



**DEVELOPPEMENT D'UN TEST PHYSIOLOGIQUE
RAPIDE *IN VIVO* POUR MESURER LES EFFETS DE
PERTURBATIONS THYROÏDIENNES**

**AN *IN VIVO* MULTIWELL-BASED FLUORESCENT
SCREEN FOR MONITORING VERTEBRATE THYROID
HORMONE DISRUPTION**

Programme National de Recherche Perturbateurs
Endocriniens (PNRPE)

Rapport de fin de contrat – Version révisée

Coordonnées du laboratoire :
Muséum National d'Histoire Naturelle - CNRS UMR 7221
CP n°32 - 7 Rue Cuvier - 75231 Paris CEDEX 5 - France
Coordinateur / responsable scientifique du projet
Barbara Demeneix
+ 33 1 40 79 36 07

Date : 1^{er} avril 2009

N° de contrat : CV05000140
Date du contrat : 21/02/2006

**DEVELOPPEMENT D'UN TEST PHYSIOLOGIQUE
RAPIDE *IN VIVO* POUR MESURER LES EFFETS DE
PERTURBATIONS THYROÏDIENNES**

**PROGRAMME NATIONAL DE RECHERCHE PERTURBATEURS
ENDOCRINIENS (PNRPE)**

**Dr Barbara Demeneix et UMR 7221 / USM 501
Dr Patrick Balaguer et INSERM U896**

Barbara Demeneix souhaite remercier le Dr Marc Leonard pour sa contribution à ce projet et ses commentaires sur le rapport final.

SYNTHESE

CONTEXTE GENERAL

Les perturbateurs endocriniens et la thyroïde

Les effets des perturbateurs endocriniens (molécules *hormono-mimétiques*) sur la reproduction des animaux sont couramment étudiés, mais il y a d'autres perturbations qui peuvent survenir au niveau d'autres glandes endocrines, comme la thyroïde. Toutes les glandes endocrines produisent des hormones qui vont agir au sein de l'organisme. La production de ces hormones peut être perturbée par l'action d'une molécule structurellement proche. Cette structure permet à la molécule exogène de prendre la place de l'hormone naturelle. Ceci peut avoir trois conséquences :

1. pas d'effet direct car on modifie un équilibre mais on en obtient un nouveau ;
2. le perturbateur empêche l'hormone naturelle d'agir ; et
3. l'effet s'additionne à celui de l'hormone naturelle.

La thyroïde est une glande qui produit la thyroxine (tetraiodothyronine ou T_4) dont une certaine fraction est présente dans le sang et qui va être activée par désiodation (en triiodothyronine ou T_3) dans les tissus cibles de l'hormone. Les deux pathologies couramment associées au dysfonctionnement de la thyroïde sont :

- l'hypothyroïdie (faible production de T_4) dont les symptômes sont difficilement discernables de ceux d'une dépression ;
- l'hyperthyroïdie (forte production d'hormones) dont les symptômes sont ceux d'une hyperactivité doublée d'une sensation de chaleur.

Les hormones thyroïdiennes sont nécessaires au bon développement intra-utérin du fœtus car il permet un développement normal du cerveau. Une pathologie associée à ce manque d'hormone durant la grossesse est le crétinisme avec de lourds retards mentaux et un rachitisme prononcé.

Les dispositifs législatifs

La protection de l'Environnement et de l'Homme vis-à-vis des perturbateurs endocriniens passe par le développement de méthodes d'essais spécifiques, destinées à l'évaluation des effets des substances chimiques et des effluents ainsi qu'à la surveillance des milieux naturels. La récente réglementation européenne REACH (Registration Evaluation and Authorisation of Chemicals) a pour but d'évaluer le risque des substances chimiques pour l'Homme et l'Environnement et comprend des dispositifs qui soumettraient à autorisation (et à restriction) les substances chimiques qui sont identifiées comme perturbateurs endocriniens. Cette loi impose aux industriels d'évaluer et de contrôler le risque toxique de leurs produits. Plus de 30 000 produits sont à tester dont 2 000 avant 2012 car leur production excède 100 000 tonne/an.

En pratique, comment détecter l'effet d'un perturbateur endocrinien ?

La détection de perturbateurs endocriniens pose des difficultés car les perturbateurs endocriniens peuvent agir à de nombreux niveaux :

- au niveau de la production d'hormone au niveau de l'axe hypothalamo-hypophyso-thyroïdien,
- au niveau du transport de l'hormone (T_4) dans le corps,
- au niveau de l'activation en T_3 ;

- au niveau cellulaire des tissus cibles et dans les noyaux par perturbation de la liaison de la T₃ aux récepteurs nucléaires thyroïdiens (TR pour Thyroid Receptor).

Afin de comprendre comment les substances seront modifiées et accumulées dans les organismes, la chimie et les méthodes *in vitro* ne sont pas suffisantes pour élucider les mécanismes impliqués. Seul le test *in vivo* concilie à la fois réalité physiologique et sensibilité.

Et pourtant, il y a d'autres facteurs :

- Besoin de rapidité,
- Considération des coûts qui seront engendrés par le criblage d'un grand nombre de substances,
- La nécessité de limiter le recours aux animaux de laboratoire pour l'évaluation des substances chimiques commercialisées dans l'Union Européenne.

Nous avons tout intérêt à développer un test de détection rapide de perturbateurs thyroïdiens.

L'approche

L'amphibien est utilisé depuis des décennies comme modèle pour comprendre la mécanistique thyroïdienne. En effet, leur métamorphose est uniquement dépendante d'un pic de la même T₃ (hormone thyroïdienne active) que celle de l'homme. Si on bloque artificiellement ce pic d'hormone la métamorphose n'a pas lieu.

L'ingénierie du laboratoire a permis de créer récemment des modèles transgéniques qui émettent une protéine fluorescente verte (Green Fluorescent Protein GFP) en présence d'hormone T₃. Plus il y a d'hormone dans le milieu et plus il y a activation et transcription des gènes cibles et plus il y a production de GFP dans les organes ou tissus cibles de la T₃ du têtard. Nous pouvons donc quantifier l'activité du gène par la quantification de la fluorescence dans ces « têtards sentinelles ».

L'avantage du système transgénique est que la modification de l'activité du gène cible est l'étape finale. Si une perturbation a lieu en amont nous pourrions de la même manière voir une baisse de la production d'hormones. Nous savions que les têtards étaient capables de répondre à l'hormone bien avant la production endogène d'hormones. De plus, la réglementation REACH qui limite le recours à l'animal de laboratoire, nous encourageait à recourir à des stades embryonnaires de développement : les stades ultérieures (larvaires) répondant à la définition réglementaire de l'animal de laboratoire (Dir. 86/609/CEE). Enfin, nous avons dans l'idée de développer une méthode de lecture de la fluorescence automatisée.

RESULTATS OBTENUS

Le test développé est rapide, sensible et permet de détecter les agonistes¹ ou agonistes² (inhibiteurs) des hormones thyroïdiennes.

¹ Un agoniste est une molécule interagissant avec un récepteur en lieu et place d'une hormone donnée. L'agoniste mime l'hormone et permet l'activation de la transcription, son effet peut être additif à celui de l'hormone naturelle.

² Un antagoniste est une molécule interagissant avec un récepteur et bloquant ou diminuant l'effet physiologique d'une hormone.

Le tableau suivant récapitule les substances pour lesquelles notre test a été validé.

Nom de la substance	Abréviati on	Action / désignation	Effet décelable avec lecture automatisée
Triiodothyronine	T ₃	Hormone naturelle active	0,5nM
Tetraiodothyronine	T ₄	Hormone naturelle 1 000 fois moins active que la T ₃	10nM
Acide Triiodothyroacétique	Triac	Agoniste naturel de la T ₃	10nM
GC1	GC1	Agoniste synthétique de la T ₃	100nM
Acide iopanoïque	IOP	Inactive les trois enzymes (D ₁ , D ₂ , D ₃ - désiodases) permettant de transformer la thyroxine très faiblement active en T ₃ active mais, qui permettent aussi de dégrader une partie de l'hormone active	10µM
Propylthiouracile	PTU	Inactive la désiodase de Type I et empêche l'organification de l'hormone au niveau de la glande thyroïde. La bonne description de cette substance dans la littérature en a fait un contrôle de référence pour des tests antithyroïdiens comme le AMA test.	100µM
Méthimazole		Le méthimazole est un antithyroïdien de synthèse non commercialisé en France. Il empêche la formation de l'hormone au niveau de la glande thyroïdienne par blocage de l'organification de l'hormone. Ceci est opéré par blocage de la thyroïde peroxydase (TPO) enzyme permettant au sein du thyrocyte d'ajouter les atomes d'iode un à un à la thyroglobuline.	1mM
Perchlorate de sodium		Le perchlorate de sodium est un composé utilisé dans l'industrie aéronautique et militaire. Il est utilisé pour les explosifs et les carburants pour fusées. Après chaque envol d'une navette spatiale, de grosses doses de perchlorate de sodium sont retrouvées aux alentours de la base. Le perchlorate a une action anti-thyroïdienne décrite dans la littérature depuis de nombreuses années (Wolff, 1998). Cette molécule bloque le symport sodium /iodure (Na/I) qui permet le transport actif de l'iode au sein des thyrocytes, cellules composant la glande thyroïde. La glande se trouvant dépourvue d'iode ne peut plus produire d'hormone T ₄ ou même T ₃ . Cependant il existe des mécanismes compensatoires transitoires avec une augmentation de la production de TSH (levée du rétro contrôle négatif). Ces effets sont réversibles.	500µg (3,56µM)
Vinclazole		Pesticide antifongique démontré anti androgénique.	Pas d'effet
Génistéine		Phyto-estrogène naturel du soja (bloquerait transport hormone thyroïdien)	Pas d'effet
NH-3	NH-3	Bloque les co-répresseurs des récepteurs aux hormones thyroïdiennes (effet activateur) Bloque le récepteur => antagoniste spécifique du récepteur	1µM
Bisphénol-A	BPA	Monomère des plastiques alimentaires, des résines Epoxy, des ciments dentaires etc.... Effet anti-thyroïdien supposé et faible effet oestrogénique démontré.	1µM
Tetrabromobisphénol-A	TBBPA	Retardateur de flammes utilisé dans les circuits imprimés des ordinateurs, sur les habits, les moquettes et autres tentures murales. C'est le retardateur de flamme bromé le plus produit au monde (700 000 tonnes/ an). Effet anti-thyroïdien supposé.	1µM

IMPLICATIONS PRATIQUES, RECOMMANDATIONS, REALISATIONS PRATIQUES, VALORISATION

Validation du test (Objectif 1 et Objectif 2)

La méthode que nous employons (fluorimétrie en plaque) est aussi sensible que la quantification au microscope à fluorescence (méthode classique). Nos résultats démontrent que l'on peut miniaturiser et gagner du temps.

La durée du traitement est de 72 h. La lecture se fait en une demi-heure (9 points par puit, chaque point lu dix fois, moyenne donnée par puit).

Comparaison favorable du test avec le protocole AMA (Objectif 3)

Notre test est aussi beaucoup plus rapide et économique que le protocole AMA³, qui est en cours d'évaluation dans le cadre de développement et validation d'essais spécifiques (pour la détection de perturbateurs endocriniens) par l'OCDE.

Les avantages de la lecture de fluorescence par rapport au AMA sont énumérés ci-dessous :

- Lecture automatisée;
- Technologie non invasive;
- Stade 45 (1 semaine de développement) vs stade 51 (3 - 4 semaines de développement);
- Rapidité du test 72h vs 3 semaines.

Ces recherches mettent en valeur une approche novatrice et importante pour cribler les perturbateurs endocriniens. Les résultats démontrent de façon convaincante l'applicabilité du système transgénique avec un système de lecture automatisée de moyen à haut débit.

Comparaison à des cultures cellulaires pour élucider mécanismes d'action (Objectif 4)

Notre hypothèse de travail était que la comparaison de la méthode que nous employons (lecture automatisée) à des tests sur cultures cellulaires permettrait de distinguer les mécanismes d'action de substances (aussi bien agonistes qu'antagonistes) impliquant une liaison directe ou non aux récepteurs aux hormones thyroïdiennes (HT). En effet, les résultats sur les cultures cellulaires indiquent que le mode d'action de ces molécules pourrait passer par une compétition vis à vis de la T₃ au niveau des protéines de transport, plutôt qu'au niveau du récepteur.

Ceci souligne l'avantage de développer des modèles intégrés, mais aussi de continuer avec des approches multidisciplinaires (cellulaire, métabolisme, etc.) afin de pouvoir mieux élucider les mécanismes d'action des perturbateurs endocriniens.

³ Amphibian Metamorphosis Assay

PARTENARIATS MIS EN PLACE, PROJETES, ENVISAGES

L'un des partenariats que nous avons mis en place porte sur le développement d'outils novateurs pour évaluer les effets de xénobiotiques au sein d'un organisme. Le Dr Demeneix a réuni quatre partenaires avec des expertises complémentaires (endocrinologie, biologie du développement et physiologie, biologie cellulaire et métabolisme), qui ont déjà eu une collaboration fructueuse dans le cadre du réseau d'excellence Cascade (financement de l'Europe), pour collaborer sur le projet KISMET (ANR appel Contaminants Environnement Santé).

KISMET développera et appliquera des modèles *in vitro* (cultures cellulaires) et *in vivo* (embryons de poissons et d'amphibiens transgéniques) afin d'évaluer la capacité qu'ont certains composés chimiques d'interagir avec les récepteurs nucléaires (NRs). La méthodologie impliquera de nouvelles lignées cellulaires rapportrices et plusieurs types de petits organismes modèles (SMO) qui sont particulièrement adaptés à des méthodes de criblage à haut débit. L'implication d'un partenaire chimiste pouvant synthétiser et analyser les métabolites des produits testés permettra une meilleure connaissance des mécanismes en jeu et des tissus cibles, augmentant ainsi notre connaissance sur les effets adverses sur la santé.

En outre, le projet permettra de consolider les liens actuellement mis en place avec l'US EPA (Environmental Protection Agency) mais pour lequel aucun financement n'est disponible. Il est très important que les chercheurs français se placent sur la scène internationale dans un domaine en développement rapide qui exige une mise en place de tests alternatifs robustes.

POUR EN SAVOIR PLUS (QUELQUES REFERENCES)

- Cooper, D.S., 2005. Antithyroid drugs. *The New England journal of medicine* 352, 905-917.
- Kloas, W., 2002. Amphibians as a model for the study of endocrine disruptors. *International review of cytology* 216, 1-57.
- Turque, N., Palmier, K., Le Mevel, S., Alliot, C., Demeneix, B.A., 2005. A rapid, physiologic protocol for testing transcriptional effects of thyroid-disrupting agents in premetamorphic *Xenopus* tadpoles. *Environmental health perspectives* 113, 1588-1593.
- Wolff, J., 1998. Perchlorate and the thyroid gland. *Pharmacological reviews* 50, 89-105.

