

18

Méthodes d'études *in vivo*

Seule l'expérimentation *in vivo* permet de mesurer l'atteinte de la fertilité des animaux et d'intégrer d'éventuelles altérations dans le dialogue entretenu par l'ensemble des organes assurant la complexité de la fonction de reproduction. Au-delà de la fertilité, de nombreux autres paramètres reliés à la fonction de reproduction peuvent être mesurés *in vivo*, tels le poids des gonades ou des tissus du tractus génital, la sécrétion d'hormones ou l'altération morphologique des tissus... L'avantage des modèles *in vivo* est d'intégrer la totalité des effets potentiels d'un perturbateur donné et de ses métabolites dans un contexte physiologique. Ainsi par exemple, le lien entre les organes est conservé et les répercussions d'un composé sur un étage de l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique peuvent être appréhendées dans leur globalité (ce qui n'est pas le cas dans un modèle *in vitro*). En revanche, de nombreuses précautions s'imposent dans la transposition des données inter-espèces et en fonction des protocoles utilisés. Plusieurs paramètres, tels le choix de l'espèce ou de la lignée, le mode d'administration, la fenêtre d'exposition... sont à prendre en considération dans les données issues des études *in vivo*.

Études chez l'animal

Les études chez l'animal, le plus souvent le rongeur, présentent une grande diversité dans le choix des espèces et des lignées, les modes d'administration des substances chimiques et les périodes d'exposition.

Choix des espèces et lignées

Dans l'optique de la transposition des données à l'espèce humaine, le choix de l'espèce animale dans laquelle les études *in vivo* sont conduites est important. La plupart des travaux *in vivo* sont menés chez les rongeurs. Du point de vue de la régulation des fonctions de reproduction (gamétogenèse et stéroïdogénèse), on peut noter un grand degré de conservation entre la plupart des espèces mammaliennes. Cependant, chez les rongeurs, certains mécanismes diffèrent sensiblement. Ainsi par exemple, pour l'ovogenèse, le rat et la souris sont des espèces poly-ovulantes (qui produiront plusieurs ovocytes matures à

chaque cycle) ce qui n'est pas le cas de l'ovaire humain. De plus, la durée de la gestation est très courte chez les rongeurs, 19 à 21 jours, et aboutit à la naissance de jeunes très immatures, ce qui est moins le cas chez les grands mammifères tels l'homme. Cette dernière donnée est à prendre en considération car le développement des gonades est également affecté. À titre d'exemple, la folliculogénèse débute pendant la vie fœtale chez l'homme et pendant la vie postnatale chez les rongeurs. On comprendra donc que les fenêtres d'expositions ne suivent pas un parallélisme strict entre les espèces ; fréquemment une exposition périnatale (fœtale et début de vie postnatale) chez les rongeurs recouvre des événements similaires à une exposition fœtale chez l'être humain. Certaines espèces, tels les ruminants, peuvent apparaître plus proches de l'être humain pour ces paramètres. Cependant, la manipulation de ces modèles, longue et onéreuse, limite grandement l'usage de tels animaux dans le cadre d'étude systématique de toxicologie. Notons enfin que sous bien des aspects la spermatogénèse est une fonction sensiblement plus fragile chez l'homme que chez de nombreuses autres espèces. À titre de comparaison, il existe très peu de spermatozoïdes présentant des formes anormales chez la souris alors que ces dernières sont fréquentes chez l'homme. Par ailleurs, à moins de certains fonds génétiques bien particuliers, tel le fond SV129, il n'existe quasiment pas de tumeurs germinales dans le testicule murin, alors qu'il s'agit du cancer le plus fréquent de l'homme jeune.

Au sein d'une même espèce de rongeur, il est à noter également l'existence de différences inter-lignées pour certains paramètres sensibles à l'effet de substances reprotoxiques. Par exemple, en réponse à une exposition *in utero* aux phtalates (DBP), les rats des lignées Wistar présentent des taux de cryptorchidie plus élevés et des taux d'agénésie épидидymaire moindre que les rats de lignée Sprague-Dawley (Howdeshell et coll., 2008). On comprend donc la difficulté de conclure à l'absence d'effet sur certains paramètres de la reproduction quand une seule lignée est utilisée.

Chez les vertébrés aquatiques, il existe des différences beaucoup plus marquées au niveau de la régulation hormonale des fonctions de reproduction bien que les processus cellulaires reprennent toujours des thèmes communs (méiose, fécondation...). Par exemple, la maturation ovocytaire ou la spermatogénèse peuvent être régulées par des stimuli hormonaux différents. Chez de nombreux poissons, c'est la 11-céto-testostérone qui est le principal androgène circulant.

