

17

Méthodes d'étude *in vitro*

Les tests *in vitro* sont des outils performants pour réaliser des criblages d'activité de substances environnementales capables de perturber les fonctions endocrines. Il existe de nombreux tests *in vitro*, certains permettent de caractériser l'activité d'une substance vis-à-vis d'un récepteur hormonal (mesure biochimique de la liaison à un récepteur, étude de l'expression de gènes cibles endogènes ou rapporteurs dans des lignées cellulaires), d'autres permettent de caractériser l'effet vis-à-vis d'un paramètre de la fonction de reproduction (apoptose ou prolifération des cellules issues d'un organe participant à la reproduction, dosage des taux d'hormones sexuelles sécrétées par des cellules endocrines).

Ces tests permettent de mesurer une activité *in vitro* mais il est ensuite nécessaire de confirmer cette activité par des tests *in vivo*.

Méthodes biochimiques mesurant la liaison à un récepteur nucléaire

Parmi les méthodes biochimiques, le test le plus répandu est celui de la compétition de liaison pour un ligand radiomarqué au récepteur nucléaire. La source de récepteur peut être du récepteur extrait à partir d'organes (utérus d'agnelle), de cellules (lignée de cancer du sein MCF-7) ou recombinant produit dans *E. coli* ou dans baculovirus pour les ER, AR, PPAR ou TR. Le ligand radioactif est de l'œstradiol pour les ER, du R1881 (méthyltriénonolone) ou de la dihydrotestostérone pour AR, de la rosiglitazone pour PPAR γ ou de l'hormone thyroïdienne pour TR. Ces ligands sont commercialisés sous forme tritiée. Le principe de la technique consiste à mesurer le déplacement du ligand radioactif lié au récepteur par la molécule à tester. L'expérience permet de calculer une affinité relative (en comparaison avec celle du ligand de référence) pour le récepteur. Elle renseigne donc sur l'affinité mais pas sur la nature agoniste ou antagoniste de la molécule. Ces tests sont actuellement validés ou en cours de validation par l'ECVAM (*European Centre for the Validation of Alternative Methods*) ou l'EPA (*US Environmental Protection Agency*).

Des variantes de ce test utilisant des ligands fluorescents sont possibles. Ces tests ont été développés pour les adapter au format plaques de 96-, 384- ou

1 536 puits. L'avantage de ces variantes est qu'elles sont mieux adaptées à un criblage de molécules à haut débit et qu'elles n'utilisent pas de radioactivité.

Les récepteurs nucléaires selon qu'ils sont liés à une molécule agoniste ou antagoniste adoptent une conformation agoniste ou antagoniste et lient soit des facteurs d'activation de la transcription soit des facteurs de répression. Des techniques fluorescentes permettent également d'étudier l'interaction entre un récepteur et des petits peptides mimant ces coactivateurs ou ces corépresseurs. Il est ainsi possible de déterminer si une molécule est agoniste ou antagoniste par ces techniques qui ne sont pas encore validées mais sont largement utilisées par l'industrie pharmaceutique.

L'inconvénient majeur des techniques biochimiques est qu'elles ne permettent pas de mesurer l'activité de perturbation endocrine de métabolites des substances testées.

Méthodes mesurant des effets cellulaires

Apoptose et fragmentation de l'ADN

L'apoptose peut être mesurée par de nombreuses méthodes, cytométrie de flux, migration en gel d'agarose (échelle d'ADN), immunohistochimie, Western Blot, dosage d'activités enzymatiques (caspases). Quelques techniques sont couramment employées. Au sein des tissus, l'apoptose peut être recherchée par la détection immunologique des formes clivées/activées des caspases, protéases initiatrices ou exécutrices de l'apoptose. Par exemple, la détection immunocytochimique de la caspase-3 clivée, sert couramment à mettre en évidence la présence de cellules apoptotiques. Ceci permet par exemple de connaître le taux (pourcentage) d'un type cellulaire entré en apoptose. L'activation d'autres caspases (8 ou 9) permet de raffiner l'étude en précisant les voies apoptotiques activées : intrinsèques ou extrinsèques. La recherche de l'activation de caspases peut également être effectuée par Western Blot, qui permet de visualiser le clivage activateur de ces enzymes ou par la mesure de l'activité enzymatique des caspases à l'aide de substrats fluorescents. Cependant, dans ces cas il est difficile de préciser le type cellulaire atteint au sein de tissus généralement hétérogènes. Une autre façon de mesurer l'apoptose est la détection de la fragmentation de l'ADN. Ceci est couramment réalisé par la technique Tunel (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*) qui marque les extrémités 3'OH libres de l'ADN. La technique Tunel détecte la dernière étape de l'apoptose et peut se pratiquer sur des coupes de tissus.