LISTE DES OPERATIONS DE VALORISATION ISSUES DU CONTRAT (ARTICLES DE VALORISATION, PARTICIPATIONS A DES COLLOQUES, ENSEIGNEMENT ET FORMATION, COMMUNICATION, EXPERTISES...)

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES	
Publications scientifiques parues	<p>An <i>In vivo</i> Multiwell-Based Fluorescent Screen for Monitoring Vertebrate Thyroid Hormone Disruption Fini, J.-B.; Le Mevel, S.; Turque, N.; Palmier, K.; Zalko, D.; Cravedi, J.-P.; Demeneix, B. A. Environ. Sci. Technol.; (Article); 2007; 41(16); 5908-5914. DOI: 10.1021/es0704129</p> <p>Meeting abstract – 23rd Conference of European Comparative Endocrinologists: Transgenic <i>Xenopus</i> for assessing actions of chemical compounds affecting transcription effects of TRs and ERs. Jean-Baptiste Fini, Sébastien Le Mével, Nathalie Turque, Karima Palmier and Barbara A. Demeneix</p>
Publications scientifiques à paraître	<p>(Proceeding of the National Academy of Science USA) <i>TBBPA interferes with neurogenesis</i> in <i>Xenopus laevis</i> Jean-Baptiste Fini, Sébastien Le Mével, Karima Palmier, Samantha Richardson and Barbara A. Demeneix</p>
Publications scientifiques prévues	
COLLOQUES	
Participations passées à des colloques	<ul style="list-style-type: none"> • 24 au 27 mai 2006 à Ottawa (Canada) ‘AFFTAL, 32nd Conference of Technological and Scientific Studies’ (Séminaire pour industriels et scientifiques) • 12 juillet 2006 à Paris, France Xenop’arisien, (Séminaire pour Spécialistes de Xénopes) • 29 août au 2 septembre 2006 à Manchester, Angleterre : 23rd Conference of European Comparative Endocrinologists, Etat de l’art (Dr Demeneix) et présentation par le doctorant Jean Baptiste Fini • Annuel Congrès annuel de Cascade (2006, 2007, 2008 au printemps) • 3 octobre 2006 Colloque de lancement MEDAD / Ecrin à Paris • 10 mars 2008 Colloque de mi-parcours MEDAD / Ecrin à Angers • Septembre 2008 JB.Fini B.Demeneix 20^{ème} Congrès d’endocrinologie Comparée européen, Gènes, Italie. • Septembre 2008 NTP RFI meeting on High Throughput Screening Approached for Toxicology aux Etats Unis.
Participations futures à des colloques	<p>Congrès annuel (dernière année) du REX Cascade, printemps 2009</p>

THESES	
Thèses passées	
Thèses en cours	JB Fini (soutenance de thèse fin Septembre 2008)
ARTICLES DE VALORISATION-VULGARISATION	
Articles de valorisation parus	Des têtards au secours de nos assiettes. JdCNRS 213 – Octobre 2007. Bruno de La Perrière.
Articles de valorisation à paraître	
Articles de valorisation prévus	
AUTRES ACTIONS VERS LES MEDIAS	
Actions vers les médias (interviews...) effectuées	France 2 Interview Barbara Demeneix - expertise sur mise en vigueur de REACH
Actions vers les médias prévues	
ENSEIGNEMENT – FORMATION	
Enseignements/formations dispensés	
Enseignements/formations prévus	
EXPERTISES	
Expertises menées	
Expertises en cours	Dr Demeneix expert OCDE.
Expertises prévues	
METHODOLOGIES (GUIDES...)	
méthodologies produites	
méthodologies en cours d'élaboration	Validation de test développé par l'OCDE.
méthodologies prévues	
AUTRES	
Précisez...	

RESUMES

RESUME

Nous avons développé des modèles amphibiens qui répondent par émission de fluorescence à toute altération de l'axe thyroïdien. Cette technique est basée sur la possibilité de suivre les régulations transcriptionnelles *in vivo* par l'activation d'éléments de réponses génétiques spécifiques des hormones thyroïdiennes placés en amont d'un gène codant pour une protéine fluorescente (TH/bZIP-eGFP). La détection au niveau génétique permet d'intégrer les différents modes d'actions des substances ou des mélanges susceptibles de perturber la synthèse, le transport, ou la signalisation thyroïdiennes. La faisabilité de cette approche a déjà été démontrée (Turque *et al.*, 2005).

Cependant il restait à optimiser cette méthode pour son application industrielle et de manière à réduire les besoins en expérimentation animale. Ainsi, nous avons pour objectifs, premièrement, d'améliorer la rapidité et la sensibilité du test aux substances de références, et deuxièmement, d'adapter au mieux notre modèle avec les systèmes de lecture déjà disponibles.

En utilisant des têtards de Xénope au stade NF45 on a pu rapidement détecter les effets de perturbateurs de la signalisation périphérique des HT (hormone thyroïdienne) ainsi que des effets au niveau de la production endogène d'HT. Les concentrations de l'ordre du nanomolaire on pu être détectées en moins de 72h. Notre test a été validé sur les substances suivantes : le méthimazole (1 mM) et perchlorate (3,56 µM) (inhibition au niveau de la glande); le NH₃ (2M) (antagoniste au niveau du récepteur) et l'acide iopanoïque (10µM) (un inhibiteur de la désiodase). Les effets perturbateurs du BPA (10 µM) et du TBBPA (1 µM) peuvent aussi être détectés avec notre test rapide. Ces résultats font l'objet d'une récente publication (Fini *et al.*, 2007).

Notre approche est compatible avec le criblage de moyen à haut débit et se compare favorablement avec le test de référence reconnu par l'OCDE pour la détection de perturbateurs thyroïdiens, le test de métamorphose amphibien AMA. Cette technologie innovatrice et importante utilisant la lecture automatique montre peu de variabilité et permet de détecter l'inhibition ou l'activation de la signalisation des HT par les perturbateurs endocriniens (PE) *in vivo*.

MOTS CLES

hormones thyroïdiennes (HT), *in vitro*, *in vivo*, amphibien, dose-réponse, tests génomiques

ABSTRACT

There is a pressing need for high throughput methods to assess potential effects of endocrine disrupting chemicals (EDCs) released into the environment. Currently our ability to identify effects *in vitro* exceeds that for *in vivo* monitoring. However, only *in vivo* analysis provides the full spectrum of physiological impacts exerted by a given chemical. With the aim of finding a physiological system compatible with automatic plate reading we tested the capacity of early embryonic stage *Xenopus laevis* tadpoles to monitor thyroid hormone (TH) disruption. Fluorescent transgenic *X. laevis* embryos bearing a TH/bZIP-eGFP construct, placed in 96 well plates, were used for a physiological-based screen for potential TH signaling disruptors. Using stage NF-45 embryos (time of thyroid gland formation) allowed rapid detection of chemical interference with both peripheral TR signaling and production of endogenous TH. Nanomolar concentrations of TH receptor agonists could be detected within

72 h. Moreover, when testing against a 5nM T₃ challenge, the effects of inhibitors of TH production were revealed, including inhibitors of TH synthesis, (methimazole: 1 mM or sodium perchlorate: 3.56 μM), as well as antagonists acting at the receptor level (NH₃: 2 μM) and a deiodinase inhibitor (iopanoic acid: 10 μM). Finally, we show that the thyroid disrupting activities of BPA (10 μM) and TBBPA (1 μM) can also be detected in this rapid screening protocol. Finally, this noninvasive technology using an automatic reading system shows low variability (around 5%) and permits detection of subtle changes in signaling by EDCs that either inhibit or activate TH signaling *in vivo*.

KEY WORDS

Thyroid hormone, *in vitro*, *in vivo*, amphibian, dose-response, genomic tests

TABLE DES FIGURES

Figure 1 Suivi de l'expression basale du transgène au cours du temps en fonction du stade de départ NF45	18
Figure 2 Expression du transgène en fonction du temps de traitement et de la concentration de T ₃	18
Figure 3 Comparaison des méthodes utilisées pour quantifier la fluorescence.....	19
Figure 4 Gamme dose réponse de la triiodothyronine (T ₃) sur l'expression des gènes THbZIP, TRAlpha TRbêta.	23
Figure 5 Gamme dose réponse de la tetra iodothyronine (T ₄) sur l'expression des gènes THbZIP, TRAlpha TRbêta.	25
Figure 6 Gamme dose réponse de l'acide triodo acétique métabolite agoniste naturel, sur l'expression des gènes THbZIP, TRAlpha TRbêta.....	27
Figure 7 Influence d'un médicament antithyroïdien, le méthimazole, agissant sur la formation de l'hormone, sur l'expression des gènes THbZIP, TRAlpha TRbêta.....	29
Figure 8 Effets d'un agent antithyroïdien issu de l'industrie aérospatiale, le perchlorate de sodium, sur l'expression des gènes THbZIP, TRAlpha TRbêta.	31
Figure 9 L'effet avec le PTU (un antagoniste).....	32
Figure 10 L'action de l'antagonistes IOP peut être révélé en 72h en co-traitement avec T ₃ et T ₄	33
Figure 11 L'action de l'antagonistes NH ₃ peut être révélé en 72h en co-traitement avec T ₃ et T ₄	33
Figure 12 Effets des perturbateurs thyroïdiens le Bisphénol A et le Tétrabromobisphénol A, détectés grâce à la lecture automatique, sur l'expression des gènes THbZIP, TRAlpha TRbêta.....	35
Figure 13 Transactivation du TRAlpha dans une lignée cellulaire rapportrice	39
Figure 14 Transactivation du TRbêta dans une lignée cellulaire rapportrice.....	40

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 Méthodologie prévue et modifications au protocole	14
Tableau 2 Relevés de critères morphologiques et histologiques d'après Moser (modifié pour comparer la sensibilité de la lecture automatique)	36

RAPPORT SCIENTIFIQUE

CONTEXTE REGLEMENTAIRE

La protection de l'Environnement et de l'Homme vis-à-vis des perturbateurs endocriniens passe par le développement de méthodes d'essais spécifiques, destinées à l'évaluation des effets des substances chimiques et des effluents ainsi qu'à la surveillance des milieux naturels. La récente réglementation REACH (Registration Evaluation and Authorisation of Chemicals) européenne a pour but d'évaluer le risque des substances chimiques pour l'Homme et l'Environnement et comprend des dispositifs qui soumettraient à autorisation (et à restriction) les substances chimiques identifiées comme perturbateurs endocriniens.

La détection de perturbateurs endocriniens dans l'alimentation et l'environnement pose des difficultés. Il faut savoir que les perturbateurs endocriniens peuvent agir à de nombreux niveaux (au niveau de la production d'hormone, au niveau du transport de l'hormone dans le corps, au niveau cellulaire des tissus cibles ainsi que dans les noyaux par rapport aux récepteurs nucléaires). Afin de comprendre comment les substances seront modifiées et accumulées dans les organismes, la chimie et les méthodes *in vitro* ne sont pas suffisantes pour élucider les mécanismes impliqués. Seul le test *in vivo* concilie à la fois réalité physiologique et sensibilité.

Et pourtant, il y a d'autres facteurs :

- Besoin de rapidité,
- Considération des coûts qui seront engendrés par le criblage d'un grand nombre de substances,
- La nécessité de limiter le recours aux animaux de laboratoire pour l'évaluation des substances chimiques commercialisées dans l'union européenne.

DEVELOPPEMENT ET VALIDATION DE METHODES

Le développement et la validation de méthodes d'essai sont en cours à l'OCDE. Le test AMA (*Amphibians Metamorphosis Assay*) est fondé sur l'évaluation de l'influence des substances chimiques sur la métamorphose des amphibiens⁴. Ce protocole AMA a été développé par l'équipe de Kloas en Allemagne (Kloas, 2002; Jagnytsch *et al.*, 2006). Les paramètres observés dans le test AMA sont morphologiques (longueur du corps et des membres, stades de développement), histopathologiques (histologie de la glande thyroïde) et biochimiques (dosage des hormones T₃/T₄). Le coût d'un test, sous référentiel de qualité BPL (Bonnes Pratiques de Laboratoire) avoisine les 60 000€ et nécessite un équipement permettant un renouvellement de la substance en continu. De plus, ce test nécessite l'utilisation de têtards de Xénopes au stade NF⁵ 51 (21 jours post-fertilisation), qui répondent à la définition européenne de l'animal de laboratoire (Dir 86/609/CEE).

Manifestement, la validation d'un test avec une sensibilité analogue au AMA, mais qui serait moins onéreux et compatible avec du criblage à moyen – haut débit, reste une priorité.

⁴ OCED Detailed Review Paper on Amphibian Metamorphosis Assay for the Detection of Thyroid Active Substances ; Series on Testing and Assessment N°46 Organisation for Economic Cooperation and Development. Paris 2006.

⁵ NF Newkoop et Faber voir Tableau 2

L'INTERET DU SYSTEME TRANSGENIQUE

L'ingénierie du laboratoire a permis de créer récemment des Xénopes transgéniques qui émettent une protéine fluorescente verte si on place dans l'eau de l'hormone thyroïdienne (T_3). Plus il y a d'hormone dans le milieu, et plus il y a activation et transcription des gènes cibles (rapporteurs) et de production de protéines fluorescentes dans les organes ou tissus cibles de la T_3 . L'activité du gène peut se quantifier selon le degré de fluorescence observée : la protéine est un marqueur fluorescent visible à travers un têtard transparent à ce stade. L'un des avantages de ce système biologique est que l'activité du gène cible est l'étape finale de la chaîne de réactions qui vont de l'hormone jusqu'à son action dans le noyau. Ainsi, si une perturbation a lieu en amont, on peut observer une baisse de la production d'hormones si la molécule interfère avec la production de l'hormone ou encore une hausse si la molécule ajoute son effet à celui de l'hormone.

Nous savions que les stades précoces de têtards (stades 42 et 45, 4 et 5 jours post fertilisation) étaient capables de répondre à l'hormone (réagir physiologiquement) avant même d'atteindre un stade où il y a production endogène d'hormones. Vu que l'utilisation de ces stades est moins contraignante dans le cadre de la Directive européenne 86/609/CEE, les caractéristiques du système s'apparentaient au développement d'une méthode de lecture de la fluorescence automatisée : la robotisation en lecture sur plaque. Ainsi, nos objectifs et démarche s'inscrivent dans le contexte de l'axe prioritaire de recherche du PNRPE qui vise la mise au point de tests de criblage et d'études des PE *in vivo* et *in vitro*.

OBJECTIFS GENERAUX DU PROJET

1. Valider un test rapide et sensible pour la détection **d'agonistes** des HT (hormones thyroïdiennes) sur embryons de Xénopes à des stades très précoces (stades à la transition embryon/larvaire, NF42- NF52).
2. Valider un test rapide et sensible pour la détection **d'antagonistes** des HT sur les embryons de Xénopes à des stades très précoces
3. **Comparer** la sensibilité des tests rapides sur embryons aux stades précoces avec le test AMA (3 semaines; stades prémétamorphiques) recommandé par l'OCDE
4. **Comparer les tests** sur embryons de Xénopes à des tests sur cultures cellulaires.

