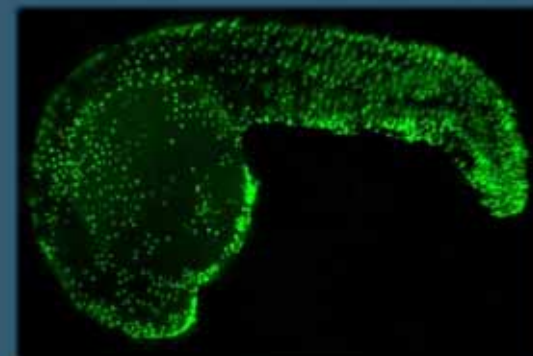
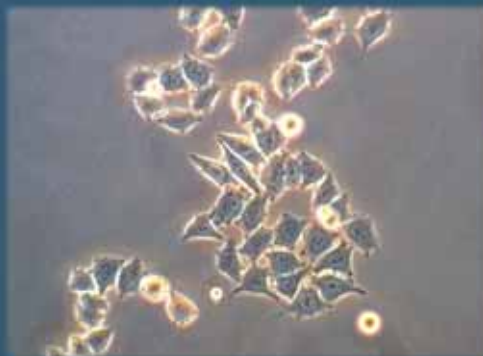
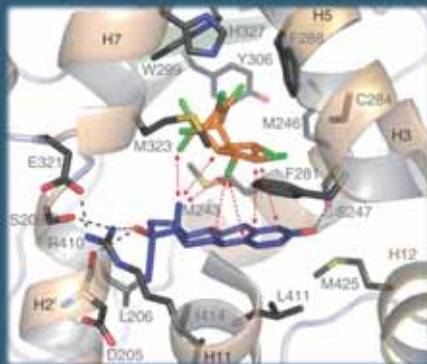


Tests mécanistiques pour la caractérisation des perturbateurs endocriniens (PE)

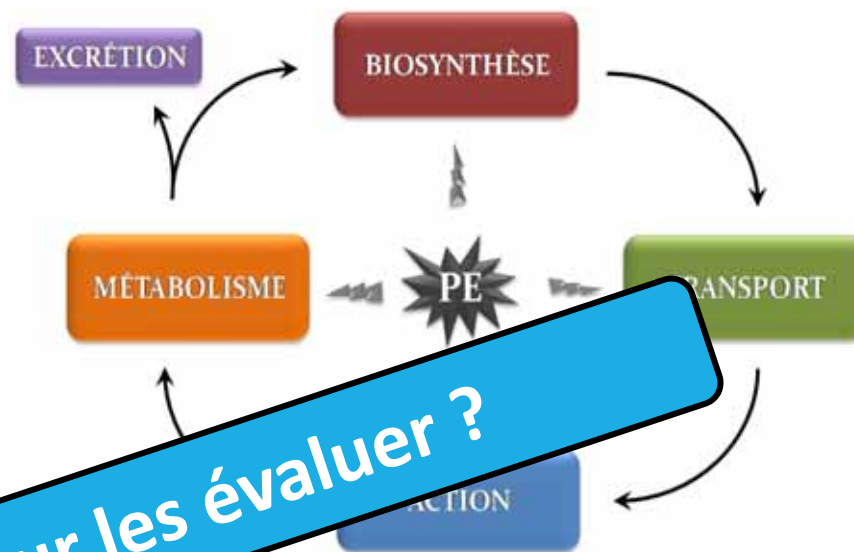


Nicolas Creusot & Patrick Balaguer



**LA PROBLÉMATIQUE
DES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS :
QUELLES SOLUTIONS ?**





Diversité classes chimiques et origines

Multiples modes d'action



Homme
Reproduction
(Colborn et al. 1993)



Oiseaux
Comportement
(McArthur et al. 1983)



Alligator
Développement
(Guillette et al. 1994)



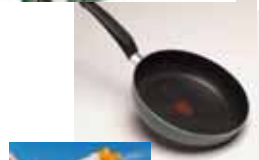
Gastéropodes
Imposex
(Matthiessen et Gibbs, 1998)



Poissons
Intersex
(Jobling et al. 2002)
Extinction
(Kidd et al. 2007)

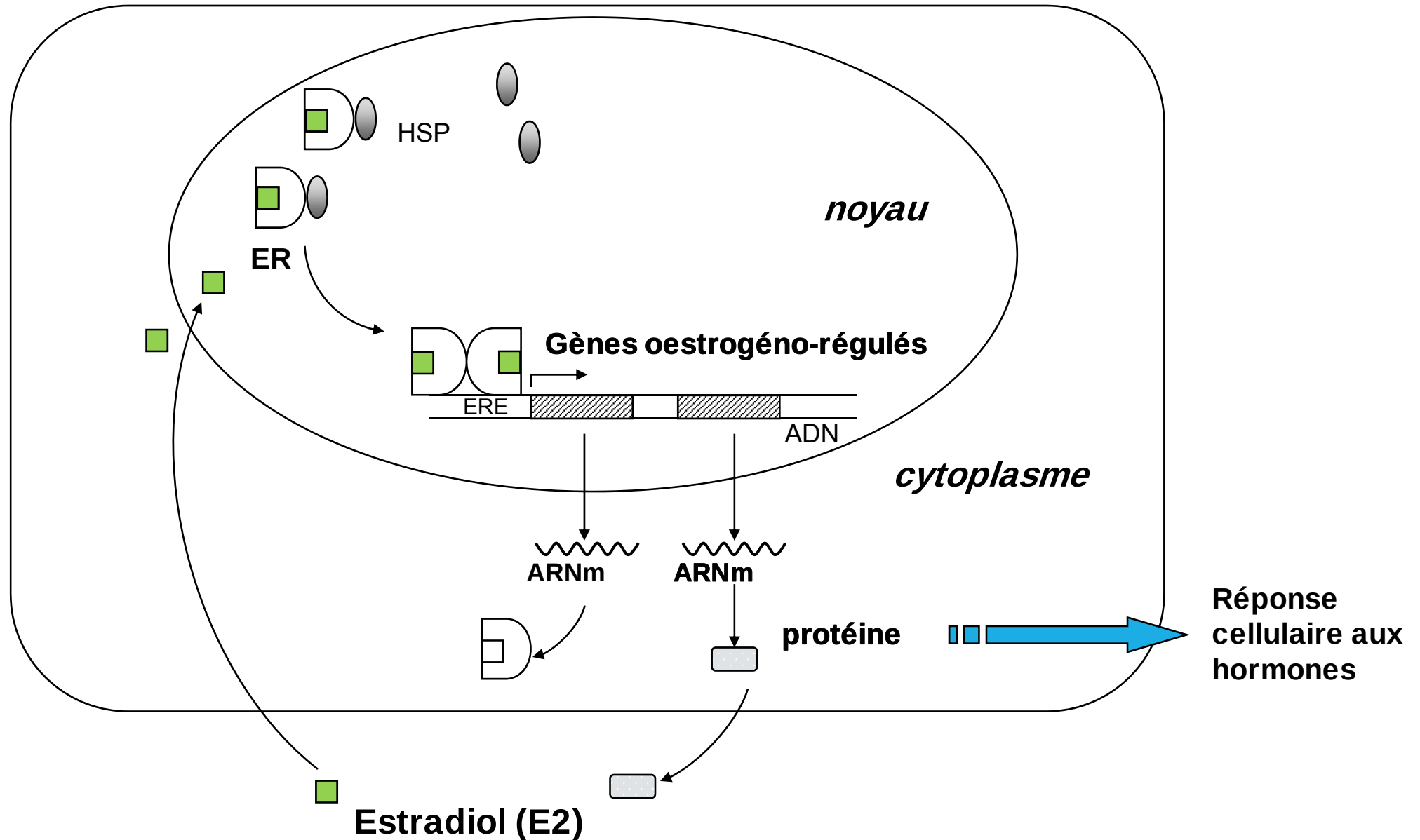
Effets individuels et/ou populationnels ...