Mesure de la prolifération cellulaire

Le cycle cellulaire est constitué par la succession de quatre phases : G1, S, G2 et M. La prolifération cellulaire est fréquemment mesurée dans des lignées

cellulaires ou au sein d'un tissu par la détection immunologique de PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*), Ki67, pRb, pH3, p27, p21 ou par la mesure de l'incorporation de BrdU (5, bromo-desoxy-uridine). Dans la plupart des cas, l'index de prolifération est défini comme le pourcentage des cellules, d'un même type cellulaire présentant un marquage pour l'un de ces antigènes. Ces marqueurs sont fréquemment utilisés en oncologie. Le BrdU est un analogue de thymidine qui s'incorpore au cours de la phase S, phase de réplication de l'ADN. Ki67 et PCNA sont des marqueurs de cellules en prolifération : PCNA est une protéine qui fait partie du complexe de réplication de l'ADN, le réplisome ; Ki67, est un facteur nucléaire exprimé tout au long du cycle cellulaire mais absent des cellules en quiescence. La pH3 ou phospho-histone H3 correspond à l'histone 3 phosphorylée. Cette phosphorylation se produit au moment de la phase M, phase de division, du cycle cellulaire. La détection de pH3 permet donc de détecter les cellules mitotiques. La pRb ou protéine du rétinoblastome bloque le cycle cellulaire en phase G1 en séquestrant le facteur de transcription E2F. Enfin, p21 et p27 sont également des freins cellulaires en relation avec les complexes cyclines/CDK.

Dosages hormonaux RIA/ELISA

Les dosages hormonaux concernant les principaux stéroïdes sont fréquemment effectués sous forme de dosage radio-immunologique (RIA), mettant en compétition un stéroïde « froid » avec le même stéroïde sous une forme marquée, radioactive pour un anticorps spécifique. Ces méthodes ont généralement de bonnes sensibilités, de l'ordre de quelques ng/ml. Des dosages sans compétition, dans lesquels l'anticorps est en excès sont également possibles. Depuis quelques années, l'utilisation de la radioactivité tend à diminuer et est remplacée par des dosages reposant sur l'activité enzymatique (Elisa) ou sur la fluorescence.

Pour la mesure de la testostérone, une donnée importante est de savoir si la mesure est effectuée à partir du plasma ou dans le testicule même. En effet, les taux de testostérone intra-testiculaire sont beaucoup plus importants que les taux circulants et également moins variables.

Technique Comet : mesure des dommages/réparation de l'ADN

Les dommages à l'ADN peuvent être mesurés par la technique Comet. Cette méthode est fréquemment appliquée aux spermatozoïdes dans lesquels l'intégrité de l'ADN est primordiale pour la transmission d'une information génétique de bonne qualité à la génération suivante. La technique Comet (ou *single cell gel electrophoresis*) repose sur la capacité à « dérouler » l'ADN nucléaire dans des conditions de pH élevé puis une électrophorèse permettra de faire sortir les brins d'ADN brisés. Ces brins forment alors une queue d'un seul côté de la tête (noyau) qui donne ainsi l'image caractéristique de « comète ». L'ADN est alors quantifié à l'aide d'un logiciel d'analyse d'image

qui détermine la quantité d'ADN qui a migré à la « queue » et l'ADN restant à la « tête ».

Méthodes *in vitro* sur cultures cellulaires

Les méthodes *in vitro* sur cultures cellulaires sont un bon compromis entre les méthodes biochimiques et les méthodes *in vivo*. Les tests sur cellules permettent de mesurer l'activité de perturbation endocrine de métabolites des substances testées, en fonction des capacités métaboliques des cellules utilisées. Elles intègrent plusieurs actions des perturbateurs endocriniens (métabolisme, transport, liaison aux protéines, activation de récepteurs, expression de gènes). Différents types de tests existent pour mesurer les activités œstrogéniques ou androgéniques de composés chimiques.