Nous pouvons distinguer différentes étapes à notre approche :

1. Affiner le protocole du test avec un système intégré (*in vivo*) sur des stades précoces
2. Valider son application avec différentes substances (agissant à différents niveaux)
3. Vérifier la robustesse et la réalité physiologique du test par une approche de qPCR
4. Comparer la sensibilité de notre test avec celle d'autres approches pour détecter un effet de perturbateur endocrinien
5. Comparer nos résultats avec les *tests in vitro*

**QUELQUES ELEMENTS DE METHODOLOGIE (ET EVENTUELLES DIFFICULTES
RENCONTREES)
METHODOLOGIE**

Tableau 1 Méthodologie prévue et modifications au protocole

Méthodologie prévue	Modification du protocole (si elle a eu lieu)
Tester sur des têtards transgéniques de stade 42 et 45	Seul le stade 45 retenu, voir la section 'Détermination du stade d'intérêt'
Trois concentrations de chaque substance seront testées Tests prévus en plaque 6 puits. Ce protocole a été mis au point et fait comme initialement prévu. L'emploi des plaques de 6 puits plutôt que des aquaria permet de réduire des déchets.	
Pour chaque concentration, 15 têtards par lot et la fluorescence quantifiée après 24 h et 48h	Il s'avère que la meilleure induction de TH/bZIP est obtenue pour un temps d'exposition de 72 h avec la concentration de T_3 $5.10^{-9}M$. Donc la fluorescence sera quantifiée après 72h sur les stades NF45.
Pour valider la réalité physiologique des réponses, des expériences de qPCR seront effectuées comme mesure des gènes cibles de la T_3 (TH/bZIP et TR β)	

ANIMAUX ET TRAITEMENTS

Têtards transgéniques

Des générations F1 et F2 de têtards transgéniques ont été produites en croisant des fondateurs transgéniques avec des *X. laevis* sauvages fournis par le Centre d'Élevage de Rennes. Les fondateurs (géniteurs) ont été produits en intégrant le transgène TH/bZIP couplé avec un gène de protéine fluorescente verte (GFP). Le promoteur γ crystalline (exprimé uniquement dans l'œil) couplé avec un rapporteur fluorescent rouge RedFP, a été co-intégré avec le TH/bZIP GFP pour permettre un tri aisé des têtards transgéniques. Les têtards ont été élevés dans de l'eau du robinet préalablement déchlorée et désiodée. Les têtards ont été triés par stade selon la classification de Nieuwkoop et Faber (NF). Les soins et traitements des animaux utilisés dans cette étude ont été réalisés selon les directives institutionnelles et nationales.

Produits chimiques

L'éthanol (99%) a été commandé chez Carlo Erba (Val de Reuil, France), la triiodothyronine (T_3 , >98% Sigma), thyroxine (T_4 , 98% Sigma), l'acide 3, 5, 3'- triiodothyroacetique (TRIAC, 98%, Sigma), méthimazole (>98% Sigma), le BPA (99%, Sigma), le TBBPA (97%, Aldrich), l'acide iopanoïque (98%, Aldrich) et le perchlorate de sodium (Fluka) ont été fournis par Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France). Le GC-1 et le NH-3 ont été gracieusement fournis par T. Scanlan.

La T_3 , la T_4 et l'acide iopanoïque ont été dissout dans 30% de NaOH 1M et 70% d'eau stérilisée. Le méthimazole et le perchlorate de sodium ont été dissout directement dans de l'eau MilliQ. Le BPA, le TBBPA, le NH-3, le GC-1 et le TRIAC ont été dissout dans de l'éthanol 100%.

Des aliquots de solution mère ($10^{-2}M$) ont été conservés à $-20^{\circ}C$ pour la T_3 , la T_4 , le TRIAC, le NH-3 et le GC-1. Toutes les autres solutions ont été préparées extemporanément.

L'optimisation des stades à utiliser pour le MFA (multiwell fluorescent assay)

Afin d'optimiser les stades pour le MFA nous avons quantifié l'activité transcriptionnelle de têtards transgéniques, de seconde génération (F1), des stades embryonnaires NF40 jusqu'aux stades larvaires NF45.

L'induction par des hormones thyroïdiennes exogènes à différents moments de développement entre les stades 42 et 52 a été ensuite évaluée. Les têtards ont été triés par stades et niveaux de fluorescence, puis placés dans des plaques 6 puits (TPP, Suisse) ou dans des aquaria de 5 litres pour les têtards de stade NF52. Des photos des têtards traités avec ou sans T_3 à $5.10^{-9}M$ ou $10^{-8}M$ ont été prises toutes les 24h pendant 3 ou 4 jours.

Traitements

Les œufs fertilisés ont été transférés selon leurs stades et niveaux de fluorescence, 24h avant le traitement. Les têtards transgéniques ont été placés par 10 ou 15 têtards puits dans des plaques 6 puits transparentes à $24^{\circ}\pm 0.5^{\circ}C$.

Les produits chimiques ont été dilués dans des tubes silanisés 1,5ml (Eppendorf). Les dilutions ont été réalisées

en ajoutant 5 μ l de la dilution dans des tubes Greiner (Greiner Bio one, France) 50ml remplis d'eau. Le milieu a été renouvelé toutes les 24 heures.

Pour la lecture de fluorescence, soit par imagerie soit par la lecture de plaque, les têtards ont été anesthésiés dans du Ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate salt 0,01% (Sigma).

Imagerie

Les photographies ont été prises avec un microscope de dissection Olympus, équipé de filtres fluorescence GFP et avec une caméra d'acquisition DP50 (Olympus, Rungis, France). Toutes les photos ont été prises avec les mêmes paramètres (objectif 32x, expositions de 4s, intensité 100). Le logiciel *Studiolite* a été utilisé pour acquérir les photos et *ImageJ* pour quantifier la fluorescence. La région d'intérêt (ROI) a été définie au niveau de la tête (intestins exclus afin d'éviter l'autofluorescence due au vitellus toujours présent dans le tissu intestinal à ce stade). Les données sont exprimées en unités relatives de fluorescence (RFU).

Lecture sur plaque (96 puits) automatisée

Les têtards sont placés dans une plaque 96 puits, noire, à fond conique (Greiner Bio One, France). Un têtard est placé dans chaque puits avec la tête au centre du puits. Les têtards sont orientés avec la face dorsale en contact avec la plaque pour minimiser l'interférence du signal GFP avec les mélanophores présents sur la face dorsale. La fluorescence a été mesurée avec un lecteur automatique Ultra Evolution X de chez TECAN. Ce système permet une lecture et une acquisition de la plaque complète en 20 minutes.

Analyse statistique des résultats

Les résultats *in vivo* ont été exprimés par des moyennes \pm SEM par groupe. Nous avons utilisé un test ANOVA pour déterminer la significativité statistique des différences entre groupes.

Vérification de la robustesse des résultats par qPCR

Le transgène utilisé pour créer la lignée reportrice de tout effet de substances agissant au niveau thyroïdien fut choisit suite à un article d'une équipe américaine décrivant ce gène régulé par les hormones thyroïdiennes (Furlow and Brown, 1999). Ce gène a ensuite été étudié par de nombreuses équipes qui ont confirmé sa régulation par les hormones thyroïdiennes (Turque *et al.*, 2005). Il a également été démontré que le facteur de transcription TH/bZip est produit en plus grande quantité, suite à un même traitement à la T_3 en

comparaison à d'autres gènes connus comme étant régulés par la T_3 (comme le gène TR β codant pour le récepteur aux hormones thyroïdiennes) (Jagnytsch *et al.*, 2006).

Nous avons décidé de quantifier de manière fine la production endogène des ARN messagers codant pour les facteurs de transcription TH/bZip et TR α and β . Nous effectuons le même type de traitement qu'avec les têtards transgéniques sur des têtards « sauvages ». Les têtards sont placés en balnéation avec la substance à tester à la concentration voulue pendant 72h, avec un renouvellement quotidien du milieu. Les têtards sont récupérés au bout de 72h par lot de 3 pour pouvoir obtenir une quantité d'ARN assez conséquente et pour minimiser les variations inter-individuelles.

Les ARN totaux sont extraits (ARN messagers de tous les gènes des têtards, ARN de transfert, ARN mitochondriaux, ARN non épissés). Sur ce mélange d'ARN nous pouvons étudier le gène d'intérêt. Une transcription inverse des ARNm est réalisée grâce à des oligonucléotides dégénérés et une enzyme permettant de créer une copie ADN à partir de l'ARNm de départ. Tous les ARNm et seulement ces ARN là vont être retrotranscrits en ADN grâce à une retrotranscriptase. C'est ensuite sur ce mélange d'ADNc (ADN codants car les ARNm sont la dernière version des ARN avant d'être traduits en protéine) que nous effectuons une PCR ou réaction de polymérisation en chaîne de l'ADNc choisi. Pour sélectionner le gène désiré un travail de recherche de séquences et de spécificités de sonde (appelées encore amorces, primers ou oligonucléotides) est nécessaire.

DETERMINATION DU STADE D'INTERET POUR L'ETUDE DE PERTURBATIONS THYROÏDIENNES

Deux contraintes conditionnent la sélection du stade d'intérêt de Xénope pour les expériences prévues :

- Absence d'interférence du vitellus avec le signal fluorescent émit par la GFP (green fluorescent protein);
- Préférence pour l'utilisation d'un stade embryonnaire (qui ne se nourrit pas).

Le Xénope se développe grâce aux réserves énergétiques contenues dans le vitellus de l'œuf qui s'amenuisent au fur et à mesure de l'embryogénèse, jusqu'à leur épuisement total au stade NF47. La localisation de ces réserves dans une moitié du têtard encore au stade NF35 va diminuer jusqu'à n'être plus visible que dans le tissu qui formera les intestins à partir du stade NF40. Ces réserves vitellines présentent une fluorescence naturelle qui interfère dans l'intervalle de longueurs d'ondes utilisé pour la détection de la GFP.

Pourtant, afin que le test de criblage rapide puisse être utilisé en routine dans des laboratoires qui n'ont pas forcément d'autorisation d'hébergement d'animaux de laboratoire, il fallait que l'on sélectionne un stade auquel les têtards n'avaient pas commencé à se nourrir (leur survie étant assurée par les réserves vitellines). Pour le Xénope, le stade où l'on commence à voir apparaître des traces de nourriture dans les intestins est le stade 46. Pour ces raisons, il fallait un stade présentant à la fois une faible proportion de vitellus résiduel, mais qui soit également antérieur au stade 46. Nous avons testé les stades 42 (4 jours de développement) et 45 (5 jours de développement) qui répondent tous deux à ces contraintes.

Les premières expériences réalisées sur les stades 42 ont montré une réponse aux hormones thyroïdiennes, détectable et significative mais peu robuste car non reproductible. De plus le suivi de la fluorescence endogène de ces têtards a montré que l'utilisation du stade 42 comme stade de départ pouvait être problématique. Sur la Figure 1 nous pouvons observer que le taux de base de la fluorescence des têtards. La seule différence entre les stades 42 et 44 est une

chute de la fluorescence d'environ 60%. La fluorescence au sein même des têtards n'est pas stable dans le temps ce qui signifie que dans une expérience de suivi de fluorescence, avec le stade 42, nous n'aurions pas pu conclure quant à une baisse ou une augmentation de fluorescence. Cette variation observée aurait pu tout autant être attribuée à un retard de croissance qu'à la molécule étudiée elle-même. Ce problème ne se pose pas si nous regardons le stade 45. La fluorescence est stable du point 0 et sur plus de quatre jours (non testé après).

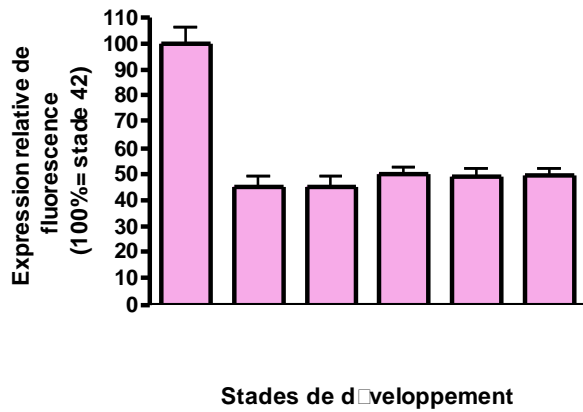


Figure 1 Suivi de l'expression basale du transgène au cours du temps en fonction du stade de départ NF45

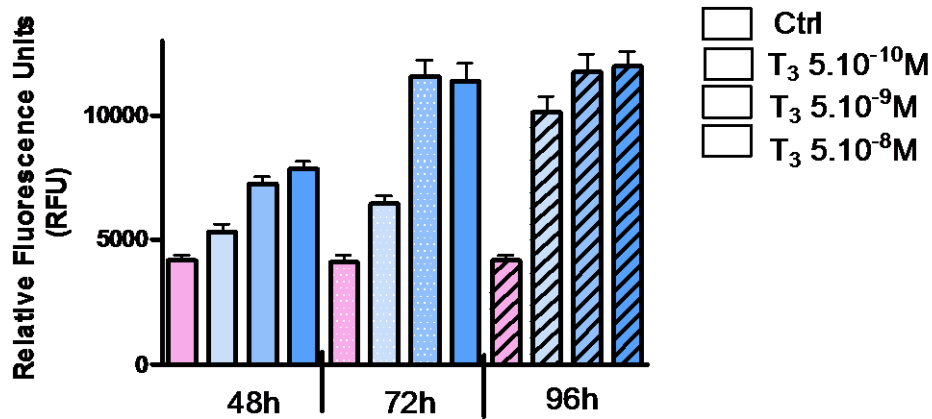


Figure 2 Expression du transgène en fonction du temps de traitement et de la concentration de T3

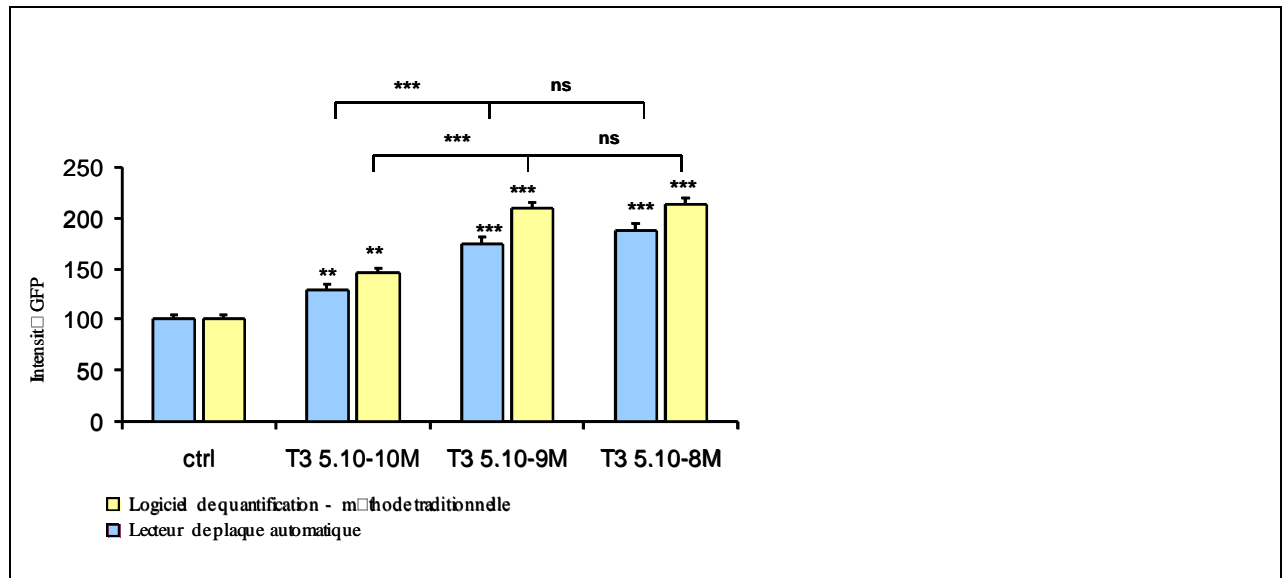


Figure 3 Comparaison des méthodes utilisées pour quantifier la fluorescence

Dans des expériences de traitement à l'hormone thyroïdienne, une réponse robuste et stable à la T₃ sur 3 jours a été quantifiée (Figure 2). Nous avons testé en même temps notre système de lecture automatisé et avons pu observer une bonne corrélation entre les deux types de lecture (Figure 3). Le stade NF45 a été choisi pour l'ensemble des expériences et nous avons continué à éprouver notre système de lecture automatisée pour ne plus utiliser que cette technique, les résultats obtenus étant quasi superposables.