Exemples de perturbateurs endocriniens et leurs récepteurs cibles

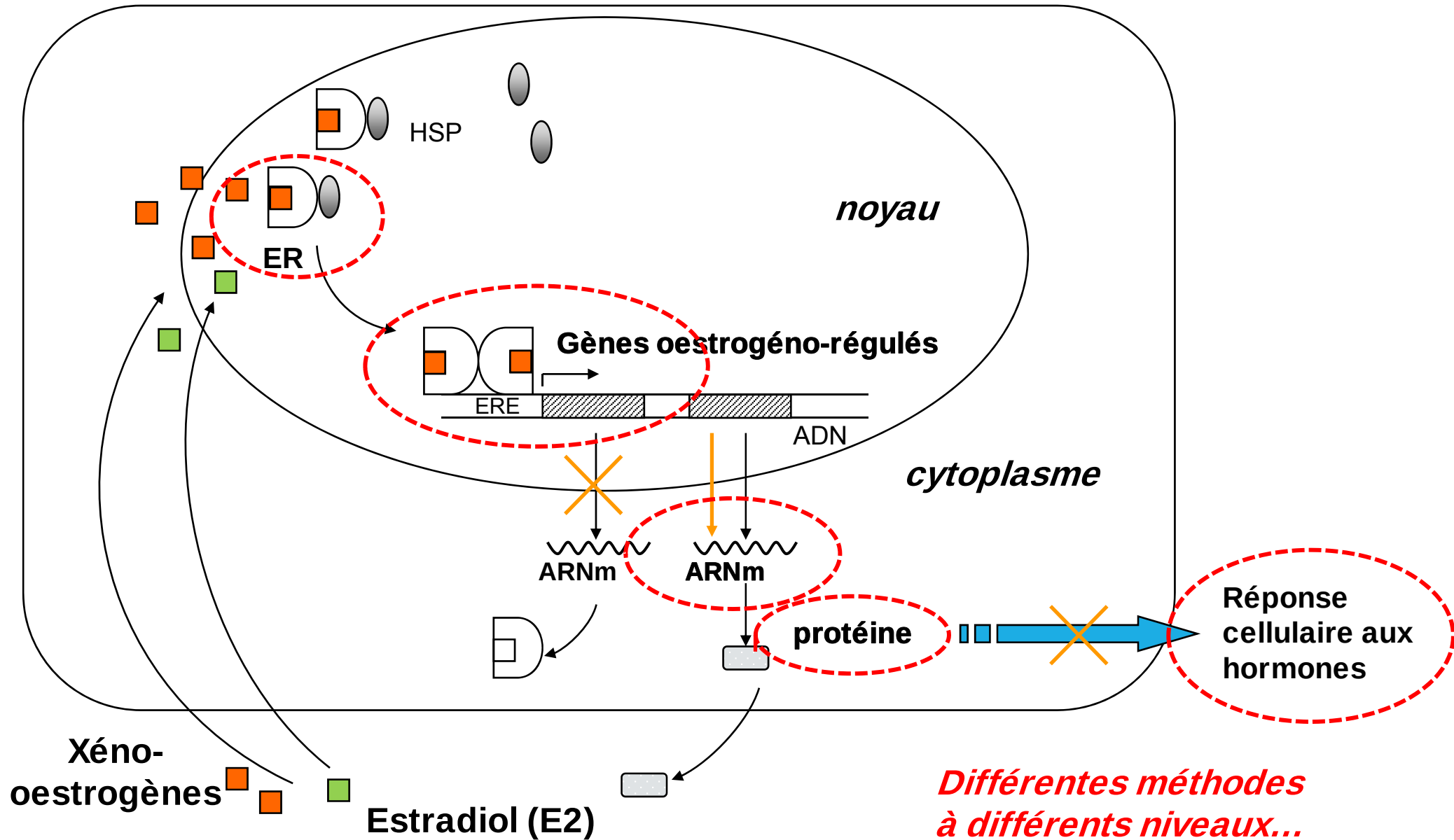
	Composés modèles	Caractéristiques	Récepteurs
	Bisphénols <i>A (BPA), B, C, E, F,</i>	- BPA: produit chimique très produit - Plastifiant - Adipogénèse	ERs, ERR AR, PXR
	Alkylphenols <i>4-tert-octylphenol, 4n-nonylphenol</i>	- Détergents - Très présent dans les matières en suspension, sédiments	ERs, ERR γ AR, PXR
	Phthalates <i>MEHP, DHEP, BBP, DBP</i>	- Plastifiant - Adipogénèse, obésité, résistance à l'insuline	ERs, PPARs AR, PXR
	Chlordecone <i>(Kepone)</i>	- Pesticide interdit mais persistant - Associé au cancer de la prostate	ER α ER β
	BPA halogénés <i>TetraBromo/Chloro-BPA (TBBPA, TCBPA)</i>	- Retardateur de flamme - TBBPA: 120 000 tonnes/an - Obésogène suspecté	PPAR γ
	Composés perfluorés <i>(PFCs; PFOA et PFOS)</i>	- Fabrication de fluoropolymères (poêle, vêtement anti-humidité, ...) - Augmenterait les taux de cholestérol	PPARs, ERs AR
	Benzophénones <i>1, 2, BP3, THB</i>	- Filtres UV	ERs AR
	Organoétains <i>TriButylTin (TBT), TriPropylTin (TPT)...</i>	- Biocides - Imposéx, obésogènes suspectés - Induction d'adipogénèse	PPARs RXRs
	Hydrocarbures aromatiques <i>(HAP)</i>	- Composés organiques volatiles - Accumulation dans le sédiments	AhR

Mode d'action - Interaction avec les récepteurs nucléaires (e.g. ER)

Interaction avec les récepteurs nucléaires (e.g. ER)



Interaction avec les récepteurs nucléaires (e.g. ER)



➤ Méthodes *in silico* ou cristallographiques

- ✓ Quantitative Structure Activity Relationship (QSAR)
- ✓ Modélisation de la liaison du ligand au récepteur
- ✓ Cristallisation du complexe ligand-récepteur

➤ Méthodes *in vitro* biochimiques

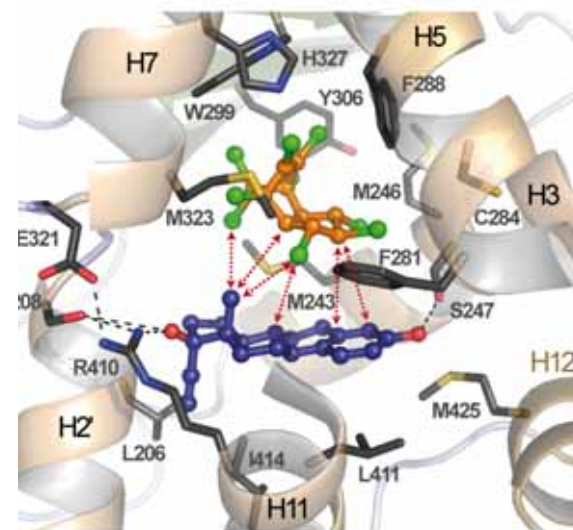
- ✓ Liaison à une protéine de transport, à une enzyme, à un récepteur
- ✓ Liaison d'un co-activateur ou un co-répresseur à un récepteur

➤ Méthodes *in vitro* cellulaires

- ✓ Expression de gènes naturels (protéines, enzymes, réponse cellulaire)
- ✓ Expression de gènes rapporteurs (β -galactosidase, luciférase)

➤ Méthodes *in vivo* (souris, poisson-zèbre, xénope)

- ✓ Expression de gènes naturels ou rapporteurs
- ✓ Réponses individuelles (e.g. OCDE)