Modes d'administration

Dans le cadre des perturbateurs endocriniens où la voie d'exposition principale est fréquemment la voie alimentaire, il semble légitime de privilégier cette voie dans les protocoles d'expérimentation animale. Cependant, il est parfois difficile de connaître avec certitude la quantité de nourriture ingérée par les animaux de laboratoire et l'introduction de substances exogènes peut modifier la prise alimentaire, c'est pourquoi de nombreux auteurs choisissent

de gaver les animaux. Cette approche permet de mieux contrôler la quantité administrée mais peut également être considérée comme un stress supplémentaire de l'animal, paramètre additionnel pouvant modifier la réponse à un perturbateur endocrinien. Ainsi par exemple, les glucocorticoïdes semblent amplifier les effets des phtalates sur le testicule fœtal (Drake et coll., 2009) et il semble donc légitime d'imaginer que le stress maternel puisse contribuer aux altérations induites par ces perturbateurs. D'autres expérimentateurs choisissent d'injecter directement le composé ou mieux le dérivé actif du composé à tester ce qui n'est pas forcément à considérer comme un défaut de protocole. En effet, de très nombreuses différences de toxicocinétique sont décrites d'une espèce à l'autre et il est difficile d'appréhender le rôle des métabolites actifs lorsque ceux-ci sont produits en proportions variables chez deux espèces différentes. En contrepartie, lorsqu'un seul métabolite est administré on peut s'interroger sur le rôle du composé parent qui peut fréquemment générer toute une famille de dérivés aux effets multiples.

Ce dernier point est à rapprocher également de la notion d'environnement contrôlé ou dépourvu de contaminants fréquemment proposée dans le cadre des études *in vivo*. Effectivement, il est important de placer les animaux de laboratoire dans des cages et des litières spéciales dépourvues de contaminants œstrogéniques ou de les nourrir avec un régime ne contenant pas de phytoœstrogènes (par exemple sans soja). Mais ce type de régime ne reflète pas les conditions réelles d'exposition multiple de l'être humain. Par ailleurs, il n'est même pas certain pour de nombreux perturbateurs que leur mode d'action *in vivo* soit de type œstrogénique.

Enfin, parmi les modes d'administration, quelques expérimentateurs choisissent d'utiliser un système de pompes osmotiques greffées sous la peau de l'animal et délivrant quotidiennement une dose donnée (Vandenberg et coll., 2007). Bien que controversé, ce mode d'administration permet de limiter la manipulation des animaux, notamment lors de la gestation ou pendant le début de la lactation (et donc de limiter le stress attendant à ces manipulations). Il permet également comme avec les injections de délivrer une quantité précise.

Dans tous les cas et quel que soit le mode d'administration ou l'espèce, il est intéressant de connaître le taux circulant du composé administré et de ses principaux dérivés (métabolites actifs). Ce dosage est un paramètre qui prime sur le mode d'administration pour comparer avec les taux retrouvés chez l'homme ou pour corrélérer les effets *in vitro* aux modes d'actions dérivés d'études *in vitro*.

Fenêtre d'exposition

La notion de fenêtre d'exposition dépend de deux principaux paramètres, d'une part les paramètres qui sont mesurés et d'autre part la cinétique de la réponse. Ainsi par exemple dans le cadre des études sur la spermatogénèse, il

est couramment admis qu'une exposition doit couvrir un cycle complet de spermatogenèse (53 jours chez le rat) pour pouvoir voir les conséquences d'une altération ayant pu toucher n'importe quel stade de la spermatogenèse. Dans le cadre des études développementales, la question est plus équivoque. Bien que la vie foetale apparaisse comme une période particulièrement critique pour la mise en place de la fonction de reproduction, il n'est pas évident qu'une exposition ponctuelle ou durant quelques jours de vie foetale chez un rongeur reflète fidèlement l'exposition humaine, chronique et éventuellement tout au long de la vie.

Par ailleurs, le développement très lent des tissus reproducteurs chez l'être humain suggère qu'un même type cellulaire peut être exposé pendant des périodes parfois très supérieures à ce qui peut être reproduit à l'aide des modèles rongeurs. À titre d'exemple, la prolifération des ovogonies (précurseurs mitotiques des gamètes femelles) dans l'ovaire foetal humain débute à la sixième semaine de gestation et se termine aux environs de la 28^e semaine, soit plus de 150 jours, alors que chez la souris celle-ci ne dure que du 11^e jour post-conception au 14^e, soit à peine 3 jours. Dans ce cadre, est-ce qu'une exposition à faible dose durant une période presque cinquante fois plus longue est comparable à une exposition à la même dose ou faut-il la comparer à une exposition aiguë mais à une dose plus forte ?