Le tableau suivant présente une comparaison des différents stades de développement du Xénope, ce qui justifie notre sélection du stade 45 pour la mise au point et la validation de notre test. L'inclusion du stade 52, prémétamorphique, est à but comparatif (notons que le test AMA se sert du stade NF51).

	Stade NF42	Stade NF45	Stade NF52
Durée de temps avant d'atteindre le stade	4 jours	5 jours	21 jours
Taille	Petit (mm)	Petit (mm)	Grand (cm)
Lecture automatisée de fluorescence sur plaque (96 puits)	Oui	Oui	Impossible
Niveau d'activité de la glande thyroïdienne	Début	Bas	Modéré
L'embryon se nourrit	Non	Début	Oui
Réponse à l'hormone T ₃ sous 2-3 jours	Variable	Robuste	Robuste
Variabilité entre essais du signal de la protéine verte fluorescente	Oui	Non	Non

LES RECEPTEURS AUX HORMONES THYROIDIENNES

Chez les vertébrés, il existe deux isoformes de TR : TR α et TR β . D'un point de vue évolutif, les récepteurs sont extrêmement bien conservés entre les espèces. L'isotype α du récepteur aux hormones thyroïdiennes, TR α , de *X.laevis* comparé au TR α humain montre une similitude de séquence supérieure à 95% entre les domaines de liaison à l'ADN (DBD) et supérieure à 91% entre les domaines de liaison au ligand (LBD). Pour l'isotype TR β , les similitudes sont supérieures : plus de 96% entre les DBD et plus de 94% entre les LBD (Yaoita et al. 1990). Chez le rat il existe quatre isotypes TR α (TR α 1, TR α 2, TR Δ α 1 et TR Δ α 2) et quatre isotypes TR β (TR β 1, TR β 2, TR β 3 et TR Δ β 3). Les isotypes TR β 3 et TR Δ β 3 n'ont été trouvés que chez le rat. Il existe également des formes mitochondriales des TR (p43 et p28)

Les deux isoformes de TR ne présentent pas les mêmes profils d'expression au cours du développement de xénope. L'expression de RXR α est très forte dès les stades embryonnaires. Les travaux réalisés par Yaoita et Brown (1990), de Shi (2000) de Havis et al. (2003), montrent que durant les stades embryonnaires les niveaux d'ARNm de TR α et de TR β sont très faibles.

L'expression de l'ARNm de TR α augmente dès le stade NF35 et atteint un maximum d'expression au stade NF56 qui reste constant jusqu'à la métamorphose, puis chute après le climax. L'utilisation de la RT-PCR quantitative a permis de détecter les messagers de TR α dans l'œuf (Banker et al. 1991), résultat qui a été confirmé par la recherche des profils protéiques de récepteurs par Eliceri et Brown (1994). L'expression du TR β est très faible jusqu'aux stades prométamorphiques où débute un pic d'expression corrélé avec le pic de T3 (Yaoita et Brown, 1990). Cette corrélation a suggéré que l'expression de TR β était dépendante des HT. Cette hypothèse a vite été validée et les effets de l'induction des ARNm TR β est visible quelques heures le traitement à la T3. Les études d'une partie du promoteur de TR β ont montré la présence de DR4 parfaits (« Direct Repeat » de deux motifs AGGTCA espacés de 4 nucléotides. AGGTCA est le motif reconnu par le TR).

L'expression prédominante de TR α durant l'embryogénèse a laissé envisager un rôle répresseur de l'expression de gènes cibles. Des expériences réalisées par le groupe de Sachs ont montré une répression active du TR α en absence de T3. En effet, par mutation sur le domaine de liaison à l'ADN à TR α , des défauts au niveau de la formation de l'œil étaient visibles. Une étude récente montre par aillerus chez le xénope, que le TR α a un rôle dans le maintien des cellules en prolifération alors que le TR β a un rôle dans la différenciation ou la disparition des tissus.

Note sur le qPCR et la présentation des résultats

La vérification par expériences de PCR quantitative (qPCR) a pour objectif de montrer la pertinence biologique de notre test en étudiant des gènes cibles de la T3. Nous avons sélectionné le gène ThbZIP dont le promoteur conduit l'expression de la GFP dans nos têtards transgéniques, mais également les gènes des récepteurs aux hormones thyroïdiennes le TR alpha et le bêta.

Les études de qPCR ont été effectuées sur l'appareil Applied Biosystems 7300. Tous les primers ont été établis et testés de prime abord sur le logiciel Primer Express puis par établissement de courbes standards (5 dilutions d'un échantillon connu) et courbes de dissociations (vérification d'une amplification spécifique). L'efficacité des primers est donnée par la pente obtenue lors de l'établissement de la courbe standard. Les efficacités obtenues sont les suivantes

	Pentes	Efficacités(%)
TR alpha+beta	-3,10350	110
TR alpha	-3,17803	106,38
ThbZIP	-3,10296	109,98
EF1 alpha	-3,32546	99,85

Les efficacités supérieures à 100% sont dues à une limitation de la modélisation mathématique et non à une amplification non spécifique, ceci ayant été vérifié par amplification d'un seul amplicon (courbes de dissociation). Les valeurs acceptables sont 100% \pm 10% (guidelines Applied Biosystem).

Nous n'avons pas utilisé de sonde Taqman et avons préféré la technologie SybR green.

Toutes les études ont été effectuées en quantification relative par rapport au gène endogène EF1alpha (Facteur d'élongation de l'ADN). Les quantifications ont donc été réalisées selon la méthode dite du DDCT qui consiste en une première différence entre les Ct (nombre de cycles

d'amplification) du gène d'intérêt et ceux du gène endogène dit de « ménage » (à un seuil établi pour chaque gène). La seconde différence est établie entre les Dct calculés précédemment entre deux échantillons : Dct échantillon traité moins Dct échantillon contrôle. Cette double différence est corrigée par une fonction de doublement $2^{\text{exp}(-\text{DDCt})}$ qui permet d'intégrer le doublement des amplicons à chaque cycle de PCR.

Les séquences des primers sont les suivantes:

TR Alpha et Beta

F 5'- GCT GCA GGC TGT TTT GCT AAT-3'

R 5'- CCA GAA GTG GGG AAT GTT GTG TT-3'

TR Alpha

F 5' CGC CTT GGT CTC TTC GGA T 3'

R 5' CCC ATA CAT TGG CTG TTC TTT CTT T 3'

EF1 alpha

F 5'- TGG ATA TGC CCC TGT GTT GGA TT-3'

R 5'- TCC ACG CAC ATT GGC TTT CCT-3'

Thbzip Rev

5'GGTCACGTACCAGGCCAAA3'

Thbzip For

5'CCCGTCTCCGTGCTGAACT3'

La section qui suit fait état de nos résultats qPCR sur le gène THbZIP, le gène TR alpha et les gènes TR alpha et bêta indissociés.

L'ensemble des résultats est présenté par substance testée, sous la forme de quatre panneaux. Le panneau A montre le résultat des détections réalisées grâce à notre test de détection, le panneau B montre l'expression du gène THbZIP endogène, le panneau C l'expression du gène TR alpha et enfin le panneau D montre l'expression des gènes TR alpha et bêta indissociés. En effet, le gène TR bêta étant très peu exprimé aux stades d'études de nos têtards il semblait plus judicieux d'étudier les différences observés entre le TR alpha et le TR alpha et bêta que de prendre un couple d'amorces spécifique TR bêta.

Les qPCR (panneaux B,C,D) sont représentées en « box plot ». Cette représentation en quartiles permet d'apprécier la dispersion, chaque trait horizontal montrant un quartile (25% des points se trouvant entre deux traits). Le trait se trouvant dans les boîtes est la médiane qui montre que de part et d'autre se trouvent 50% des points.

Note sur les Figures 4 à 8. Ces quantifications sont réalisées après 72 h de traitement et un renouvellement quotidien. A) représente l'induction du THbZIP obtenue à l'aide des têtards transgéniques (15 têtards/point) et mesurée par quantification automatique de fluorescence. B) représentation des quartiles des variations obtenues sur le gène THbZIP endogène et quantifiées par qPCR C) représentation des quartiles des variations obtenues sur le gène du récepteur TR alpha et quantifiées par qPCR. D) représentation des quartiles des variations obtenues sur les gènes TR alpha et bêta sans distinction et quantifiées par qPCR. Pour les mesures par qPCR, chaque point correspond à la moyenne de 5 à 12 répétitions et normalisé par rapport au contrôle à 1. Deux pontes ont été utilisées pour obtenir le nombre de points suffisants. Les différentes statistiques ont été estimées par une analyse de variance One way ANOVA suivie d'un test de Newman-Keuls. Les étoiles au dessus des histogrammes ou quartiles représentent les différences par rapport au groupe contrôle *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

OBJECTIF 1 VALIDATION DU TEST AVEC DES AGONISTES (ET VERIFICATION AVEC QPCR)

Un agoniste est une molécule interagissant avec un récepteur en lieu et place d'une hormone donnée. L'agoniste mime l'hormone et permet l'activation de la transcription, son effet peut être additif à celui de l'hormone naturelle.

Une série de tests a été réalisée afin de déterminer l'effet de doses croissantes de T₃, T₄ et TRIAC sur l'expression du transgène.

La triiodothyronine T₃

La triiodothyronine est l'hormone biologiquement active. Elle est produite en faibles quantités par la glande thyroïde et est surtout formée par désiodation de la T₄ directement au niveau des tissus cibles.

L'induction par la T₃ observée à l'aide de nos têtards transgéniques reflète ce qui se passe au niveau de gènes endogènes régulés positivement par la T₃ (Figure 4).

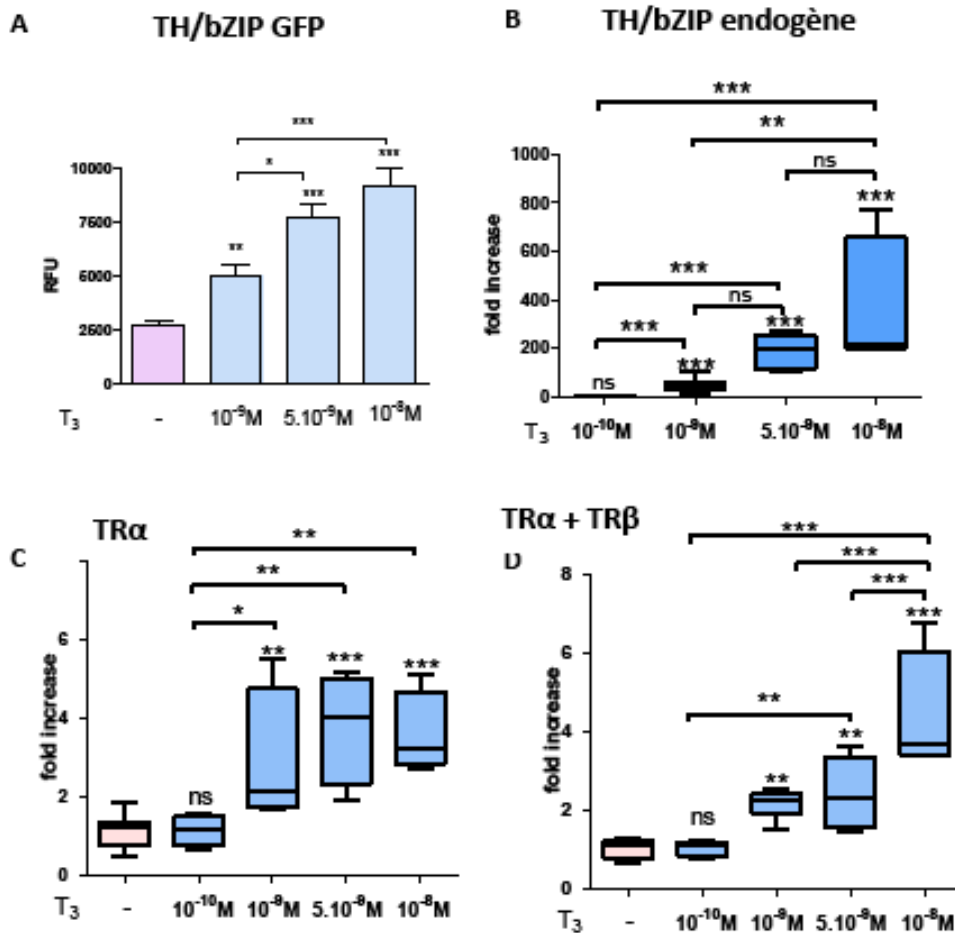


Figure 4 Gamme dose réponse de la triiodothyronine (T₃) sur l'expression des gènes THbZIP, TRalpha TRbêta.

Les trois concentrations de T_3 que nous avons testées sont tout à fait pertinentes d'un point de vue physiologique puisque la plus haute correspond à la concentration approximative produite lors du climax métamorphique du têtard mais également au pic intra-utérin produit par la femme enceinte lors du troisième trimestre de grossesse.

Les concentrations plus faibles de l'ordre du nanomolaire ($10^{-9}M$) sont représentatives des concentrations sanguines de T_4 circulantes. La T_3 se retrouve assez peu dans le sang car c'est la T_4 peu active qui est produite majoritairement par la glande thyroïde. C'est l'action des désiodases dans les tissus cibles qui va permettre l'activation de l'hormone par une 5' désiodation faisant passer de la forme T_4 en T_3 .

