, 153 et 209) montre également un effet développemental de ces molécules (Wahl et coll., 2010).

Deux études récentes rapportent des effets non liés aux études précédentes. La première s'intéressait au BDE 47 sur le zebrafish (Chou et coll., 2010). Le composé a été administré via la nourriture depuis la période juvénile (21 jours après la naissance) jusqu'au jour 90. Des doses de 2,7 à 409 ng/g de tissus humides ont été mesurées chez les poissons traités et aucun effet sur la fertilité, la taille des animaux ou leur taux de survie n'a été observé. L'histologie des gonades était normale. En revanche, ces auteurs ont noté un effet sur les paramètres de nage de poisson suivie par un système de vidéo : le temps d'activité des poissons et la distance parcourue par chaque animal sont inversement corrélés à la quantité de BDE 47 retrouvée dans les tissus ce qui suggère une atteinte comportementale.

La seconde étude a utilisé le saumon Chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) et a nourri des adultes avec une nourriture contenant un mélange de 5 PBDE (47, 99, 100, 153 et 154) (Arkoosh et coll., 2010). Deux concentrations différentes de PBDE différant par un facteur 10 ont été utilisées et des sommes totales de 270 à 1 400 ng/g de poids sec ont été retrouvées dans l'estomac des poissons traités. Les animaux ont été soumis à un test d'infection par la bactérie pathogène *Listonella anguillarum* et les animaux traités à la dose faible ont montré une plus grande susceptibilité à l'infection que les témoins. Curieusement, cet effet n'a pas été retrouvé aux plus hautes doses.

Bien que préliminaires, ces deux études suggèrent donc que la gamme des effets des retardateurs de flammes bromés, et notamment des PBDE, est plus vaste que ce que l'on pensait et cela justifie donc une surveillance accrue de ces molécules.

Études transcriptomiques et protéomiques

Des études globales, transcriptomiques ou protéomiques, ont été menées avec des retardateurs de flamme sur des modèles poissons.

Une de ces études a utilisé une approche transcriptomique pour étudier les effets d'un métabolite du BDE 47 sur le zebrafish sachant que ce composé, le 6-OH-BDE 47, est hautement toxique chez le zebrafish puisqu'il induit la mort par suffocation à des concentrations nanomolaires (van Boxtel et coll., 2008). Par une approche transcriptomique sur des fibroblastes embryonnaires de zebrafish, il a été montré que ce composé altère l'expression de gènes impliqués dans le transport des protons et le métabolisme des carbohydrates. Des études fonctionnelles ont montré en effet que ce composé bloque les phosphorylations oxydatives dans des mitochondries de zebrafish. Cette étude indique que certains types de PBDE peuvent avoir des effets très spécifiques et

qu'il est donc difficile de généraliser les effets et les modes d'action à l'échelle de l'ensemble des congénères.

Une approche transcriptomique a également été utilisée pour caractériser les effets d'un mélange « naturel » extrait de foies de poissons de rivière norvégiens (*Lota lota*) qui contenait des retardateurs de flamme (PBDE), des PCB et du DDT (Lyche et coll., 2010). Les zebrafish exposés à ce mélange ajouté dans leur nourriture présentaient une puberté précoce, un excès de mâles et une différence de poids par rapport aux témoins. Au niveau hépatique, ces poissons montrent un changement dans l'expression de gènes impliqués dans les réponses hormonales et la croissance. Ainsi, l'expression du coactivateur des récepteurs nucléaires NCoA3 est augmentée dans ces poissons. Il est bien impossible à ce stade de relier ces effets à l'une des molécules particulières présentes dans le mélange.

Des approches de protéomique ont été également conduites en utilisant là encore le zebrafish. Une première étude s'est focalisée sur le HBCD et le TBBPA, seuls ou en mélange. Une analyse par protéomique de cellules hépatiques de ces poissons montre que les deux molécules induisent des signatures distinctes avec cependant un certain chevauchement dans la réponse (Kling et Förlin, 2009). Le HBCD montre particulièrement un effet sur des gènes impliqués dans le métabolisme des protéines alors que le TBBPA semble cibler des gènes intervenant dans la conformation des protéines et dans la production de NADPH. La partie commune de la réponse concerne des gènes intervenant dans la gluconéogenèse ce qui semble indiquer un rôle métabolique. Des effets au niveau du cycle cellulaire sont également observés. Une autre étude menée sur des zebrafish adultes traités au TBBPA à 0,75 μM ou 1,5 μM pendant 14 jours a couplé des approches de transcriptomique et de protéomique (De Wit et coll., 2008). Ce travail montre une interférence du TBBPA avec les voies de réponses des hormones thyroïdiennes et de la vitamine A, ce qui, au moins pour les hormones thyroïdiennes est cohérent avec les études rapportées ci-dessus. Une réponse au niveau des mécanismes de stress oxydatif et du métabolisme des glucides est également observée.