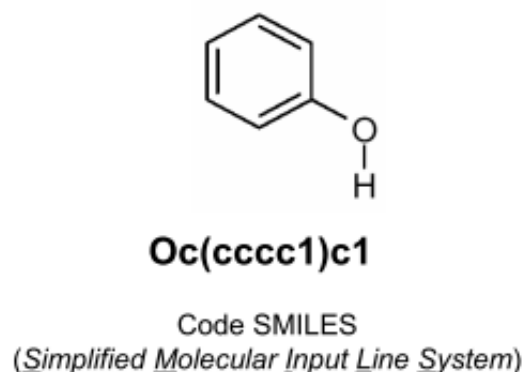


Méthodes *in silico* ou cristallographiques

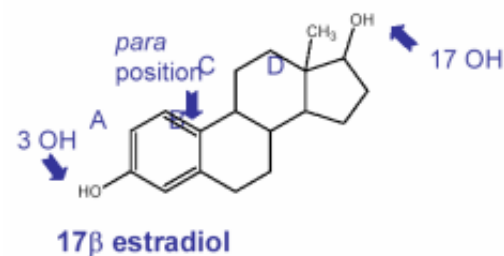
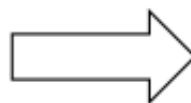
in silico – QSAR (Quantitative Structure Activity Relationship)

➤ Basé sur la corrélation entre la structure chimique d'une molécule et son effet biologique

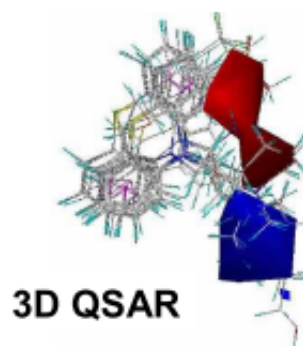
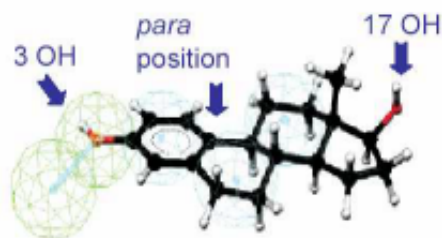
Les fragments phénols sont susceptibles de se lier aux récepteurs des oestrogènes (ER)



Recherche du fragment phénol dans la structure

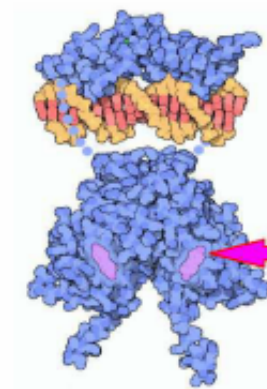


Alerte 2D



3D QSAR

Propriétés quantiques
de la molécule



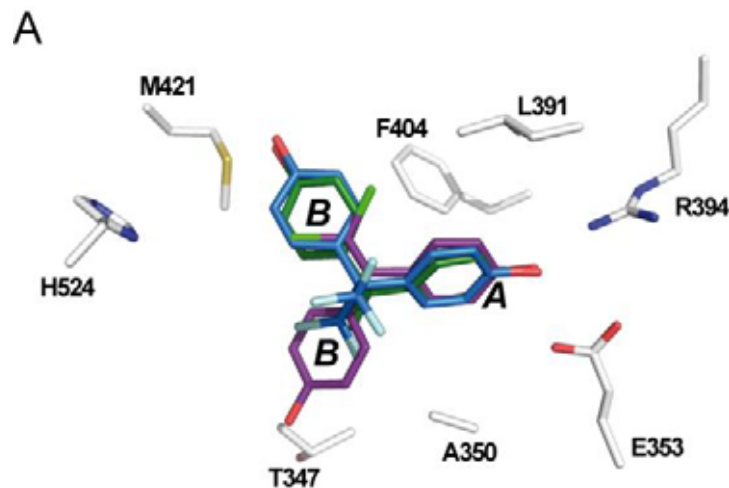
Site de fixation sur
le récepteur des
oestrogènes (ER)