Témoins positifs

L'inclusion d'un témoin positif est toujours un élément de comparaison intéressant dans une étude car il permet de vérifier l'exactitude et la sensibilité des paramètres mesurés lorsque ceux-ci sont connus pour être affecté par ce témoin. Ainsi dans le cas des perturbateurs endocriniens suspectés d'avoir au moins une activité de type œstrogénique, le DES est couramment utilisé comme témoin positif. Cependant, le témoin positif est aussi un biais expérimental. En effet, dans la plupart des cas le mode d'action *in vivo* du composé testé est inconnu et choisir par défaut un composé œstrogénique n'est pas forcément plus pertinent que d'exposer un animal à des radiations ionisantes. En d'autres termes, lorsque le mode d'action de la substance étudiée est inconnu au niveau moléculaire il est plus intéressant d'avoir un témoin positif affectant le paramètre étudié qu'un supposé témoin positif dont les effets sur les paramètres mesurés sont incertains. À titre d'exemple, de nombreux auteurs utilisent la flutamide, un anti-androgène non-stéroïdien, comme témoin positif lors d'études au sujet des phtalates dans le testicule foetal (Mylchreest et coll., 2002). Cependant, les effets des phtalates apparaissent indépendants des récepteurs aux androgènes (Lehraiki et coll., 2009). Quelle est donc la pertinence de la flutamide dans ce cas précis ? Il s'agit plus d'un élément de comparaison qu'à proprement parler d'un témoin positif. Par ailleurs, les phtalates ont été décrits comme augmentant l'apoptose des cellules germinales, les rayons γ également et ce de manière répétée et en détail depuis plus de 30 ans. Est-ce que pour ce paramètre l'exposition aux

rayonnements ionisants n'est pas un contrôle positif pertinent ? Cet exemple est certes un peu extrême et un témoin positif de nature semblable (composé chimique) est généralement préférable, mais permet d'illustrer la difficulté d'inclure un témoin positif a priori dans une étude. L'absence de témoin positif « valable » dans certaines études ne peut pas être considérée comme un critère d'exclusion lorsque des effets du composé d'intérêt sont décrits. En revanche, un témoin positif (peu importe sa nature) est très important lorsque peu ou pas d'effets sont rapportés.

Une notion parfois plus intéressante que l'inclusion d'un témoin dont on suppose qu'il a un mécanisme d'action proche du perturbateur testé est l'inclusion de fortes doses qui même si elles ne renseignent pas sur l'activité du composé aux doses proches de celles retrouvées dans l'environnement peuvent prouver que le composé utilisé est bien actif (même sur des paramètres indépendants de la fonction de reproduction).

En résumé, il est très difficile de statuer sur la qualité d'une étude *in vivo*. Une étude peut être considérée comme informative si le taux du composé administré (et/ou de ses métabolites) a été dosé au cours du protocole, si elle rapporte des effets précis et détaillés corroborant les mécanismes d'action supposés *in vitro* ou des effets similaires à ceux décrits dans une autre espèce. En cas d'absence d'effet sur un paramètre, l'inclusion d'un témoin positif altérant le(s) paramètre(s) étudié(s) ou/et un effet de la substance testée sur un autre paramètre permet d'estimer la sensibilité de la mesure et l'activité de la substance.

Paramètres phénotypiques recherchés dans les études

Les études chez l'animal (rongeurs) peuvent s'intéresser à un grand nombre de paramètres phénotypiques. Le tableau 18.I résume les principaux et présente les limites de chacune des approches.

Tableau 18.I : Paramètres phénotypiques recherchés dans les études chez le mammifère mâle

Paramètres phénotypiques	Points critiques
Paramètres morphologiques Poids testicules, épидидymes, prostate et vésicules séminales	Le poids testiculaire ne reflète que les altérations majeures de la spermatogenèse (moins précis qu'un comptage de cellules apoptotiques) Le poids des épидидymes, prostate et vésicules séminales peut refléter une action anti-androgénique mais également moins précis qu'un dosage de testostérone
Paramètres spermatiques Concentration Rendement Mobilité % Anomalies	Chez les rongeurs, les paramètres spermatiques sont plus robustes (viabilité élevée et peu de formes anormales) que chez l'être humain