Étude de l'expression de gènes endogènes

Ces techniques consistent à mesurer l'expression de protéines qui sont sous le contrôle des œstrogènes ou des androgènes. Pour les œstrogènes, c'est par exemple la vitellogénine dans les hépatocytes de truite ou le récepteur de la progestérone, la protéine pS2 dans des lignées cellulaires de cancer du sein MCF-7. Pour les androgènes, c'est par exemple la protéine *spiggin* chez le poisson épinoche et la PSA (antigène spécifique de la prostate) dans les lignées cellulaires de cancer de prostate LNCAP.

La mesure de l'expression se fait par des techniques de biologie moléculaire (RT-PCR quantitative), biochimiques (western) ou immunologiques. Ces techniques ne sont pas toujours adaptées à un criblage à haut débit.

Un des tests les plus répandus utilisant une réponse endogène de cellules est le E-screen (Soto et coll., 1995). Ce test consiste à mesurer l'effet de molécules sur la prolifération des cellules de cancer du sein MCF-7 (ER α positives) qui est dépendante des œstrogènes. Ce test permet de déterminer la nature agoniste (la prolifération est activée) ou antagoniste (la prolifération en présence d'œstradiol est inhibée) d'une molécule. L'inconvénient de ce test est que la toxicité d'un produit peut masquer une activité agoniste ou laisser croire qu'il est antagoniste.

Une variante de ce test, le A-screen, permet de mesurer l'activité androgénique d'une molécule (Szelei et coll., 1997). Ce test est réalisé à partir de cellules MCF-7 qui sur-expriment le récepteur des androgènes (AR). Dans ces cellules, la prolifération induite par l'œstradiol est inhibée par les ligands agonistes de AR. Le test consiste donc à traiter des cellules par des concentrations saturantes d'œstradiol et ensuite à mesurer l'effet antiprolifératif des molécules à tester. Si un effet antiprolifératif est observé, il ne peut pas être dû à un effet anti-œstrogénique, car l'œstradiol est présent en forte concentration, mais à un effet passant par AR.

De même, le T-screen est un test de prolifération qui permet de mesurer un effet agoniste ou antagoniste de ligands des récepteurs des hormones thyroïdiennes (TR). Ce test est réalisé dans la lignée cellulaire pituitaire de rat GH3 (Gutleb et coll., 2005).

Pour tester l'activité de ligands du récepteur PPAR γ , la lignée cellulaire la plus utilisée est la lignée de fibroblastes murins NIH3T3-L1. Ces cellules, après un prétraitement permettant un début de différenciation adipocytaire, ont la capacité de se différencier complètement en adipocytes après un traitement avec un ligand de PPAR γ comme la rosiglitazone (Tontonoz et coll., 1994). La différenciation peut alors être mesurée en colorant les gouttelettes lipidiques à l'huile rouge ou en mesurant l'expression de deux gènes cibles de PPAR γ , PPAR γ lui-même et l'apolipoprotéine A2.

La forme active de ce récepteur étant l'hétérodimère RXR-PPAR γ , cette technique a également permis de mesurer l'activité de ligands environnementaux de RXR comme les organoétains.

Étude de l'expression de gènes rapporteurs

La technique consiste à déterminer le taux d'expression d'un gène rapporteur sous le contrôle d'un récepteur nucléaire. Réalisée de façon transitoire ou stable dans des levures ou dans des cellules de poisson ou des cellules humaines, elle est devenue la technique la plus répandue pour tester avec un grand débit l'activité œstrogénique ou androgénique de molécules. Les avantages des modèles de levure résident dans le fait qu'ils sont plus facilement manipulables. Leurs inconvénients sont liés aux différences de perméabilité et de métabolisme avec les cellules humaines. C'est pour ces raisons que les modèles qui se développent le plus sont des modèles cellulaires humains qui expriment soit une luciférase soit une enzyme avec un substrat fluorescent (bêta-galactosidase) sous le contrôle d'un promoteur qui répond aux œstrogènes ou aux androgènes.