in silico – modélisation de l'interaction ligand-récepteur

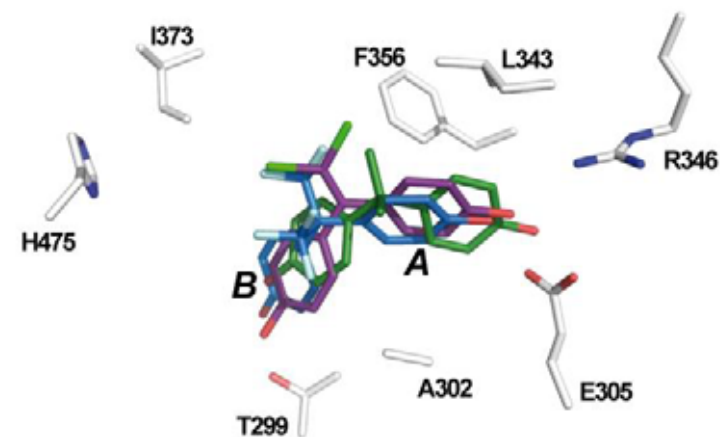
➤ Basées sur une structure cristalline

Modélisation des bisphénols A, AF et C avec ER α , ER β , AR et ERR γ

ER α

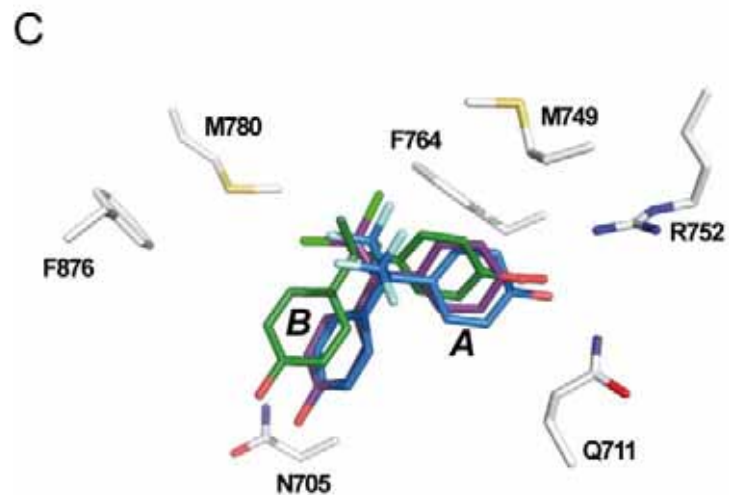


B

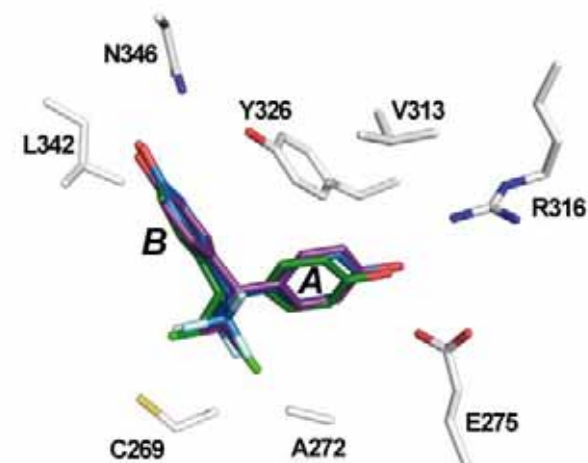


ER β

AR



D

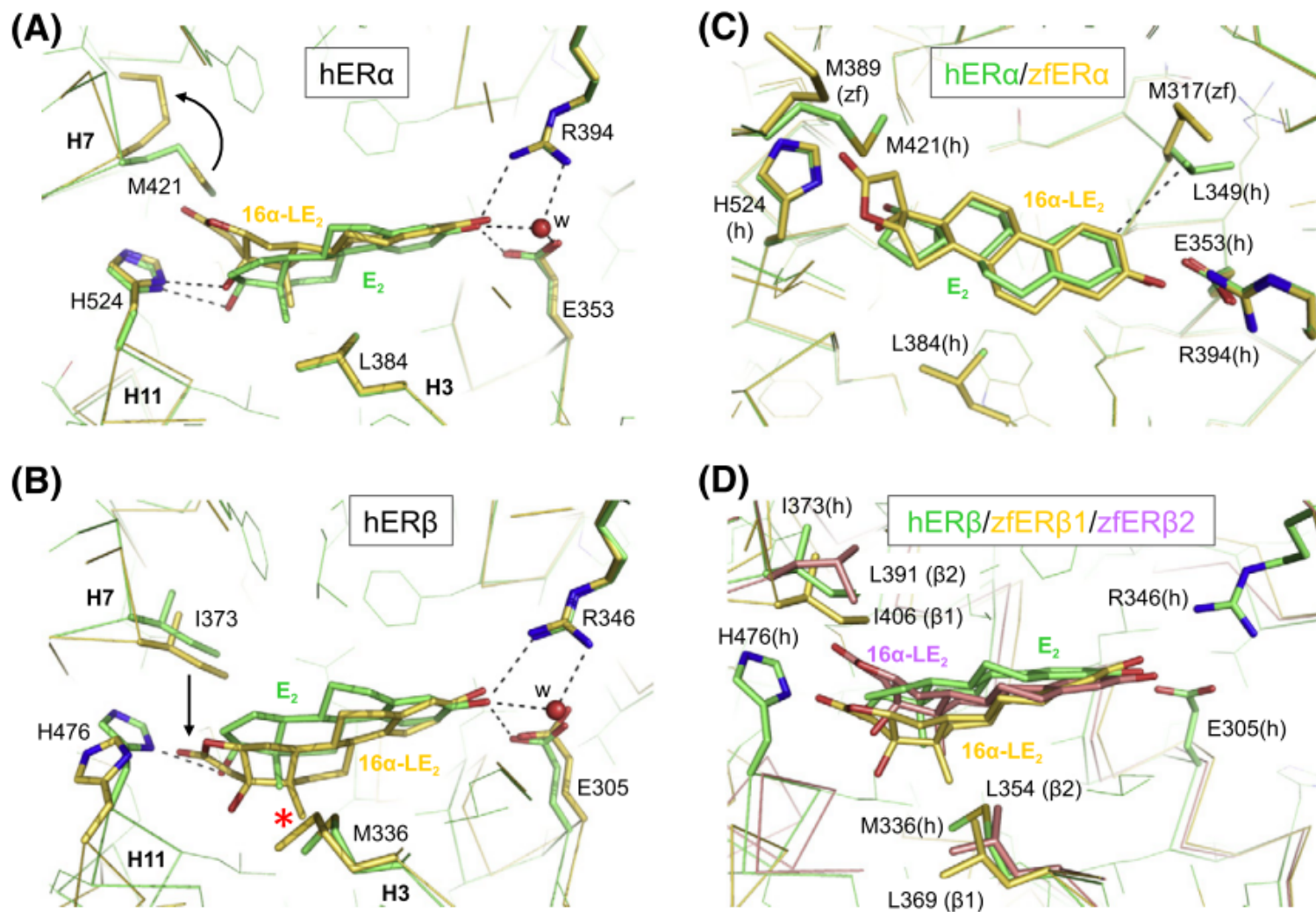


ERR γ

✓ Mode de liaison différent entre les récepteurs

➤ Basées sur une structure cristalline

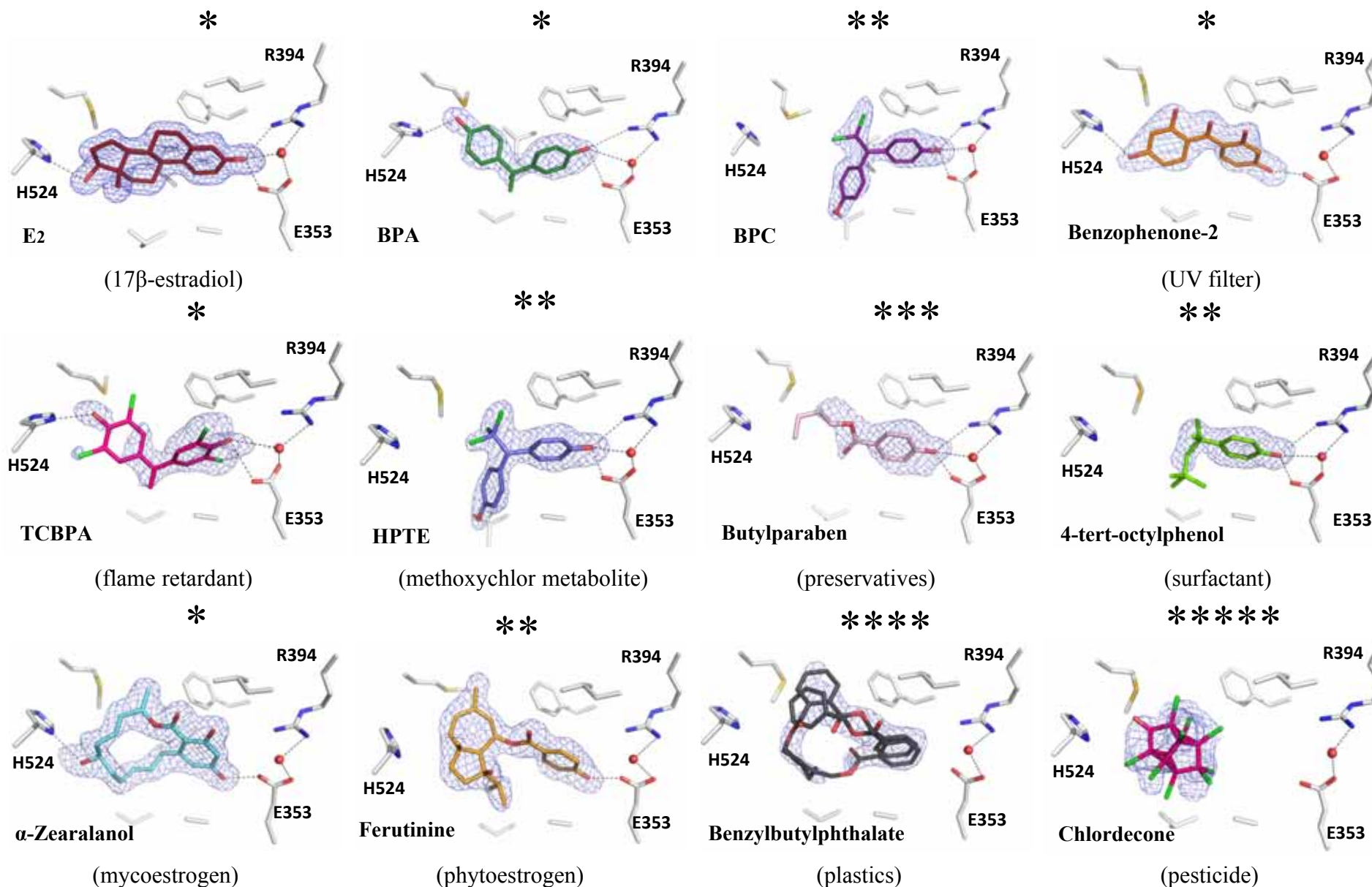
Interaction avec les récepteurs des œstrogènes (homme vs poisson zèbre)