En conclusion, les retardateurs de flammes semblent avoir un effet relativement mineur au niveau reprotoxique chez les vertébrés aquatiques. En revanche, les différentes molécules, et en particulier le TBBPA et certains PBDE, ont un effet développemental marqué et produisent diverses anomalies morphologiques chez les embryons traités. Le mécanisme d'action le plus convaincant observé à ce jour chez les poissons semble cibler la voie des hormones thyroïdiennes. Les quelques approches « omiques » vont dans le même sens tout en indiquant également un effet au niveau du métabolisme, notamment sur le foie. Toute généralisation apparaît impossible car il est probable que les différentes molécules (TBBPA, PBDE, HBCD) ont des effets, des mécanismes d'action et des cibles différents.

BIBLIOGRAPHIE

ARKOOSH MR, BOYLEN D, DIETRICH J, ANULACION BF, GINAYLITALO, et coll. Disease susceptibility of salmon exposed to polybrominated diphenyl ethers (PBDEs). *Aquat Toxicol* 2010, **98** : 51-59

BALCH G, METCALFE C. Developmental effects in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to nonylphenol ethoxylates and their degradation products. *Chemosphere* 2006, **62** : 1214-1223

CARLSSON G, KULKARNI P, LARSSON P, NORRGREN L. Distribution of BDE-99 and effects on metamorphosis of BDE-99 and -47 after oral exposure in *Xenopus tropicalis*. *Aquat Toxicol* 2007, **84** : 71-79

CARY COYLE TL, KARASOV WH. Chronic, dietary polybrominated diphenyl ether exposure affects survival, growth, and development of *Rana pipiens* tadpoles. *Environ Toxicol Chem* 2010, **29** : 133-141

CHOU CT, HSIAO YC, KO FC, CHENG JO, CHENG YM, CHEN TH. Chronic exposure of 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (PBDE-47) alters locomotion behavior in juvenile zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat Toxicol* 2010, **98** : 388-395

DENG J, YU L, LIU C, YU K, SHI X, coll. Hexabromocyclododecane-induced developmental toxicity and apoptosis in zebrafish embryos. *Aquat Toxicol* 2009, **93** : 29-36

DE WIT M, KEIL D, REMMERIE N, VAN DER VEN K, VAN DEN BRANDHOF EJ, coll. Molecular targets of TBBPA in zebrafish analysed through integration of genomic and proteomic approaches. *Chemosphere* 2008, **74** : 96-105

HINTHER A, DOMANSKI D, VAWDA S, HELBING CC. C-fin : a cultured frog tadpole tail fin biopsy approach for detection of thyroid hormone-disrupting chemicals. *Environ Toxicol Chem* 2010, **29** : 380-388

FINI JB, LE MEVEL S, TURQUE N, PALMIER K, ZALCO D, coll. An in vivo multiwell-based fluorescent screen for monitoring vertebrate thyroid hormone disruption. *Environ Sci Technol* 2007, **41** : 5908-5014

KITAMURA S, KATO T, IIDA M, JINNO N, SUZUKI T, coll. Anti-thyroid hormonal activity of tetrabromobisphenol A, a flame retardant, and related compounds : Affinity to the mammalian thyroid hormone receptor, and effect on tadpole metamorphosis. *Life Sci* 2005, **76** : 1589-1601

KLING P, FÖRLIN L. Proteomic studies in zebrafish liver cells exposed to the brominated flame retardants HBCD and TBBPA. *Ecotoxicol Environ Saf* 2009, **72** : 1985-1993

KUIPER RV, VAN DEN BRANDHOF EJ, LEONARDS PE, VAN DER VEN LT, WESTER PW, VOS JG. Toxicity of tetrabromobisphenol A (TBBPA) in zebrafish (*Danio rerio*) in a partial life-cycle test. *Arch Toxicol* 2007a, **81** : 1-9