Comme le montre la Figure 4 (panneau A), l'expression du THbZIP endogène est très fortement induite après un traitement de trois jours à la T_3 . Une induction de 40 fois est observée après un traitement à 1nM, de 200 fois avec 5nM et entre 250 et 600 fois avec un traitement à 10nM. L'aspect dose-réponse est détecté puisqu'il existe une différence significative (ANOVA puis Newman-Keuls) entre les doses $10^{-10}M$ et $10^{-9}M$ et $10^{-9}M$ et $10^{-8}M$ par exemple.

L'expression du gène du récepteur aux hormones thyroïdiennes alpha est également induit par la T_3 (panneau C). On peut noter que les niveaux d'induction sont bien inférieurs à ceux observés avec THbZIP. Ceci s'explique par le caractère ON/OFF du gène THbZIP qui est un gène de réponse rapide aux hormones thyroïdiennes alors que les gènes des récepteurs aux hormones thyroïdiennes sont des gènes de régulation plus fine et sont des gènes de réponse tardive. Ceci confirme que nous avons fait le bon choix en orientant notre décision vers le gène THbZIP pour la création de nos têtards transgéniques. De façon intéressante le TR alpha n'est pas plus induit par une dose allant de $10^{-9}M$ à $10^{-8}M$, toutes trois prodiguant une induction de l'expression du gène de deux fois.

Si nous regardons l'expression des récepteurs TR alpha et bêta (panneau D) l'induction est du même ordre de grandeur. Cependant l'effet dose est observé dans ce cas étant donné que la plus forte concentration, $10^{-8}M$, donne la plus forte induction (quatre fois). Ceci peut s'expliquer par l'autoinduction du gène TR bêta par les hormones thyroïdiennes (Yaoita *et al.*, 1990). Ceci mériterait d'être étudié précisément avec des amorces spécifiques de TR bêta

La Tetraiodothyronine T_4

La tétraiodothyronine est la pro-hormone. Peu biologiquement active, c'est elle qui est retrouvée en plus grande quantité dans le sérum. Elle est prise en charge par des protéines de transport et est véhiculée jusqu'aux tissus cibles. L'induction par la T_4 observée à l'aide de nos têtards transgéniques reflète à l'identique ce qui se passe au niveau de gènes endogènes régulés positivement par la T_3 .

Les trois concentrations de T_4 testées sont plus fortes que celles utilisées avec la T_3 . Dans le laps de temps que nous avons accordé à nos manipulations, il faut que la T_4 soit activée en T_3 . L'action des désiodases au stade de Xénope choisi est présente mais peu importante (Morvan Dubois *et al.*, 2006; Fini *et al.*, 2007; Tindall *et al.*, 2007).

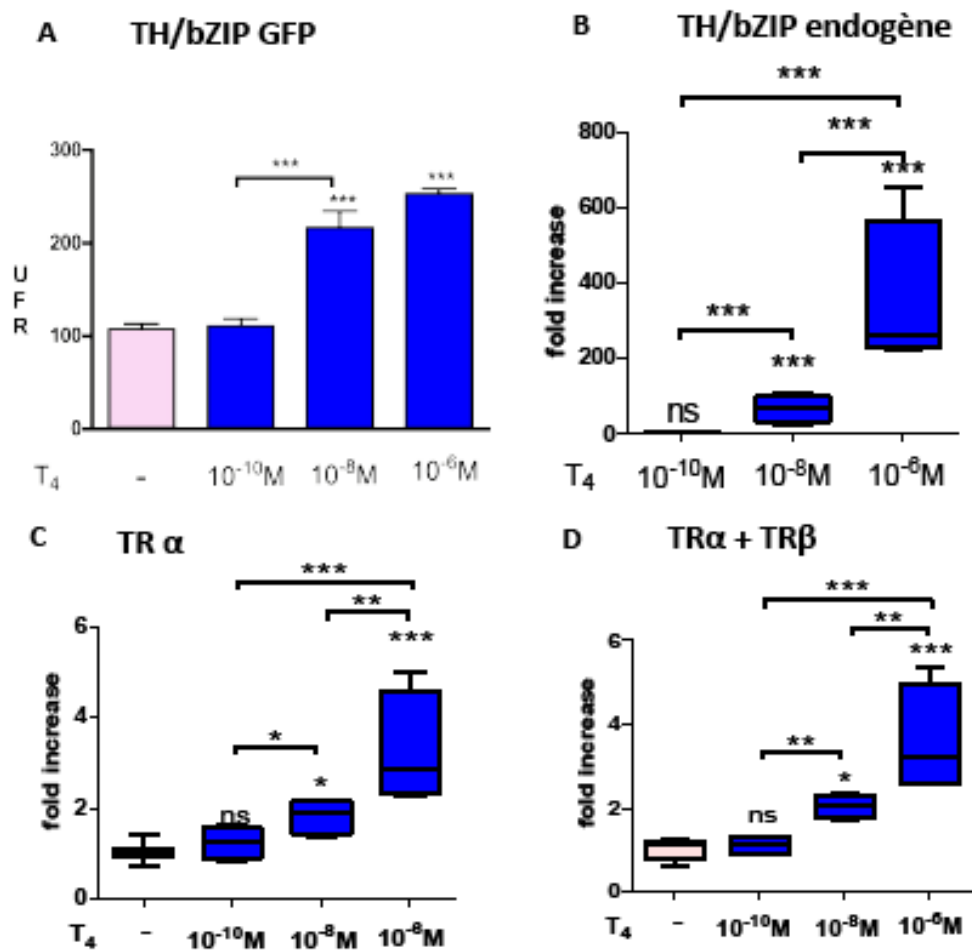


Figure 5 Gamme dose réponse de la tetra iodothyronine (T4) sur l'expression des gènes THbZIP, TRalpha TRbêta.

Sur la Figure 5 nous pouvons observer qu'avec les têtards transgéniques nous avons détecté des concentrations de 10nM et 1µM. Ce sont ces deux mêmes concentrations qui permettent une induction significative voire extrêmement significative pour les trois gènes ou groupe de gènes étudiés. La concentration 10^{-10} M non détectée par quantification de fluorescence n'induit pas l'expression de THbZIP ou des TRs en endogène ce qui reflète la grande sensibilité du test.

Les ARN messagers du THbZIP sont induits de 45 fois par la concentration 10nM de T_4 et entre 200 et 600 fois par 1µM de T_4 (panneau B). De façon similaire, le TR alpha est induit de deux fois par la concentration 10nM et de presque 6 fois par la concentration 1µM (panneau C). Pas de différences d'expression ne sont à noter quant à la comparaison TR alpha et TR alpha et bêta.

L'acide triiodothyroacétique TRIAC

L'acide triiodothyroacétique ou TRIAC est un conjugué aminé naturel des hormones thyroïdiennes. C'est un agoniste naturel de la T_3 , qui prend la place de l'hormone au niveau du récepteur. Il peut rentrer en compétition avec l'hormone thyroïdienne et engendrer le même type de réponse. Ce composé lie les récepteurs avec une préférence pour l'iso type bêta (voir section sur Objectif 4, travaux du Dr Balaguer ci dessous).

Nous avons testé trois concentrations de 10^{-8} M à 10^{-6} M avec les têtards transgéniques et obtenu une très forte induction de l'expression de la GFP (Figure 6, panneau A). Cependant nous n'avons pas obtenu de dose réponse. Pour s'assurer que ce n'était pas les doses trop proches qui étaient la cause de ce phénomène nous avons décidé de tester les concentrations 10^{-10} M, 10^{-8} M et 10^{-6} M de façon à élargir un peu la gamme de concentrations testées. De façon très étonnante ces trois concentrations permettent une induction de 200 fois l'expression du gène THbZIP par rapport aux contrôles et aucune différence n'est observée entre les groupes (panneau B). Ceci est observé de manière identique sur les gènes TR alpha *et* alpha+ bêta avec une induction aux alentours de 2 fois celle du contrôle (panneau C et D).

L'induction par le TRIAC observé à l'aide de nos têtards transgéniques et la non détection de différences entre les concentrations reflète une réalité physiologique mise à jour par l'étude en PCR quantitative.

GC-1 agoniste de synthèse de la T_3

La technique a aussi été validée avec un agoniste de la T_3 , le GC-1 (10^{-7} M) qui est un agoniste de synthèse créée par l'équipe de Thomas Scanlan. Le traitement avec cette molécule a montré une induction de la fluorescence très significative avec les têtards transgéniques. Cet agoniste spécifique d'un isotype du récepteur aux hormones thyroïdiennes (le TRβ) est intéressant car a permis de confirmer une présence de cet isotype à de si jeunes stades. Les résultats sont consignés dans un papier actuellement accessible électroniquement (Fini *et al.*, 2007).

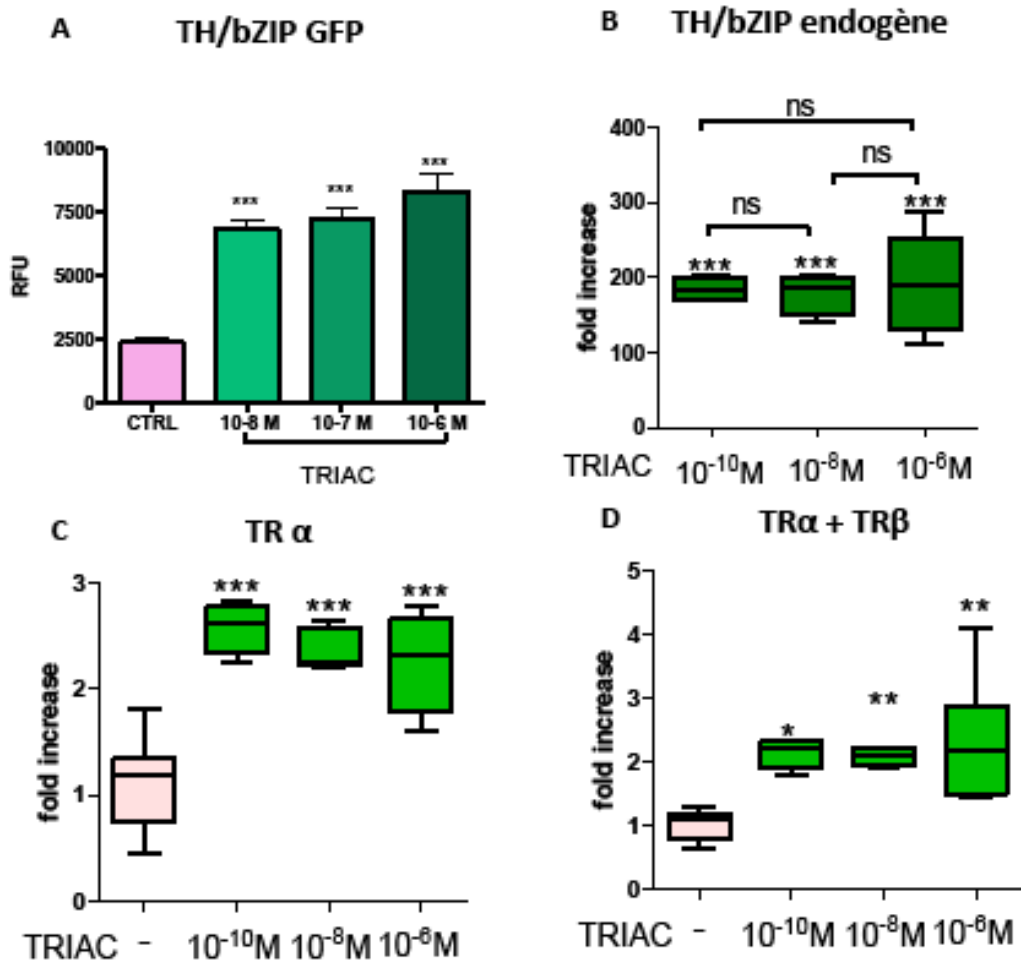


Figure 6 Gamme dose réponse de l'acide triodo acétique métabolite agoniste naturel, sur l'expression des gènes THbZIP, TRalpha TRbêta.

OBJECTIF 2 VALIDATION DU TEST AVEC DES ANTAGONISTES (ET VERIFICATION AVEC qPCR)

Le méthimazole

Le méthimazole est un inhibiteur de la signalisation thyroïdienne. C'est un médicament qui bloque l'organification de l'iode (synthèse) par une action contre l'enzyme thyroïde peroxydase (TPO). Cette enzyme est présente dans la thyroïde mais également dans d'autres tissus comme le système nerveux (Tindall, 2006).

Nous avons pu détecter une action anti thyroïdienne contre la T_3 avec des concentrations de l'ordre du millimolaire. Nous avons testé trois concentrations $10^{-5}M$, $10^{-4}M$ et $10^{-3}M$ et évalué le potentiel inhibiteur thyroïdien par qPCR sur trois gènes endogènes. La concentration de référence pour obtenir un effet anti-thyroïdien maximal en culture de cellules est la concentration centrale 1mM (Cooper, 2005).

Nous avons tout d'abord testé le méthimazole seul. En effet, le taux de base observé dans le groupe contrôle nous semblait suffisant pour pouvoir observer une baisse de fluorescence. Pourtant, nous n'avons pu observer des baisses significatives qu'à de rares reprises, et nous avons également observé des hausses de fluorescence.

Nous avons donc décidé d'évaluer le méthimazole et les inhibiteurs en général en compétition avec la T_3 . L'idée était que l'activation transcriptionnelle engendrée par la T_3 soit inhibée par un traitement joint T_3 +inhibiteur (ici méthimazole). Le méthimazole a un effet antithyroïdien décelable à 1mM et à 10mM sur des xénopes TH/bZIP GFP traités pendant 72h (Figure 7, panneau A).

Sur le panneau B, l'expression du gène THbZIP n'est pas modifiée par le traitement au méthimazole seul. Ceci est similaire à ce que nous avons précédemment observé avec les têtards transgéniques. Avec un cotraitement à la T_3 nous pouvons observer un effet significatif de l'ajout d'1mM de méthimazole comparé à l'induction T_3 seule (panneau B).

Les effets observés sur l'expression du TR alpha montrent qu'en co-traitement à la T_3 toutes les concentrations testées induisent un effet inhibiteur comparé à la T_3 (panneau C). Aucune des trois concentrations testées ne modifie de manière significative la signalisation sur les gènes TR alpha et bêta (panneau D).

Il est assez surprenant de voir que le méthimazole a un effet sur le récepteur mais reste en accord avec notre hypothèse émise précédemment sur l'effet du méthimazole sur la T_3 produite de façon endogène par le têtard. La T_3 induit des gènes cibles qui augmenteraient la production endogène de T_3 . C'est cette production qui serait bloquée de manière indirecte par le méthimazole. Il faut également noter que l'effet observé sur le TR alpha serait indirect. En effet l'équipe du Dr Balaguer (voir section sur Objectif 4 ci-dessous) a montré que cette substance n'est pas un ligand ni de TR alpha ni de TR bêta.