De nombreux modèles cellulaires existent. Deux lignées cellulaires bioluminescentes dont deux (MELN pour les œstrogènes, PALM pour les androgènes) sont actuellement en validation à l'ECVAM (Escande et coll., 2006 ; Molina-Molina et coll., 2008 ; Kinani et coll., 2010). Il existe également des lignées commercialisées, ER Calux ou AR Calux (Van der Linden et coll., 2008), ER, AR, TR ou PPAR γ Geneblazer ou disponibles à l'ATCC (T47D-Kb2luc pour ER α et MDAkb2 pour AR). Alors que ces modèles issus de transfection stable ne permettent d'étudier qu'une cible à la fois, une technique originale (développée par la compagnie Attagene) permet de discriminer l'effet d'une molécule sur plus d'une cinquantaine de cibles à la fois. Tous ces différents modèles cellulaires utilisant soit une détection par luminescence soit par fluorescence sont bien adaptés à un criblage à haut débit de la nature agoniste ou antagoniste œstrogénique ou androgénique de molécules.

Méthodes utilisant des cultures d'organes

À l'exception de lignées de cellules cancéreuses, peu de modèles *in vitro* fiables ont été développés pour étudier la fonction de reproduction humaine. La culture organotypique de gonades fœtales est une alternative ; bien que sortie du contexte endocrinien, celle-ci permet de tester directement l'effet d'une substance donnée sur une gonade fœtale humaine. Ce type de modèle requiert un partenariat privilégié entre les laboratoires capables de la mettre en œuvre et des services hospitaliers ce qui, outre le peu de matériel disponible, fait que très peu d'équipes utilisent de tels protocoles. Ceux-ci sont donc peu standardisés à l'heure actuelle.

La culture organotypique est le fait de cultiver tout ou une partie d'un tissu sans procéder à une dissociation cellulaire. Ce type de modèle comporte de nombreux avantages. Il permet de conserver l'architecture tri-dimensionnelle du tissu et les interactions paracrines entre différents types cellulaires. Cette conservation des interactions paracrines est primordiale pour reproduire fidèlement le développement d'un tissu et est généralement perdue lors de cultures primaires de cellules dissociées. Par exemple, dans la gonade, le développement des cellules germinales est étroitement dépendant du dialogue entretenu par celles-ci avec les cellules somatiques. Ce modèle permet en outre de mesurer l'effet d'une substance directement sur le tissu biologique d'intérêt en s'affranchissant des effets dus à une action indirecte via un autre tissu.

La culture organotypique a été réalisée pour l'étude des gonades au cours du développement chez les rongeurs. Ainsi le développement du testicule fœtal et postnatal de rat ou de souris peut être reproduit de manière fidèle dans un milieu de composition définie (Livera et coll., 2006) et les fonctions de la gonade telles que la sécrétion de testostérone ou la prolifération des cellules germinales, précisément mesurées.

Des modèles semblables ont été proposés pour l'étude du développement ovarien, des gonades de grands mammifères et surtout pour les gonades fœtales humaines. Notons qu'il s'agit ici du seul modèle expérimental permettant de démontrer l'effet de substances reprotoxiques sur le testicule fœtal humain (Lambrot et coll., 2006).

Chez les rongeurs, ce modèle permet de réduire sensiblement le nombre d'animaux utilisés puisque pour chaque fœtus un testicule sert de témoin et le testicule contralatéral du même animal est exposé à un taux précisément connu de la substance à tester, taux qui ne dépend pas du métabolisme ou du catabolisme spécifique de l'espèce l'animale. Ainsi pour une femelle gestante, plusieurs doses peuvent être testées en utilisant l'ensemble de ces fœtus. Les paires de gonades de chaque fœtus peuvent être exploitées l'une servant de témoin (non exposée). L'utilisation du testicule contralatéral du même animal permet également une mesure très fine des effets, limitant la variation

inter-individus, et donc le nombre d'animaux pour atteindre un effet statistiquement significatif. Enfin, *in vivo* le taux circulant du (ou des) composé(s) actif(s) peut être différent d'une espèce à l'autre ou même d'un sexe à l'autre pour l'exposition à dose équivalente à un même composé ce qui limite les comparaisons, tel n'est pas le cas dans ce modèle.

Notons cependant qu'il existe des limites à la pertinence de ce type de modèle. Ainsi de nombreuses variations de protocoles inter-laboratoires subsistent aboutissant parfois à l'obtention de résultats sensiblement différents pour une même substance. Par ailleurs, si tester l'effet direct d'une substance sur un tissu donné est un avantage, la réponse à cette même substance dans le contexte du dialogue endocrinien *in vivo* (par exemple entre la gonade et l'axe hypothalamus et hypophyse) peut parfois être différente. Enfin, dans ce modèle, en général, seul l'effet du métabolite principal d'une substance est mesuré alors que *in vivo* les gonades peuvent être exposées à une famille complexe de métabolites correspondant à une seule substance mère.