KUIPER RV, CANTÓN RF, LEONARDS PE, JENSSEN BM, DUBBELDAM M, coll. Long-term exposure of European flounder (*Platichthys flesus*) to the flame-retardants tetrabromobisphenol A (TBBPA) and hexabromocyclododecane (HBCD). *Ecotoxicol Environ Saf* 2007b, **67** : 349-60

KUIPER RV, VETHAAK AD, CANTÓN RF, ANSELMO H, DUBBELDAM M, coll. Toxicity of analytically cleaned pentabromodiphenylether after prolonged exposure in estuarine

European flounder (*Platichthys flesus*), and partial life-cycle exposure in fresh water zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 2008, **73** : 195-202

LEMA SC, SCHULTZ IR, SCHOLZ NL, INCARDONA JP, SWANSON P. Neural defects and cardiac arrhythmia in fish larvae following embryonic exposure to 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (PBDE 47). *Aquat Toxicol* 2007, **82** : 296-307

LEMA SC, DICKEY JT, SCHULTZ IR, SWANSON P. Dietary exposure to 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (PBDE-47) alters thyroid status and thyroid hormone-regulated gene transcription in the pituitary and brain. *Environ Health Perspect* 2008, **116** : 1694-1649

LIU HL, LIU XH, WANG XY, WANG XR, YU HX. Toxicity of BPA and TBBPA to *Daphnia magna* and zebrafish *Brachydanio rerio*. *Huan Jing Ke Xue* 2007, **28** : 1784-1787

LYCHE JL, NOURIZADEH-LILLABADI R, ALMAAS C, STAVIK B, BERG V, coll. Natural mixtures of persistent organic pollutants (POP) increase weight gain, advance puberty, and induce changes in gene expression associated with steroid hormones and obesity in female zebrafish. *J Toxicol Environ Health A* 2010, **73** : 1032-1057

MCCORMICK JM, PAIVA MS, HÄGGBLOM MM, COOPER KR, WHITE LA. Embryonic exposure to tetrabromobisphenol A and its metabolites, bisphenol A and tetrabromobisphenol A dimethyl ether disrupts normal zebrafish (*Danio rerio*) development and matrix metalloproteinase expression. *Aquat Toxicol* 2010, **100** : 255-262

MUIRHEAD EK, SKILLMAN AD, HOOK SE, SCHULTZ IR. Oral exposure of PBDE-47 in fish : toxicokinetics and reproductive effects in Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) and fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environ Sci Technol* 2006, **40** : 523-528

SCHRIKS M, ZVINAVASHE E, FURLOW JD, MURK AJ. Disruption of thyroid hormone-mediated *Xenopus laevis* tadpole tail tip regression by hexabromocyclododecane (HBCD) and 2,2',3,3',4,4',5,5',6-nona brominated diphenyl ether (BDE206). *Chemosphere* 2006, **65** : 1904-1908

SHI H, QIAN L, GUO S, ZHANG X, LIU J, CAO Q. Teratogenic effects of tetrabromobisphenol A on *Xenopus tropicalis* embryos. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2010, **152** : 62-68

VAN BOXTEL AL, KAMSTRA JH, CENIJN PH, PIETERSE B, WAGNER JM, coll. Microarray analysis reveals a mechanism of phenolic polybrominated diphenylether toxicity in zebrafish. *Environ Sci Technol* 2008, **42** : 1773-1779

VELDHOEN N, BOGGS A, WALZAK K, HELBING CC. Exposure to tetrabromobisphenol-A alters TH-associated gene expression and tadpole metamorphosis in the Pacific tree frog *Pseudacris regilla*. *Aquat Toxicol* 2006, **78** : 292-302

WAHL M, GUENTHER R, YANG L, BERGMAN A, STRAEHLE U, coll. Polybrominated diphenyl ethers and arylhydrocarbon receptor agonists : Different toxicity and target gene expression. *Toxicol Lett* 2010, **198** : 119-126

YU L, DENG J, SHI X, LIU C, YU K, ZHOU B. Exposure to DE-71 alters thyroid hormone levels and gene transcription in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis of zebrafish larvae. *Aquat Toxicol* 2010, **97** : 226-233. Erratum in: *Aquat Toxicol* 2010, **100** : 376