La différence observée entre le groupe TR alpha seul et TR alpha +bêtalaisse penser que le TR bêta n'est pas régulé et de fait augmente la variabilité ou encore, suggère qu'il peut être régulé positivement.

La perturbation due à 1mM de méthimazole et observé à l'aide de notre test de détection de fluorescence est révélée à la même concentration sur le THbZIP endogène. De façon intéressante le méthimazole produit un effet (indirect comme pour le THbZIP) sur le gène TR alpha à toutes les concentrations testées.

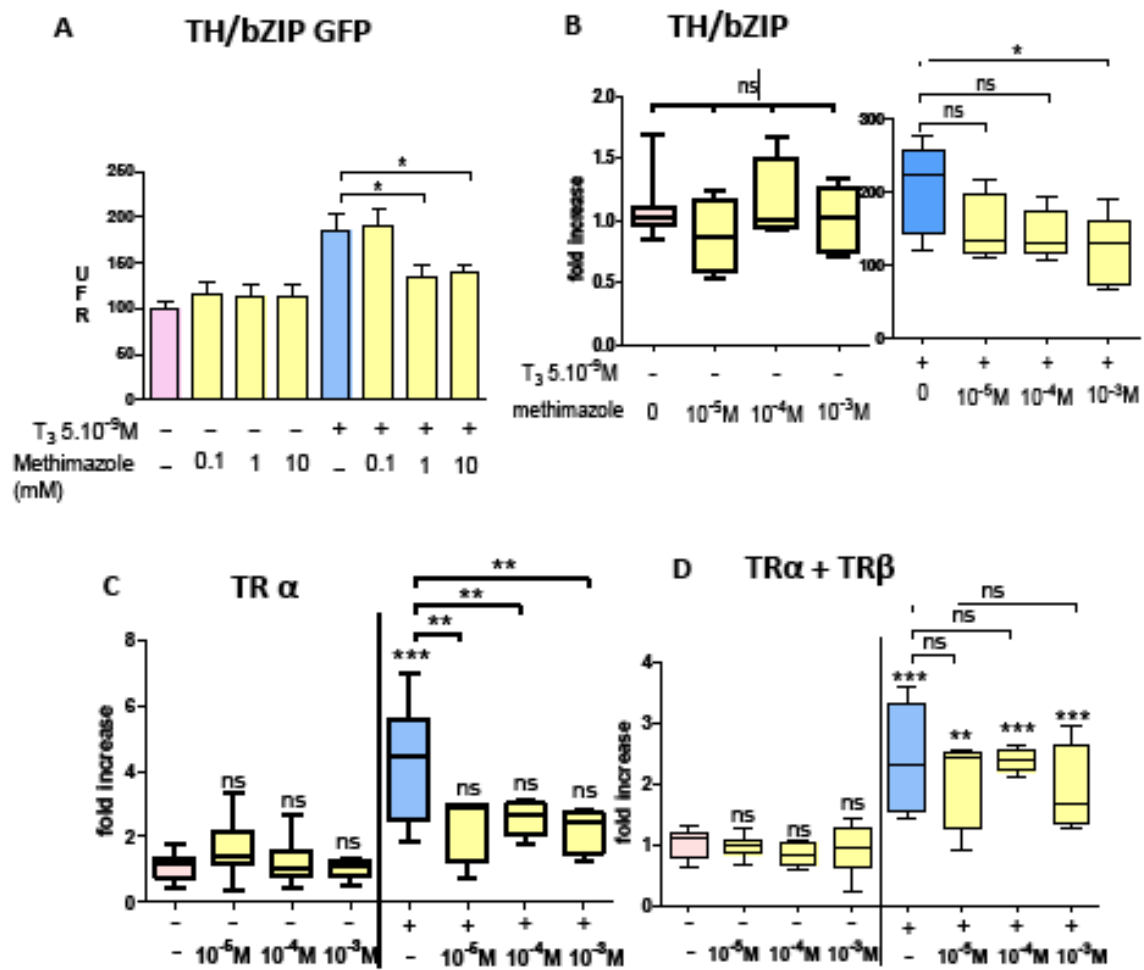


Figure 7 Influence d'un médicament antithyroïdien, le méthimazole, agissant sur la formation de l'hormone, sur l'expression des gènes THbZIP, TRalpha TRbêta

Le perchlorate de sodium

Le perchlorate de sodium (CClO_4^-) est un polluant produit par l'industrie aérospatiale. C'est un bloquant du symport sodium/iodure de la thyroïde et empêche donc par inhibition compétitive avec l'iode son incorporation par la glande thyroïde et donc la production d'hormone.

Nous avons testé trois concentrations de perchlorate de sodium $60\mu\text{g/L}$, $125\mu\text{g/L}$ et $500\mu\text{g/L}$. La même méthode de co-traitement avec la T_3 employée pour le méthimazole a été employée ici.

Sur la Figure 8 (panneau A) nous pouvons observer que nous avons pu détecter un effet du perchlorate à des concentrations de $0,5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ avec la détection de fluorescence contrôlée par le promoteur du gène THbZIP lors d'un cotraitement avec la T_3 . En absence de T_3 aucune variation du niveau de fluorescence et donc d'activité du promoteur n'avait été détectée. Ces dernières observations sont confirmées avec la quantification de l'induction du THbZIP endogène. Cependant, aucune différence significative n'a pu être révélée en cotraitement à la T_3 (panneau B). Ceci peut être expliqué par la variabilité de la T_3 et des échantillons qui empêche une détection significative au niveau statistique (Si on teste T_3 contre T_3 +perchlorate $0,5\text{mg/L}$ en test non paramétrique de MannWhitney le p est de $0,07$). La grande induction du THbZIP (induction de 200 fois en moyenne) peut également empêcher cette détection.

Ceci est d'autant plus pertinent que lorsque l'on regarde les régulations de TR alpha il existe une inhibition dose dépendante de l'induction TR (induction de 2 fois celle du contrôle) (panneau C). Les études faites par l'équipe du Dr Balaguer montrent que le perchlorate ne lie aucun des récepteurs (voir section sur Objectif 4 ci-dessous). L'action observée est donc *a priori* indirecte. Une inhibition de l'induction de gènes T_3 sensible, similaire à l'hypothèse énoncée pour le cas du méthimazole, est très probable.

Concernant la régulation des TRs alpha et bêtaconfondus, aucune différence significative n'est à noter. Ceci peut s'expliquer de la même manière que pour le méthimazole c'est-à-dire par une action « compensatrice » de TR bêta envers TR alpha (à confirmer avec amorces spécifiques de TR bêta).

La perturbation due à $0,5\text{mg/L}$ de perchlorate et observée à l'aide de notre test de détection de fluorescence n'a pu être sur le THbZIP endogène. Etant donné la faible diminution observée initialement, il serait intéressant de multiplier les échantillons sur les groupes THbZIP afin de réduire la variabilité. De façon intéressante, le perchlorate produit un effet sur le gène TR alpha de façon dose dépendante.

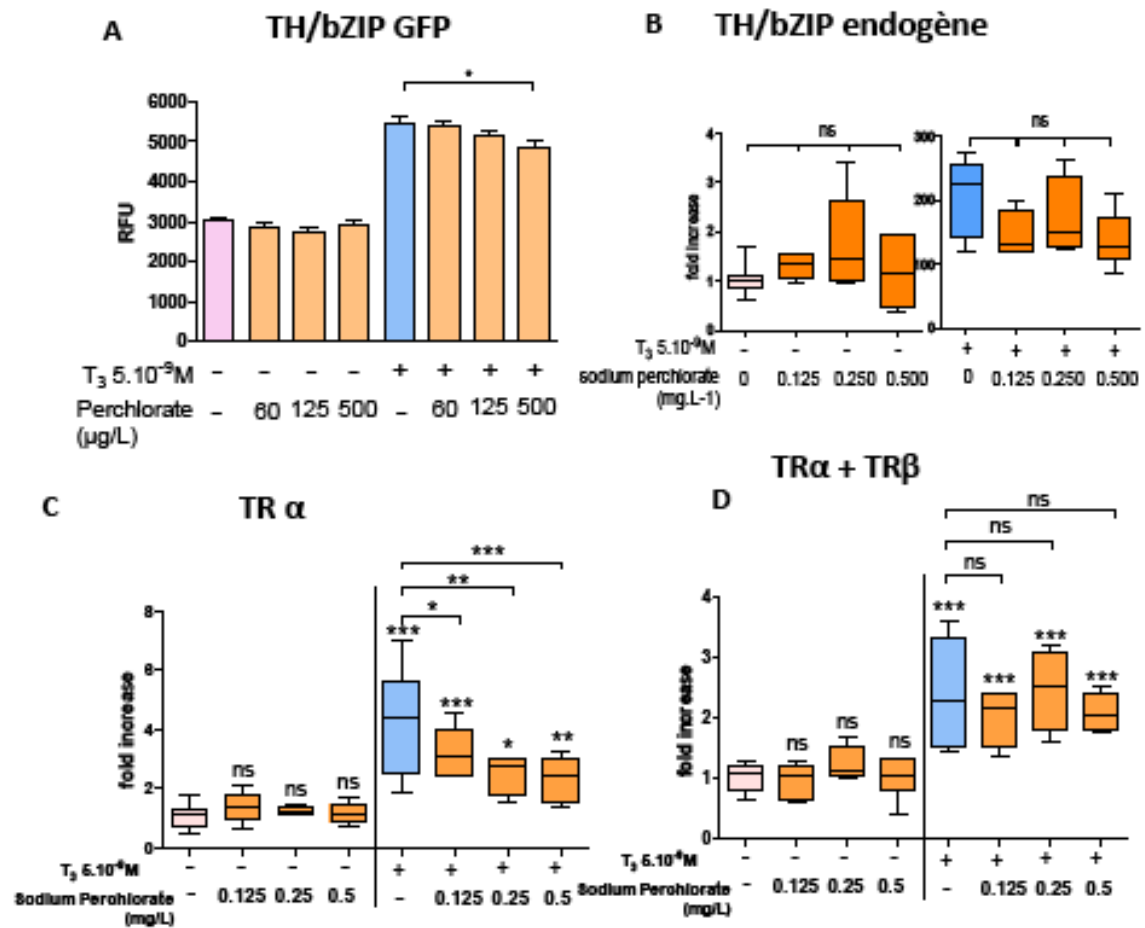


Figure 8 Effets d'un agent antithyroïdien issu de l'industrie aérospatiale, le perchlorate de sodium, sur l'expression des gènes THbZIP, TRalpha TRbêta.

PTU (propylthiouracile)

Le PTU est une des substances antagonistes référence pour le AMA test. C'est un antagoniste de la désiodase 1 (D_1). Il inhibe cette enzyme, ce qui empêche l'activation de la T_4 en T_3 et l'inactivation de la T_3 en T_2 . Il a toujours été considéré qu'il n'existait pas de D_1 chez le Xénope car les traitements au PTU n'engendraient pas les mêmes effets que chez le rat (hypothyroïdie). Cependant, une découverte récente au sein de notre laboratoire a permis de remettre en cause ce dogme en expliquant que l'inactivité du PTU était du à une mutation sur le gène de la D_1 (Morvan Dubois *et al.*, 2006). Le PTU a cependant un effet sur le Xénope car il induit un retard de développement. Nous n'étions pas sûrs de voir un effet du PTU sur l'expression du gène TH/bZIP en co-traitement avec la T_3 et avec la T_4 . Sur la Figure 9 on constate une augmentation du niveau de la fluorescence avec un co-traitement PTU/ T_3 alors que nous observons une diminution du signal en co-traitement avec PTU/ T_4 . Malgré un profil d'expression similaire à celui obtenu après traitement à l'IOP, nous ne pouvons pas donner les mêmes explications (voir Autres antagonistes, IOP) l'action du PTU n'étant pas sur les trois désiodases. Nous devons planifier des expériences supplémentaires pour apporter des explications à ce phénomène.

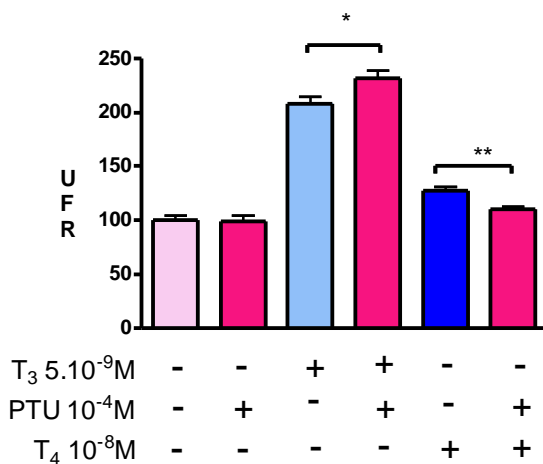


Figure 9 L'effet avec le PTU (un antagoniste)

Autres antagonistes

L'hypothèse a aussi été vérifiée avec un inhibiteur connu des désiodases : l'acide iopanoïque (IOP). L'IOP inactive la D_1 décrite ci-dessus, mais également la D_2 qui permet la transformation de T_4 en T_3 , et enfin la D_3 qui permet le passage de la forme active T_3 à une forme inactive r T_3 (T_2).

Nous avons pu observer un effet additionnel à celui de la T_3 (Figure 10). Une augmentation de fluorescence entre le groupe traité à la T_3 et celui traité à T_3 +acide iopanoïque révèle l'inactivation de la D_3 qui inactive une partie de la T_3 . Ceci était attendu et s'explique par le fait que le niveau de fluorescence obtenu avec de la T_3 seule est la conséquence de l'activité

de la T_3 moins celle de la T_3 inactivée. Cette fraction inactivée ne peut pas être présente dans le lot T_3 +IOP, les désiodases n'étant plus actives.

A contrario lorsque nous co-traitons avec de la T_4 , l'effet observé dans le lot T_4 seul est la conséquence de l'activité de la D_2 qui permet le passage $T_4 > T_3$. Cette activité est inhibée dans le lot $T_4 + IOP$ et explique le niveau de fluorescence équivalent à celui du groupe contrôle.

Lorsque nous utilisons un véritable antagoniste de la T_3 , le NH-3, développé par l'équipe de Thomas Scanlan nous pouvons observer, en co-traitement T_3 +NH-3, une abolition totale du signal normalement déclenché par la présence de T_3 .