Paramètres phénotypiques	Points critiques
Anomalies morphologiques	Nécessite des mesures précises en période postnatale et risque de variabilité inter-expérimentateurs
Distance anogénitale	
Hypospadias	Peuvent mettre en jeu des mécanismes développementaux indépendants des hormones stéroïdes
Cryptorchidie	
Présence de mamelons	
Fertilité	Intègre des fonctions multiples, n'indique pas le processus affecté (gamétogenèse, maturation des gamètes, fécondation, implantation, développement)
Dosages hormonaux	Les dosages de testostérone intra-testiculaires sont moins variables que les dosages sériques (mais nécessite la destruction du tissu)
Testostérone, LH, FSH, œstradiol	
Puberté	Peut être influencé par un changement de comportement alimentaire
Âge à la séparation du prépuce	
Histologie	Nécessite un expert pour identifier les lésions pathologiques Ne dénombre pas un type cellulaire donné, ni son activité prolifératrice ou apoptotique
Immunohistochimie	Repose sur la spécificité des anticorps et la connaissance de marqueurs (utile pour quantifier précisément un type cellulaire spécifique à l'aide d'un marqueur, son état de différenciation ou son activité)

Tests *in vivo* de mesure de la perturbation endocrinienne

Mesure de l'expression de gènes endogènes

Ces tests consistent à traiter des animaux génétiquement non modifiés (poissons, amphibiens, petits mammifères) par des molécules à activité potentiellement œstrogénique ou androgénique et à étudier ensuite l'expression de gènes endogènes ou des changements de phénotypes.

Deux types réglementaires existent pour mesurer une activité œstrogénique ou androgénique. Le test utéro-trophique chez la souris ou le rat consiste à mesurer l'augmentation du poids de l'utérus après 3-7 jours de traitement par de l'œstradiol ou le produit dont l'activité œstrogénique est à tester.

Le test de Hershberger chez le rat consiste à mesurer l'augmentation du poids d'organes comme le gland pénien, les vésicules séminales ou la prostate ventrale après 10 jours de traitement par un produit dont l'activité androgénique est à tester. L'inconvénient majeur de ces tests est qu'ils sont assez lourds et coûteux donc peu adaptés à l'étude d'un grand nombre de molécules. Il est également à noter que des molécules à agonisme partiel ne répondent pas forcément à ces tests. C'est le cas du bisphénol A qui s'est avéré négatif pour le test utéro-trophique. Les progrès technologiques (facilitant la manipulation et diminuant le coût) réalisés dans la mesure de l'expression de gènes par RT-PCR quantitative devraient faciliter l'étude de l'expression de gènes endogènes *in vivo*.

Modèles d'animaux transgéniques

D'autres tests non encore validés par l'ECVAM utilisant la technique de gène rapporteur *in vivo* ont été établis ces dernières années. Ces tests utilisent des animaux transgéniques (zebrafish, xénope ou souris) dont le gène de la luciférase ou de la GFP (*green fluorescent protein*) est sous le contrôle d'un promoteur activable par les œstrogènes ou les androgènes. Les avantages de ces modèles sont que l'on peut suivre l'activité d'un composé sur l'ensemble de l'organisme. Cela peut théoriquement permettre de déterminer si une molécule est active dans un organe et pas dans un autre (cas du bisphénol A). Comme tous les modèles *in vivo*, ils présentent l'avantage d'intégrer le métabolisme et donc d'étudier la dégradation d'un produit actif ou la transformation d'un produit inactif en produit actif. Un des inconvénients de ces modèles est que le récepteur est d'origine animale et donc différent du récepteur humain. Pour les récepteurs des œstrogènes et des androgènes, la différence interspèce est mineure. De plus, il est possible d'humaniser ces animaux en exprimant le récepteur humain au lieu du récepteur animal. Les différents modèles animaux présentent chacun des avantages respectifs. Au stade larvaire, les modèles zebrafish et xénope peuvent être manipulés dans des plaques de culture de format 96 puits. Tant que les larves ne se nourrissent pas, ces modèles sont considérés comme étant non *in vivo*. Leur transparence rend plus facile la détection de la fluorescence ou de la luminescence. De tels modèles existent pour les récepteurs ER chez le zébrafish (AromataseB-GFP et ERE-Luciférase) (Legler et coll., 2002 ; Tong et coll., 2009) et pour les récepteurs TR chez le xénope (TH/bZIP-GFP) (Fini et coll., 2007).