✓ Mode de liaison différent entre les espèces

Cristallisation du complexe ligand-récepteur

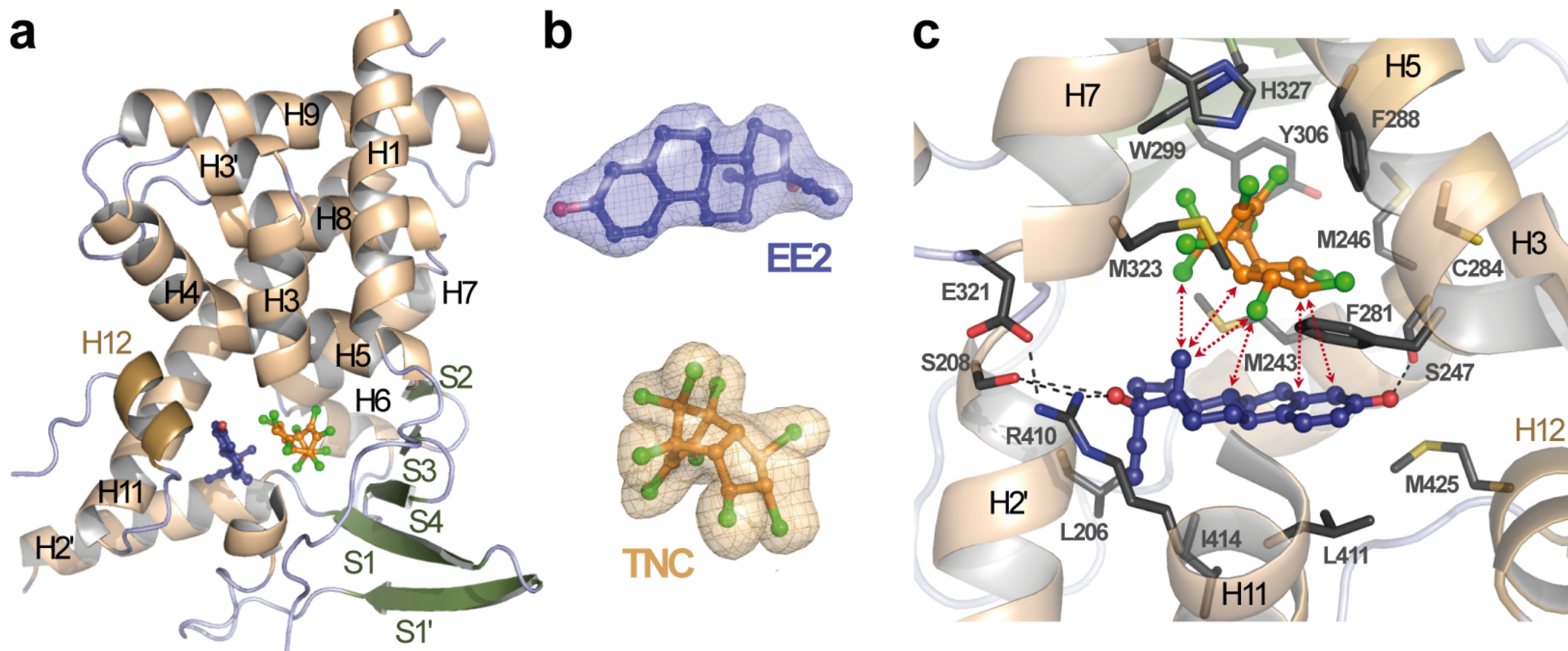
➤ Modes de liaison de PE avec le hERα



✓ *Au moins 5 modes de liaison pour le récepteur hERα*

Cristallisation du complexe ligand-récepteur

➤ *Liaison de plusieurs ligands en même temps - PXR*



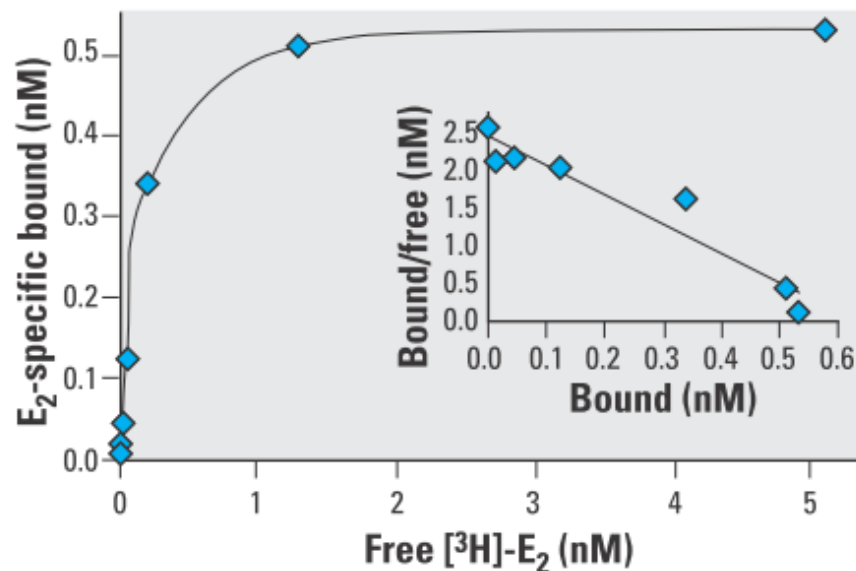
✓ *Ligand « supra-moléculaire »*

Méthodes *in vitro* biochimiques

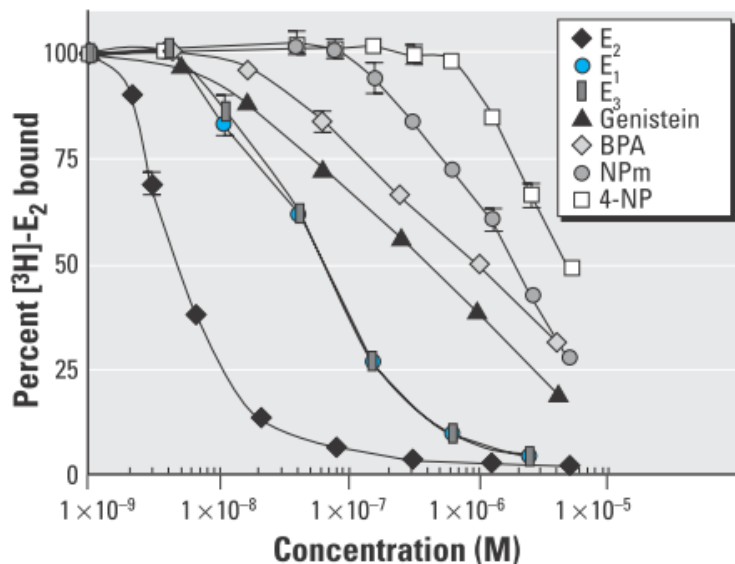
Liaison ligand-récepteur – « binding »

Liaison de ligands radioactifs au récepteur

➤ Ex. Récepteur des oestrogènes



K_d - constante de
Dissociation (affinité)
= force de le liaison



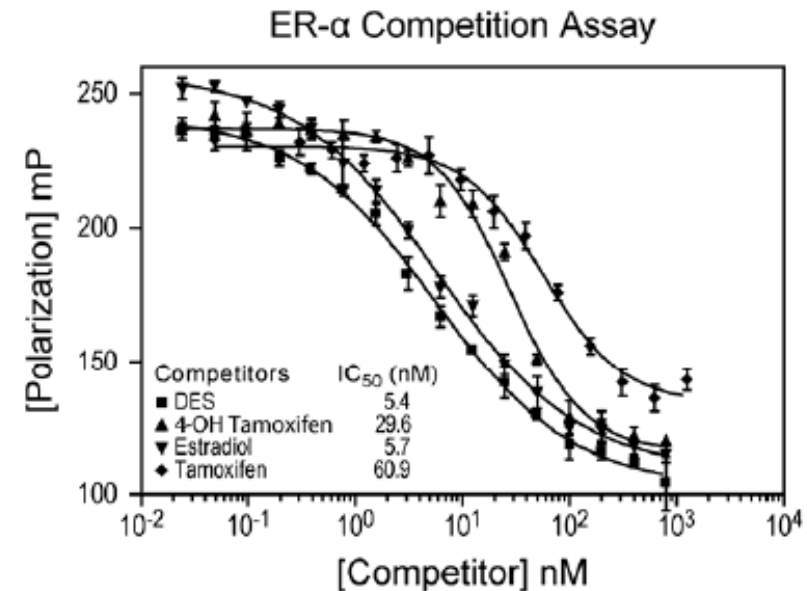
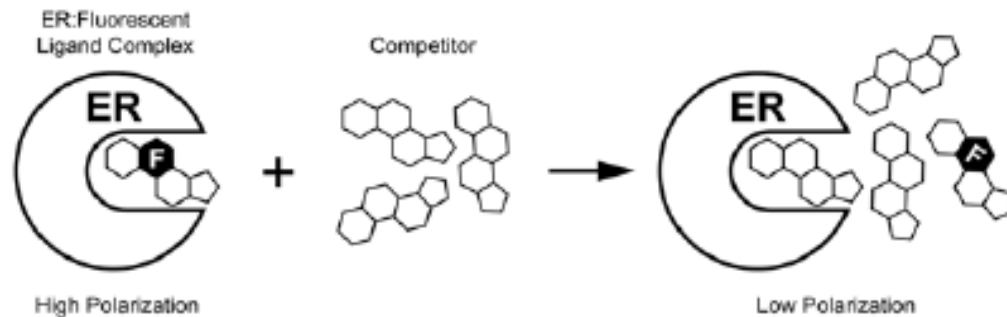
Compound	IC ₅₀ ± SE	RBA
E ₂	5.90 nM ± 1.19	100
E ₃	62.7 nM ± 10.9	9.41
E ₁	65.3 nM ± 10.9	9.04
Genistein	381 nM ± 130	1.55
BPA	889 nM ± 127	0.66
NPm	1.86 μM ± 0.11	0.32
4-NP	5.60 μM ± 1.12	0.11