En résumé, la culture organotypique est un outil qui permet d'appréhender de manière fine les effets d'une substance et de détailler son mécanisme d'action sur les fonctions physiologiques. Elle ne peut pas remplacer les tests *in vivo* mais permet à l'heure actuelle la mise en évidence de mécanismes d'actions de substances reprotoxiques. Dans un futur proche, la combinaison de modèles de culture organotypique et d'animaux transgéniques pourrait permettre d'identifier au sein d'un tissu donné l'activité de substances androgéniques ou œstrogéniques et surtout de démontrer le mode d'action à l'aide de souris mutantes pour différents récepteurs (récepteur aux androgènes, récepteurs aux œstrogènes, récepteurs PPAR...).

L'étude de la spermatogenèse requiert *a minima* des systèmes complexes de co-culture de cellules de Sertoli, cellules somatiques nourricières polarisées, et de cellules germinales. Un type de modèle réunissant ces paramètres a été publié par le groupe de Philippe Durand pour l'étude de la spermatogenèse du rat. Celui-ci permet également de restreindre la consommation d'animaux (Perrard et coll., 2009). Notons cependant qu'il existe de nombreux types cellulaires différents dans les gonades (cellules germinales, cellules de Sertoli, cellules de Leydig, cellules péricubulaires, macrophages, cellules endothéliales...) et que seule la culture organotypique permet de préserver le dialogue entre tous. Ce dernier modèle reste aujourd'hui limité à l'étude des gonades fœtales ou néonatales.

BIBLIOGRAPHIE

ESCANDE A, PILLON A, SERVANT N, CRAVEDI JP, LARREA F, et coll. Evaluation of ligand selectivity using reporter cell lines stably expressing estrogen receptor α or β . *Biochem Pharmacol* 2006, **71** : 1459-1469

GUTLEB AC, MEERTS IATM, BERGSMA JH, SCHRIKS M, MURK AJ. T-Screen as a tool to identify thyroid hormone receptor active compounds. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2005, **19** : 231-238

KINANI S, BOUCHONNET S, CREUSOT N, BOURCIER S, BALAGUER P, et coll. Bioanalytical characterisation of multiple endocrine- and dioxin-like activities in sediments from reference and impacted small rivers. *Environ Pollut* 2010, **158** : 74-83

LAMBROT R, COFFIGNY H, PAIRAULT C, DONNADIEU AC, FRYDMAN R, et coll. Use of organ culture to study the human fetal testis development: effect of retinoic acid. *J Clin Endocrinol Metab* 2006, **91** : 2696-2703

LIVERA G, DELBES G, PAIRAULT C, ROUILLER-FABRE V, HABERT R. Organotypic culture, a powerful model for studying rat and mouse fetal testis development. *Cell Tissue Res* 2006, **324** : 507-521

MOLINA-MOLINA JM, ESCANDE A, PILLON A, GOMEZ E, PAKDEL F, et coll. Profiling of benzophenone derivatives using fish and human estrogen receptor-specific in vitro bioassays. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008, **23** : 384-395

PERRARD MH, PRISANT N, GEOFFROY-SIRAUDIN C, SEGRETAİN D, POINTIS G, et coll. Analysis of the intratesticular control of spermatogenesis by ex-vivo approaching. *Folia Histochem Cytobiol* 2009, **47** : S89-S94

SOTO AM, SONNENSCHNEIN C, CHUNG KL, FERNANDEZ MF, OLEA N, SERRANO FO. The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environ Health Perspect* 1995, **103** (suppl 7) : 113-122

SZELEI J, JIMENEZ J, SOTO AM, LUIZZI MF, SONNENSCHNEIN C. Androgen-induced inhibition of proliferation in human breast cancer MCF7 cells transfected with androgen receptor. *Endocrinology* 1997, **138** : 1406-1412

TONTONOZ P, HU E, SPIEGELMAN BM. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR γ 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* 1994, **79** : 1147-1156. Erratum in: *Cell* 1995, **80** following 957

VAN DER LINDEN SC, HERINGAMB, MAN HY, SONNEVELD E, PUIJKER LM, et coll. Detection of multiple hormonal activities in wastewater effluents and surface water, using a panel of steroid receptor CALUX bioassays. *Environ Sci Technol* 2008, **42** : 5814-5820