Les modèles de souris présentent l'avantage d'être plus proches de l'homme. L'équipe d'Adriana Maggi a ainsi établi des modèles de souris qui expriment la luciférase sous le contrôle des œstrogènes (souris ERE-Luciférase) ou des récepteurs PPAR (PPRE-Luciférase). Ces souris permettent de détecter l'activité œstrogénique ou PPAR γ d'un composé dans tout l'organisme et ainsi de pouvoir mettre en évidence des molécules à activité dépendante du contexte de l'organe ou du tissu (SERM ou SPPARM). De nouveaux modèles issus de croisements entre différentes lignées de souris s'avèrent également très prometteurs pour le futur. Ainsi la souris TRAMP-Luc est issue d'un croisement entre une souris TRAMP (qui développe spontanément un cancer de la prostate et une souris PSA-luc qui exprime la luciférase sous le contrôle du promoteur de la protéine PSA dans la prostate). De tels modèles permettent de mesurer plus facilement l'effet d'une molécule chimique ou d'un cocktail de molécules sur une réponse complexe comme la formation ou la progression de tumeurs.

Tissus stéroïdo-dépendants

Chez les mammifères, la croissance de tissus du tractus reproducteur est fréquemment utilisée pour identifier une activité de type perturbateur endocrinien. Ainsi, chez les rongeurs mâles, la distance anogénitale est un paramètre couramment décrit pour mesurer l'effet de l'exposition à une substance

à activité anti-androgénique. Cette distance présente un dimorphisme sexuel ; elle est environ deux fois plus grande chez le mâle que chez la femelle du fait de l'action de la DHT au cours du développement. Chez l'être humain, il a été montré que ce dimorphisme sexuel est conservé chez les enfants (Salazar-Martinez et coll., 2004). Ce paramètre peut donc servir à mesurer l'exposition à des anti-androgènes potentiels avant la naissance. Chez les rongeurs femelles, la croissance du tissu utérin d'animaux préalablement ovariectomisés est utilisée pour détecter des effets de type pro-oestrogéniques.

BIBLIOGRAPHIE

DRAKE AJ, VAN DEN DRIESCHE S, SCOTT HM, HUTCHISON GR, SECKL JR, SHARPE RM. Glucocorticoids amplify dibutyl phthalate-induced disruption of testosterone production and male reproductive development. *Endocrinology* 2009, **150** : 5055-5064

FINI JB, LE MEVEL S, TURQUE N, PALMIER K, ZALKO D, et coll. An in vivo multiwell-based fluorescent screen for monitoring vertebrate thyroid hormone disruption. *Environ Sci Technol* 2007, **41** : 5908-5914

HOWDESHHELL KL, RIDER CV, WILSON VS, GRAY LE JR. Mechanisms of action of phthalate esters, individually and in combination, to induce abnormal reproductive development in male laboratory rats. *Environ Res* 2008, **108** : 168-76

LEGLER J, ZEINSTRAL LM, SCHUITEMAKER F, LANSER PH, BOGERD J, et coll. Comparison of in vivo and in vitro reporter gene assays for short-term screening of estrogenic activity. *Environ Sci Technol* 2002, **36** : 4410-4415

LEHRAIKI A, RACINE C, KRUST A, HABERT R, LEVACHER C. Phthalates impair germ cell number in the mouse fetal testis by an androgen- and estrogen-independent mechanism. *Toxicol Sci* 2009, **111** : 372-382

MYLCHREEST E, SAR M, WALLACE DG, FOSTER PM. Fetal testosterone insufficiency and abnormal proliferation of Leydig cells and gonocytes in rats exposed to di(n-butyl) phthalate. *Reprod Toxicol* 2002, **16** : 19-28

SALAZAR-MARTINEZ E, ROMANO-RIQUER P, YANEZ-MARQUEZ E, LONGNECKER MP, HERNANDEZ-AVILA M. Anogenital distance in human male and female newborns: a descriptive, cross-sectional study. *Environ Health* 2004, **3** : 8

TONG SK, MOURIEC K, KUO MW, PELLEGRINI E, GUEGUEN MM, et coll. A cyp19a1b-gfp (aromatase B) transgenic zebrafish line that expresses GFP in radial glial cells. *Genesis* 2009, **47** : 67-73

VANDENBERG LN, MAFFINI MV, WADIA PR, SONNENSCHNEIN C, RUBIN BS, SOTO AM. Exposure to environmentally relevant doses of the xenoestrogen bisphenol-A alters development of the fetal mouse mammary gland. *Endocrinology* 2007, **148** : 116-127