RBA, relative binding affinity

Liaison de ligands fluorescents au récepteur (Kits Invitrogen®)

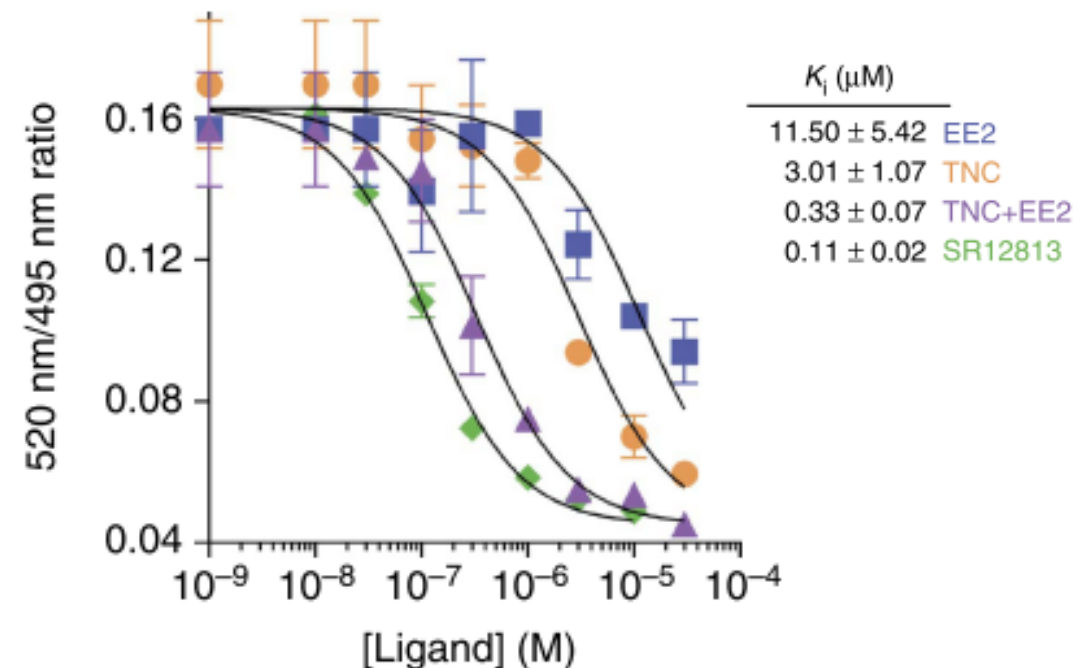
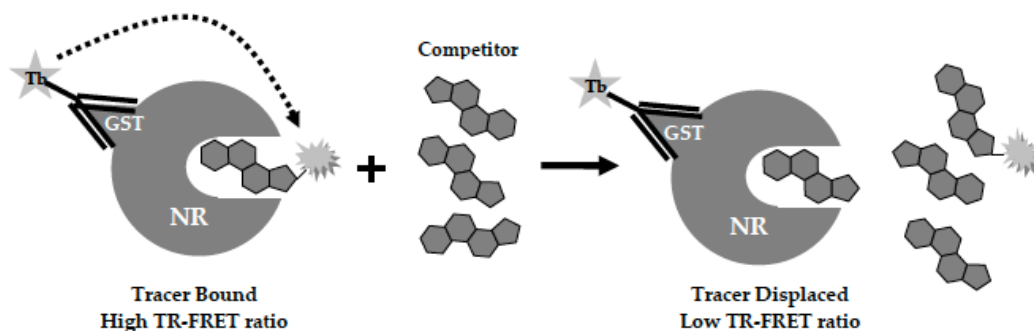
➤ Polarisation de fluorescence (anisotropie)

- Polarscreen (ER α , AR, GR, PR, PPAR γ)



➤ Transfert d'énergie en fluorescence

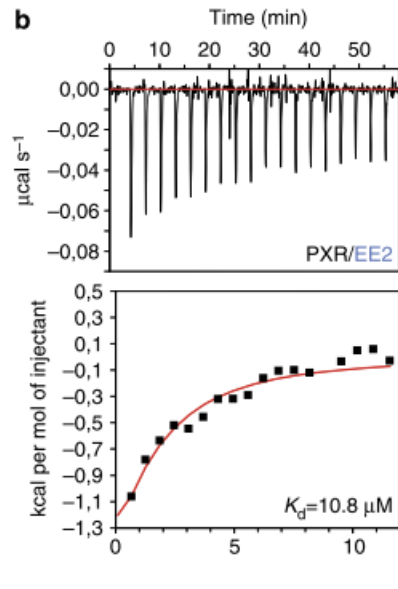
- Lantascreeen (PXR)



Mesure de la liaison par calorimétrie isothermale (ITC)