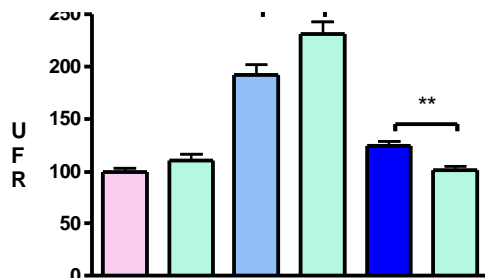


Figure 10 L'action de l'antagonistes IOP peut être révélé en 72h en co-traitement avec T_3 et T_4

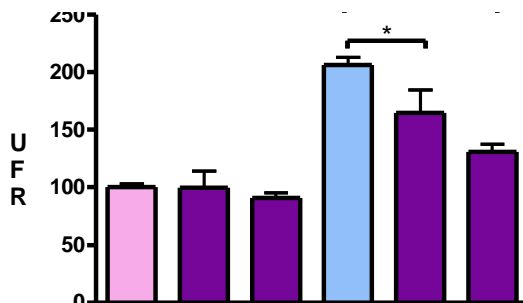


Figure 11 L'action de l'antagonistes NH3 peut être révélé en 72h en co-traitement avec T_3 et T_4

Les perturbateurs thyroïdiens

Le bisphénol A (BPA)

Le bisphénol A est un composé largement utilisé dans les industries plastiques et démontré comme ayant une faible activité oestrogénique. Son potentiel perturbateur thyroïdien a été étudié de par sa ressemblance structurelle avec les hormones thyroïdiennes.

Nous avons précédemment prouvé une action inhibitrice de la signalisation thyroïdienne par un cotraitement avec la T₃ à la concentration de 1µM et 10µM (panneau A1). Nous avons choisi de mesurer les perturbations au niveau des gènes endogènes après un traitement à la concentration de 10µM.

Sur le THbZIP, le bisphénol A seul semble avoir une action pro thyroïdienne alors qu'en cotraitement avec la T₃ on observe un effet similaire à celui déjà observé précédemment sur les têtards transgéniques. Pas d'effet du BPA n'est détecté sur la signalisation des gènes des récepteurs. Ceci est en accord avec les données de P. Balaguer qui montre que le BPA ne lie aucun des récepteurs. L'effet observé est donc indirect sur le THbZIP. Il serait intéressant d'approfondir les études sur cette substance.

La perturbation due à 10µM de BPA est observée à l'aide de notre test de détection de fluorescence est révélée à la même concentration sur le THbZIP endogène. Aucun effet du BPA n'est révélé sur les récepteurs.

Le tétra bromobisphenol A (TBBPA)

Le tetrabromobisphenol A est le retardateur de flamme bromé le plus utilisé au monde. Son action anti thyroïdienne a été démontrée de nombreuses manières. Il semblerait que son action ne soit pas directe mais plutôt *via* une perturbation du transport des hormones thyroïdiennes. Nous avons précédemment prouvé une action inhibitrice de la signalisation thyroïdienne par un cotraitement avec la T₃ à la concentration de 1µM (panneau A2). Sur le THbZIP endogène nous n'avons pas révélé une action anti thyroïdienne. Cependant nous avons étudié l'action de la T₃ et du TBBPA après 24h de traitement seulement et avons montré une inhibition extrêmement significative, de l'induction médiée par la T₃, par le TBBPA (données non montrées).

Aucun effet du TBBPA n'a été détecté sur la signalisation des gènes des récepteurs TR alpha et bêta (Panneaux C et D). Ceci est en accord avec les données du Dr Balaguer qui montrent que le TBBPA ne lie aucun des récepteurs. Ces données sont en accord avec celles de Schriks (Schriks *et al.*, 2006) mais en désaccord avec celles de Kitamura (Kitamura *et al.*, 2002, 2005). La perturbation due à 1µM de BPA est observée à l'aide de notre test de détection de fluorescence n'a pu être révélée à la même concentration sur le THbZIP endogène. Cependant des données personnelles nous permettent d'affirmer que le TBBPA a une action inhibitrice sur le THbZIP à un autre timing en endogène. Aucun effet du TBBPA n'est révélé sur les récepteurs.

Pour la Figure 12, A1) et A2) représentent l'induction du THbZIP obtenue à l'aide des têtards transgéniques (15 têtards/point), perturbées par le BPA et le TBBPA respectivement et mesurées par quantification automatique de fluorescence. B) représentation des quartiles des variations obtenues sur le gène THbZIP endogène et quantifiées par qPCR C) représentation des quartiles des variations obtenues sur le gène du récepteur TR alpha et quantifiées par qPCR. D) représentation des quartiles des variations obtenues sur les gènes TR alpha et bêtasans distinction et quantifiées par qPCR. Pour les mesures par qPCR, chaque point correspond à la moyenne de 5 à 12 répétitions et normalisé par rapport au contrôle à 1. Deux pontes ont été utilisées pour obtenir le nombre de points suffisants. Les différentes statistiques ont été estimées par une analyse de variance One way ANOVA suivie d'un test de Newman-Keuls. Les étoiles au dessus des histogrammes ou quartiles représentent les différences par rapport au groupe contrôle *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

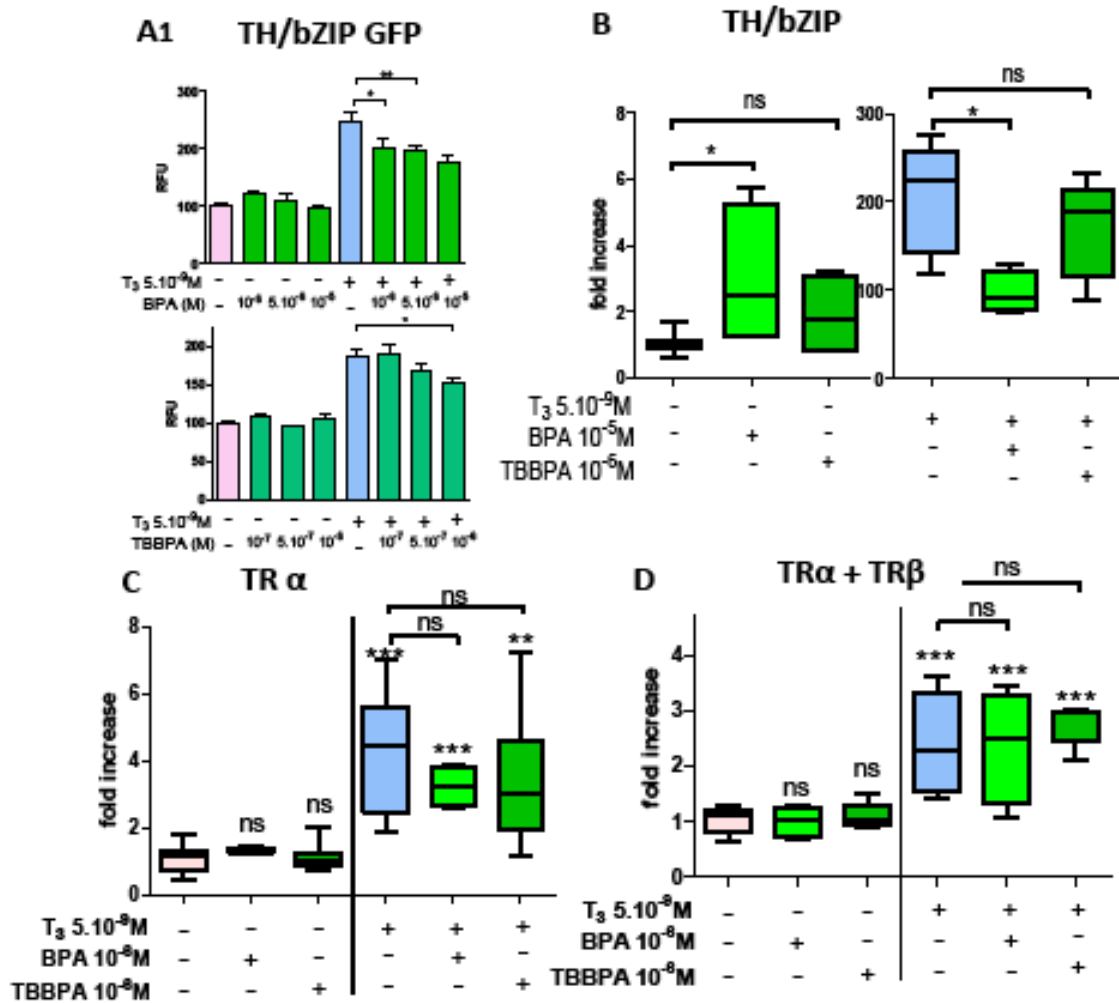


Figure 12 Effets des perturbateurs thyroïdiens le Bisphénol A et le Tétrabromobisphénol A, détectés grâce à la lecture automatique, sur l'expression des gènes THbZIP, TRalpha TRbêta.

Conclusions Objectifs 1 et 2

Conformément à nos objectifs initiaux nous avons été en mesure de développer un test de détection de la perturbation thyroïdienne. Ce test développé sur le modèle *Xenopus laevis* combine les avantages d'être rapide, automatisable, sensible, reproductible, peu coûteux et surtout d'être le reflet de ce qui se passe au niveau physiologique.

Nous avons testé différents stades de développement et avons choisi le stade NF45 (pour des questions de reproductibilité). Ensuite nous avons testé les hormones thyroïdiennes et validé une quantification dose dépendante. Nous avons pu montrer par une approche rigoureuse et élégante de traitement avec des agonistes, des antagonistes, des inhibiteurs de la signalisation, la détection de substances agissant dans le sens d'une activation de gène, d'une diminution de gène et ce à n'importe quel niveau de la signalisation thyroïdienne.

Enfin nous avons confirmé nos résultats par qPCR et démontré que le THbZIP était le meilleur candidat pour créer les transgéniques et que l'ensemble des résultats est très semblable à ce que nous avons pu détecter par l'utilisation des transgéniques.

OBJECTIF 3 COMPARER LA SENSIBILITE DES TESTS RAPIDES SUR EMBRYONS AUX STADES PRECOCES AVEC LE TEST AMA

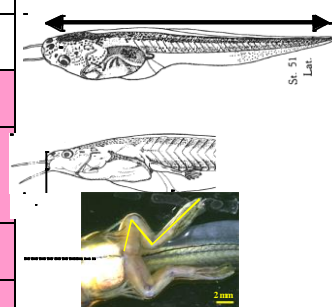
Nous proposons dans le projet de comparer la sensibilité des méthodes AMA et la lecture de fluorescence. Les premiers résultats sur les substances testées en AMA ont été présentés en congrès OCDE en 2006. Nous utilisons les données exposées pour comparer les sensibilités de notre test par rapport au AMA.

Les tests effectués au sein du test AMA avec le perchlorate de sodium, inhibiteur de la production hormonale, ont été réalisés conjointement par une équipe allemande et une équipe suisse (Moser, Lausanne, Suisse; Kloas, Allemagne). Ces équipes, initiatrices de la demande de validation du test AMA par l'OCDE, ont réalisé des relevés de critères morphologiques et histologiques.

Le test AMA simplifié ne prend en compte que les critères morphologiques, les critères histologiques étant énormément coûteux en temps et en ressources. Le Tableau 3 détaille les sensibilités inhérentes à chaque paramètre et seuls les tests histologiques permettent une sensibilité maximale.

Tableau 2 Relevés de critères morphologiques et histologiques d'après Moser (modifié pour comparer la sensibilité de la lecture automatique)

Paramètres	65 µg perchlorate/L	125 µg perchlorate/L	250 µg perchlorate/L	500 µg perchlorate/L
Poids du têtard AMA (21 jours)	-	-	-	-
Longueur totale du corps AMA (21 jours)	-	-	-	-
Retard de stade de développement AMA (21 jours)	-	-	-	*
Longueur sous-ventrale AMA (21 jours)	-	*	*	*
Longueur des bourgeons de membres AMA (21 jours)	*	*	*	*
Diamètre de la glande thyroïde AMA (21 jours)	*	*	*	*
Histologie de la glande thyroïde AMA (21 jours)	*	*	*	*
Activité inhibitrice sur le gène TH/bZIP Test de Fluorescence (72h)	Pas encore testé	p=0,08 en lecture auto, 1 manip	Pas encore testé	*



Conclusions Objectif 3

Notre test montre une sensibilité équivalente à celle des critères morphologiques mais avec l'avantage d'un gain de temps (3 jours contre 21 jours pour le AMA) et de ressources significatives.

OBJECTIF 4 COMPARER LES TESTS SUR EMBRYONS DE XENOPES A DES TESTS SUR CULTURES CELLULAIRES (EQUIPE DU DR PATRICK BALAGUER)

L'objectif de cette étude était d'évaluer, par des méthodes biologiques, l'activité de ligands naturels, synthétiques et environnementaux des récepteurs des hormones thyroïdiennes alpha et bêta. Nous avons établi une lignée cellulaire exprimant un récepteur chimérique alpha de

l'hormone thyroïdienne. Dans le cadre de ce projet, nous avons établi une lignée cellulaire exprimant un récepteur chimérique bêta de l'hormone thyroïdienne. Nous avons par la suite confirmé les activités de ligands agonistes connus de ces récepteurs. Ces ligands agonistes sont l'hormone thyroïdienne T₃, les ligands synthétiques acide 3,5,3'- triodothyroacétique (TRIAC) et le GC-1. Nous avons également testé l'activité du NH-3 qui est un antagoniste TRalpha sélectif. Enfin nous avons testé l'activité antagoniste potentielle de différentes molécules environnementales. Les composés testés ont été le TBBPA, le perchlorate de sodium, l'acide iopanoïque, le PTU, la génistéine, le méthimazole, le diclofopmethyl, le pencycuron, le flufenoxuron, le phenmedipham, l'alpha-cypermethrine et l'alpha-cyhalothrine.

Protocole expérimental

Préparation des ligands à tester

Les stocks de ligands sont préparés à 10 mM dans le DMSO. Les dilutions suivantes sont préparées (4 fois concentrées) dans du milieu de culture (40 ; 12 ; 4 ; 1,2 ; 0,4, ...µM). 50 µl de ces solutions seront ensuite ajoutées à 150 µl de milieu contenant les cellules (concentrations finales 10 ; 3 ; 1 ; 0,3 ; 0,1 ...µM).

Protocole de mesure de l'activité récepteur nucléaire

Le matériel de culture cellulaire provient de Life Technologies (Cergy Pontoise, France). Les cellules HG5LN Gal4-TR alpha at bêta sont cultivées dans du milieu de culture DMEM à 1 g/l de glucose contenant du rouge de phénol, supplémenté de 5 % de sérum de veau fœtal (SVF) et de 1 % d'antibiotiques (pénicilline / streptomycine) dans une atmosphère humide à 95 % en présence de 5 % de CO₂ et à 37°C. Les antibiotiques de sélection sont puromycine 0,5 µg/ml et G418 1 mg/ml.

Détection de la luciférase en cellules entières

Les cellules sontensemencées deux jours avant l'induction dans des plaques de culture blanches 96-puits (Greiner CellStar) à raison de 20.000 cellules par puits dans 0,2 ml de milieu test. Ce milieu test est du DMEM à 1 g/l de glucose sans rouge de phénol, supplémenté de 5 % de SVF déstéroïdé (DCC) et de 1 % d'antibiotiques (pénicilline / streptomycine). 24 heures avant l'induction, le milieu des plaques de culture est éliminé et remplacé par 150 µl de milieu test. 50 µl de milieu contenant les composés à tester (4 fois concentrés) sont ensuite ajoutés. Les cellules sont ensuite incubées 16 heures. A la fin de l'incubation, le milieu test contenant les échantillons est remplacé par 50 µl de milieu test contenant de la luciférine (0,3 mM). La luciférine diffuse dans les cellules et produit un signal stable 10 minutes plus tard. La plaque 96-puits est ensuite placée dans un luminomètre lecteur de plaque (*MicrobêtaWallac Luminometer*) et la luminescence mesurée au rythme de deux secondes par puits. Les résultats sont exprimés en unité arbitraire de luminescence (RLU) et en pourcentage d'activité luciférase, la valeur 100 % étant donnée par l'activité induite par T₃ 1 nM. Les composés sont testés en quadruplets et les expériences ont été réalisées au moins trois fois.