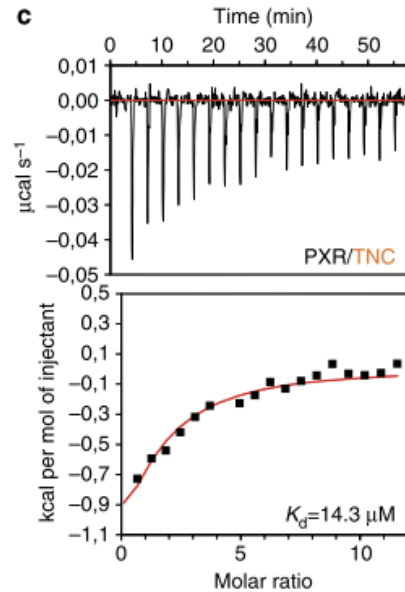
➤ Etude de la liaison de ligands à PXR

EE2



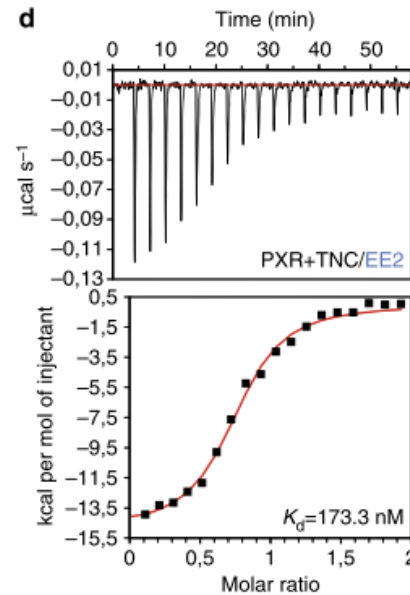
$K_d = 10.8 \mu\text{M}$

TNC



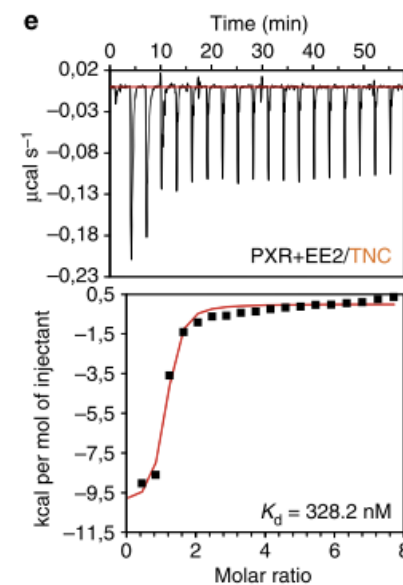
$K_d = 14.3 \mu\text{M}$

EE2 ap TNC



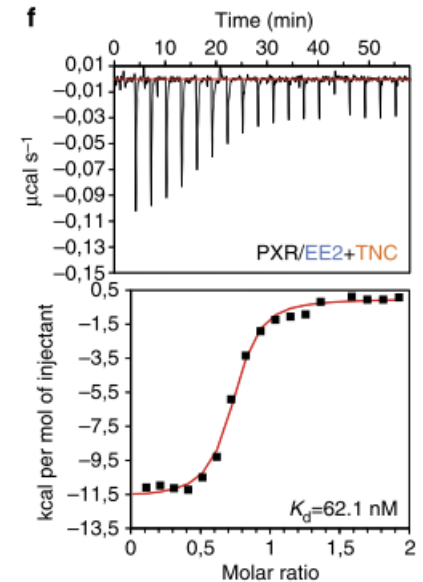
$K_d = 173.3 \text{ nM}$

TNC ap EE2



$K_d = 328.2 \text{ nM}$

TNC + EE2

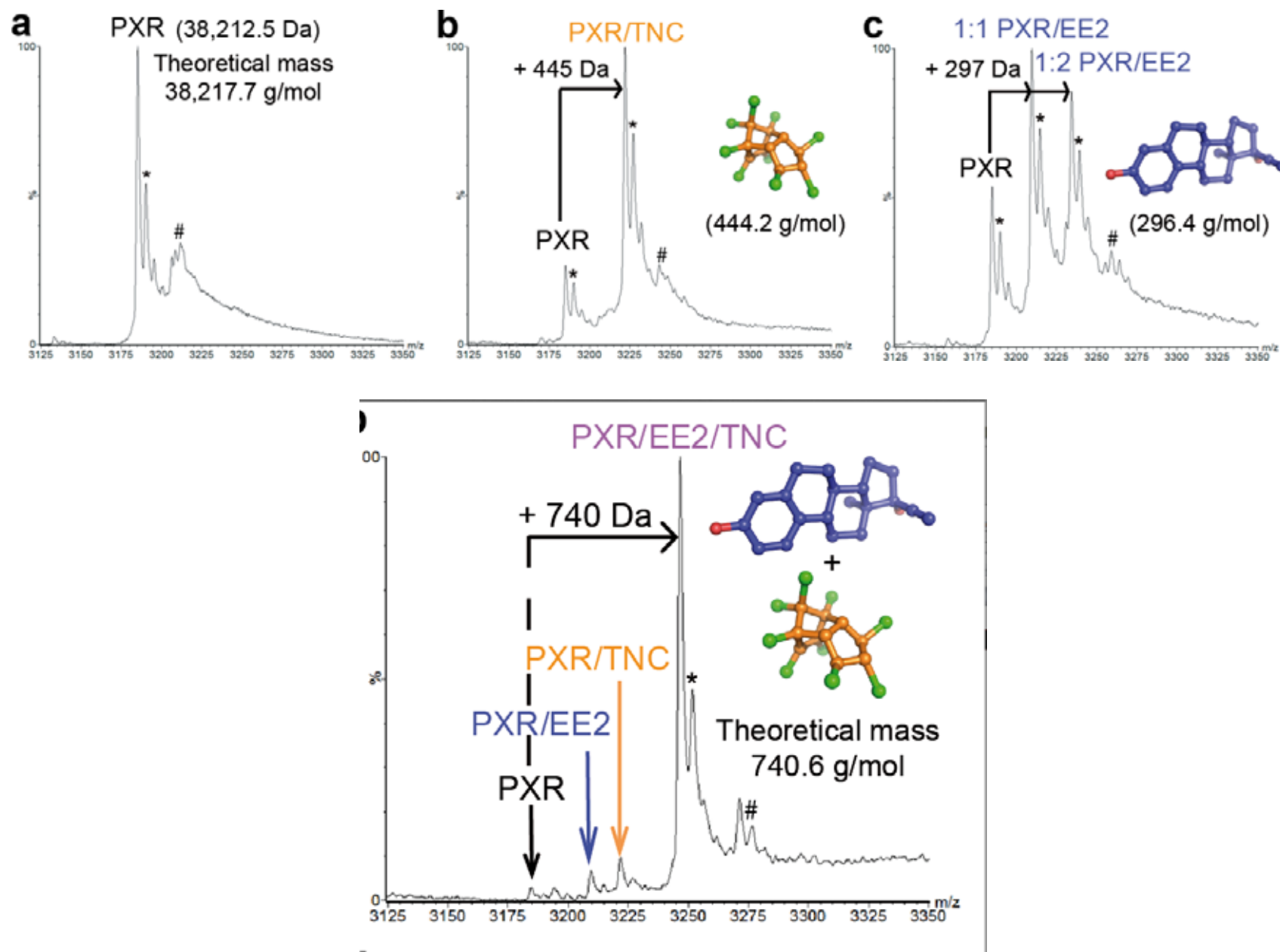


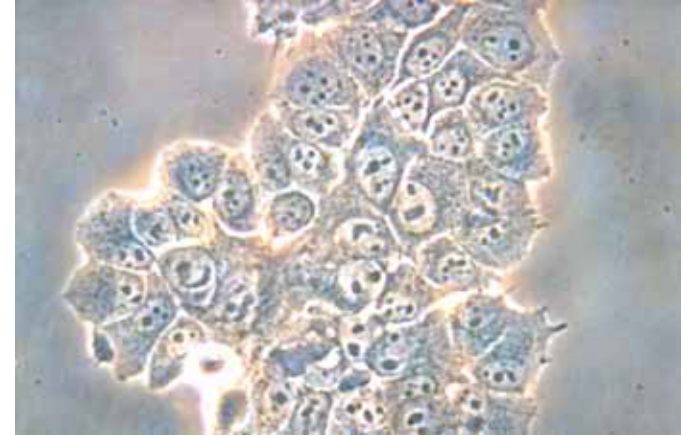
$K_d = 62.1 \text{ nM}$

Augmentation de l'affinité (K_d)