Résultats

Etablissement de la lignée cellulaire TR bêta

La lignée cellulaire HG5LN TR alpha avait été obtenue de la façon suivante. Tout d'abord les cellules HeLa ont été transfectées par le plasmide pGAL4RE5-bêtaGlobine-luciférase-

néomycine. Ce plasmide contient le gène de la luciférase sous le contrôle de cinq éléments de réponse à la protéine Gal4 de levure. La lignée obtenue a été appelée HG5LN. Ces cellules ont été ensuite transfectées par le plasmide pSG5-Gal4(DBD)-TR alpha (LBD)-puromycine. La protéine chimère codée par ce plasmide est constituée du domaine de liaison à l'ADN de la protéine GAL4 de levure (acides aminés 1 à 147) fusionné au domaine de liaison à l'hormone du récepteur (acides aminés 126 à 410).

De même, la lignée cellulaire HG5LN TR bêta a été construite de la façon suivante. Les cellules HG5LN ont été transfectées par le plasmide pSG5-Gal4(DBD)-TR bêta (LBD)-puromycine. La protéine chimère codée par ce plasmide est constituée du domaine de liaison à l'ADN de la protéine GAL4 fusionné au domaine de liaison à l'hormone du récepteur (acides aminés 179 à 460).

Mesure des activités TR alpha et TR bêta de ligands naturels et synthétiques de TR alpha et TR bêta

Nous avons ensuite caractérisé les deux lignées cellulaires à l'aide de ligands agonistes connus des récepteurs TR alpha et TR bêta (Figures 13 et 14).

L'hormone thyroïdienne ou T_3 a un EC50 de 0,7 nM pour TR alpha et de 1,4 nM pour TR bêta. L'acide 3,5,3'-triiodothyroacétique (TRIAC) a un EC50 de 01 nM pour TR alpha et de 0,8nM pour TR bêta. Enfin GC1 a un EC50 de 9 nM pour TR alpha et de 17 nM pour TR bêta. T_3 et GC1 semble plus affiné pour TR alpha alors que TRIAC est actif à une plus faible concentration sur TR bêta que sur TR alpha.

Enfin, nous avons testé l'activité antagoniste du NH-3. A des concentrations supérieures à 1 μ M, ce composé inhibe partiellement l'expression de la luciférase induite par T_3 1 nM dans la lignée TR alpha et pas dans la lignée TR bêta.

Mesure des activités TR alpha et TR bêta de ligands potentiels environnementaux de TR alpha et TR bêta

Enfin nous avons testé l'activité antagoniste de différentes molécules pouvant se retrouver dans l'environnement et susceptibles de se lier aux récepteurs des hormones thyroïdiennes. Les composés testés ont été le TBBPA, le perchlorate de sodium, l'acide iopanoïque, le PTU, la génistéine, le méthimazole, le diclofopmethyl, le pencycuron, le flufenoxuron, le phenmedipham, l'alpha-cypermethrine et l'alpha-cyhalothrine.

Aucun de ces composés n'a modulé l'expression de la luciférase de façon spécifique dans la gamme de concentration testée (10 μ M à 0,1 μ M).

Conclusions Objectif 4

L'équipe du Dr Balaguer a établi une lignée cellulaire exprimant le récepteur TR bêta. Ils ont pu caractériser, à l'aide de cette lignée, et de la lignée TR alpha préalablement établie, l'activité de ligands agonistes connus des récepteurs TR alpha et TR bêta. Ils ont pu montrer que les ligands agonistes T₃ et GC1 et le ligand antagoniste NH-3 sont plus affins pour TR alpha que pour TR bêta. Au contraire, le TRIAC possède une meilleure affinité pour TR bêta que pour TR alpha.

Enfin, ils ont montré que plusieurs molécules environnementales suspectées d'affecter la fonction thyroïdienne, ne se liaient pas aux récepteurs TR alpha et bêta. Le mode d'action de ces molécules pourrait passer par une compétition vis-à-vis de la T₃ au niveau des protéines de transport.

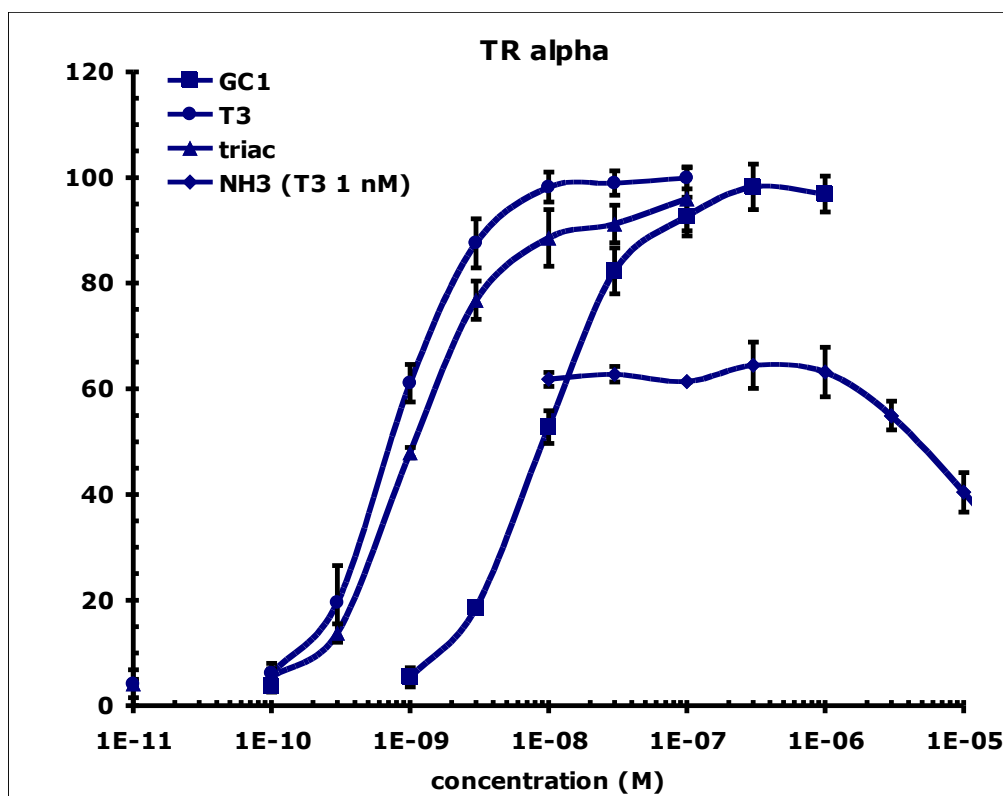


Figure 13 Transactivation du TRalpha dans une lignée cellulaire rapportrice

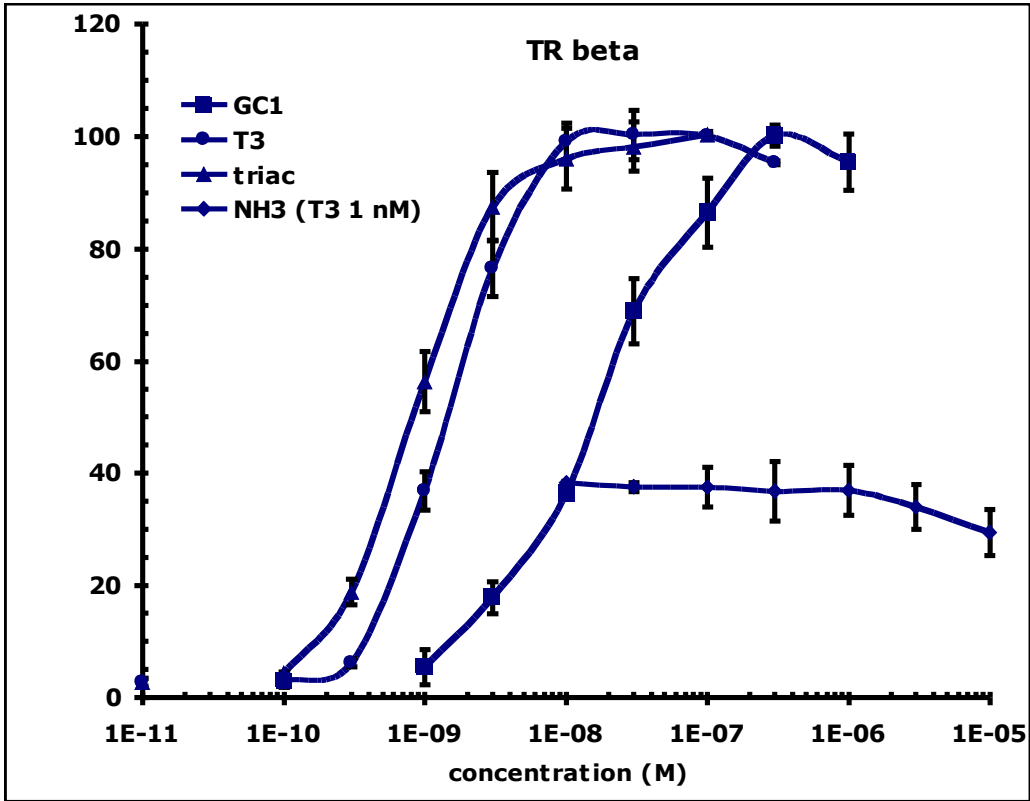


Figure 14 Transactivation du TRbêta dans une lignée cellulaire rapportrice.

BIBLIOGRAPHIE

- Cooper, D.S., 2005. Antithyroid drugs. *The New England journal of medicine* 352, 905-917.
- Banker, D. E., J. Bigler, et al. (1991). "The thyroid hormone receptor gene (c-erbA alpha) is expressed in advance of thyroid gland maturation during the early embryonic development of *Xenopus laevis*." *Mol Cell Biol* 11(10): 5079-89.
- Eliceri and Brown, 1994 B.P. Eliceri and D.D. Brown, Quantitation of endogenous thyroid hormone receptors α and β during embryogenesis and metamorphosis in *Xenopus laevis*, *J. Biol. Chem.* 269 (1994), pp. 24459–24465.
- Fini, J.B., Le Mevel, S., Turque, N., Palmier, K., Zalko, D., Cravedi, J.P., Demeneix, B.A., 2007. An in vivo multiwell-based fluorescent screen for monitoring vertebrate thyroid hormone disruption. *Environmental science & technology* 41, 5908-5914.
- Furlow, J.D., Brown, D.D., 1999. In vitro and in vivo analysis of the regulation of a transcription factor gene by thyroid hormone during *Xenopus laevis* metamorphosis. *Molecular endocrinology* (Baltimore, Md 13, 2076-2089.
- Havis, E., L. M. Sachs, et al. (2003). "Metamorphic T3-response genes have specific co-regulator requirements." *EMBO Rep* 4(9): 883-8.
- Jagnytsch, O., Opitz, R., Lutz, I., Kloas, W., 2006. Effects of tetrabromobisphenol A on larval development and thyroid hormone-regulated biomarkers of the amphibian *Xenopus laevis*. *Environmental research* 101, 340-348.
- Kitamura, S., N. Jinno, et al. "Thyroid hormonal activity of the flame retardants tetrabromobisphenol A and tetrachlorobisphenol A." *Biochem Biophys Res Commun* 293(1): 554-9.
- Kitamura, S., T. Suzuki, et al. "Comparative study of the endocrine-disrupting activity of bisphenol A and 19 related compounds." *Toxicol Sci* 84(2): 249-59.
- Kitamura, S., T. Kato, et al. "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* 76(14): 1589-601.
- Kloas, W., 2002. Amphibians as a model for the study of endocrine disruptors. *International review of cytology* 216, 1-57.
- Morvan Dubois, G., Sebillot, A., Kuiper, G.G., Verhoelst, C.H., Darras, V.M., Visser, T.J., Demeneix, B.A., 2006. Deiodinase activity is present in *Xenopus laevis* during early embryogenesis. *Endocrinology* 147, 4941-4949.
- Nieuwkoop, P. D., Faber, J. (1994). *Normal Table of Xenopus laevis*. New York, Garland Publishing.
- Schriks, M., E. Zvinavashe, et al. "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* 65(10): 1904-8.
- Shi, Y. B. (2000). "Morphological changes during anuran metamorphosis. In *Amphibian Metamorphosis*." Wiley-Liss. New-York. 36-49.
- Tindall, A.J., Morris, I.D., Pownall, M.E., Isaacs, H.V., 2007. Expression of enzymes involved in thyroid hormone metabolism during the early development of *Xenopus tropicalis*. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* 99, 151-163.
- Yaoita, Y. and D. D. Brown (1990). "A correlation of thyroid hormone receptor gene expression with amphibian metamorphosis." *Genes Dev* 4(11): 1917-24.

- Yaoita, Y., Y. B. Shi, et al. (1990) "Xenopus laevis alpha and beta thyroid hormone receptors." Proc Natl Acad Sci U S A 87(18): 7090-4.
- Turque, N., Palmier, K., Le Mevel, S., Alliot, C., Demeneix, B.A., 2005. A rapid, physiologic protocol for testing transcriptional effects of thyroid-disrupting agents in premetamorphic Xenopus tadpoles. Environmental health perspectives 113, 1588-1593.
- Wolff, J., 1998. Perchlorate and the thyroid gland. Pharmacological reviews 50, 89-105.

**DEVELOPPEMENT D'UN TEST PHYSIOLOGIQUE
RAPIDE *IN VIVO* POUR MESURER LES EFFETS DE
PERTURBATIONS THYROÏDIENNES**

**PROGRAMME NATIONAL DE RECHERCHE PERTURBATEURS
ENDOCRINIENS (PNRPE)**

**Dr Barbara Demeneix et UMR 7221 / USM 501
Dr Patrick Balaguer et INSERM U896**

Note importante

*Cette partie peut être rendue sous forme non modifiable (fichier pdf de préférence).
Son format est laissé à la libre appréciation de ses rédacteurs.*

ANNEXE : TEXTES DES PUBLICATIONS

Cette partie peut être rendue sous forme non modifiable (fichier pdf de préférence).

Son format est laissé à la libre appréciation de ses rédacteurs.

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES PARUES

Fini, J.B., Le Mevel, S., Turque, N., Palmier, K., Zalko, D., Cravedi, J.P., Demeneix, B.A., 2007. An *in vivo* multiwell-based fluorescent screen for monitoring vertebrate thyroid hormone disruption. Environmental science & technology 41, 5908-5914.

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES A PARAITRE

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES PREVUES

ANNEXE : PARTIE CONFIDENTIELLE

N/A