Mesure de la liaison par spectrométrie de masse

➤ Etude de la liaison de ligands à PXR

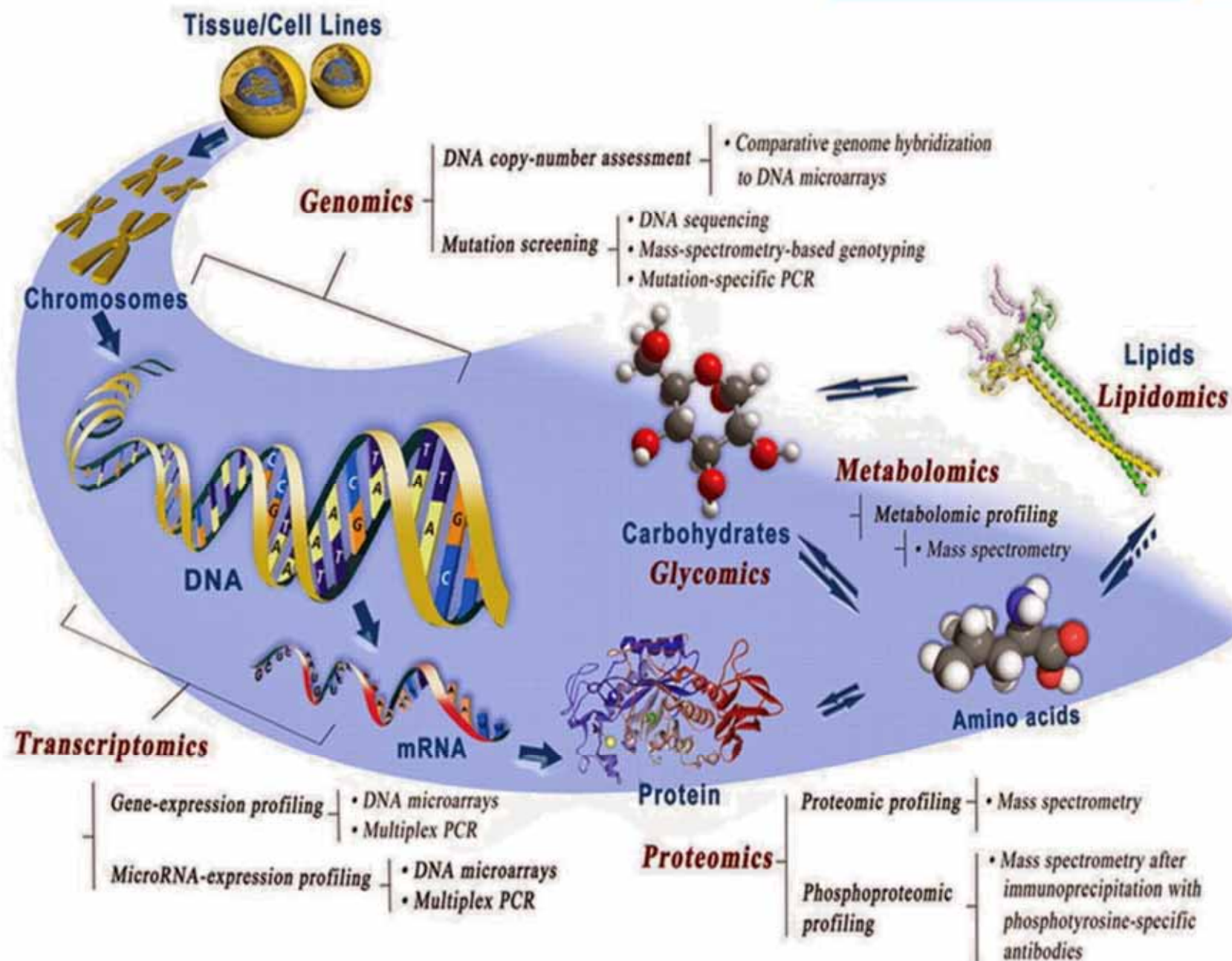




Méthodes *in vitro* cellulaires – *Réponses cellulaires*

Gènes endogènes vs rapporteurs

Mesure d'expression de gènes/protéines naturel(le)s ...

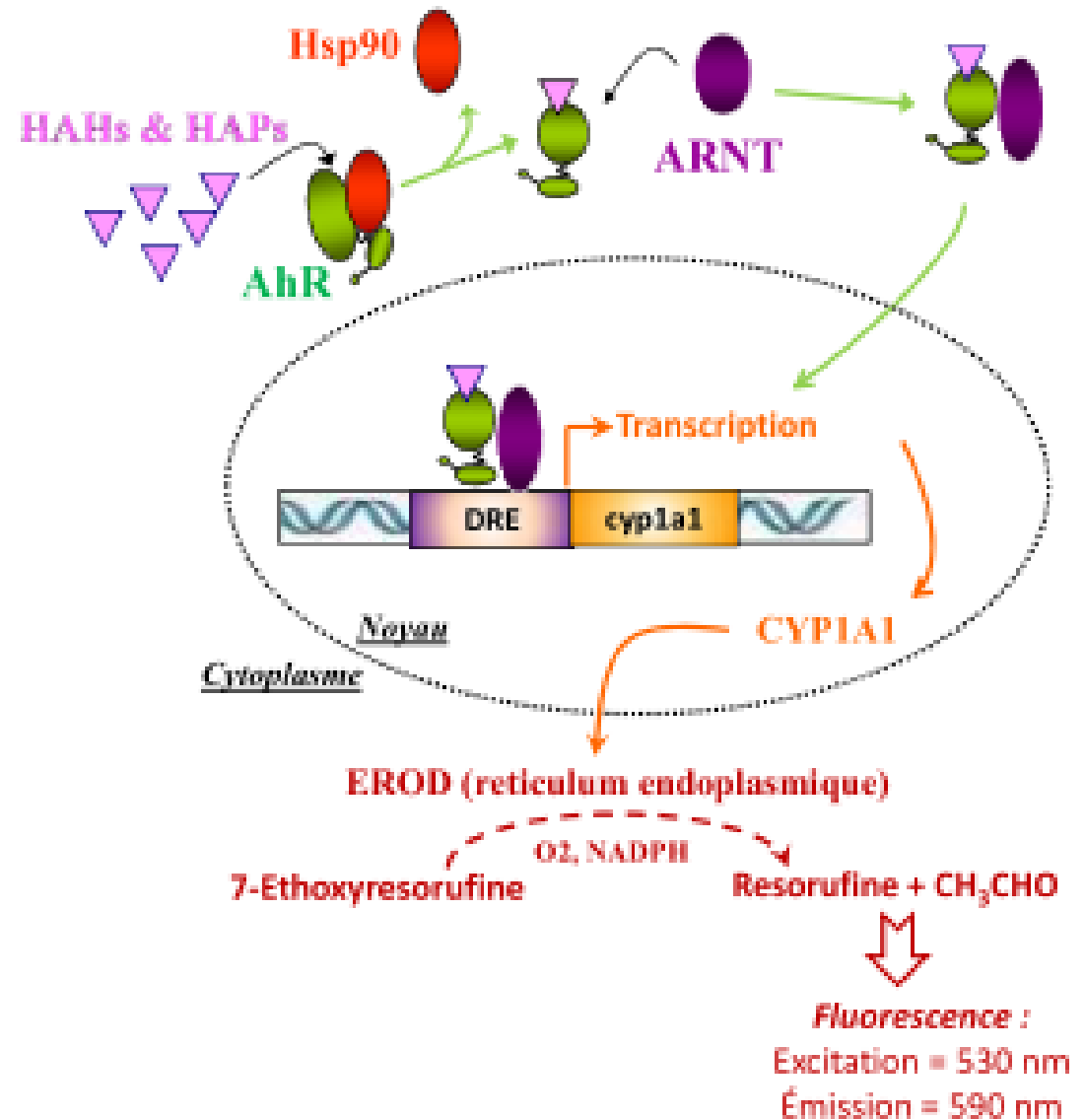


Mesure d'activités enzymatiques

➤ Mesure indirecte de l'activation des RN

Exemples :

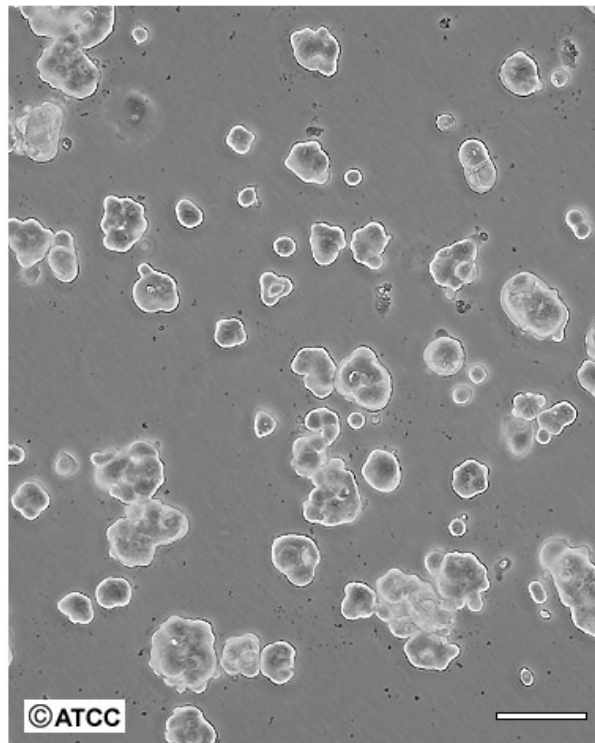
- Tyrosine aminotransférase (TAT) induite par les ligands de **GR**
- **CYP1A1** induite par les ligands de **AhR**
- CYP19 (aromatase) induite par les ligands de **ER**
- CYP3A4 & CYP2B6 induites par des ligands de **PXR**



Mesure de la prolifération cellulaire

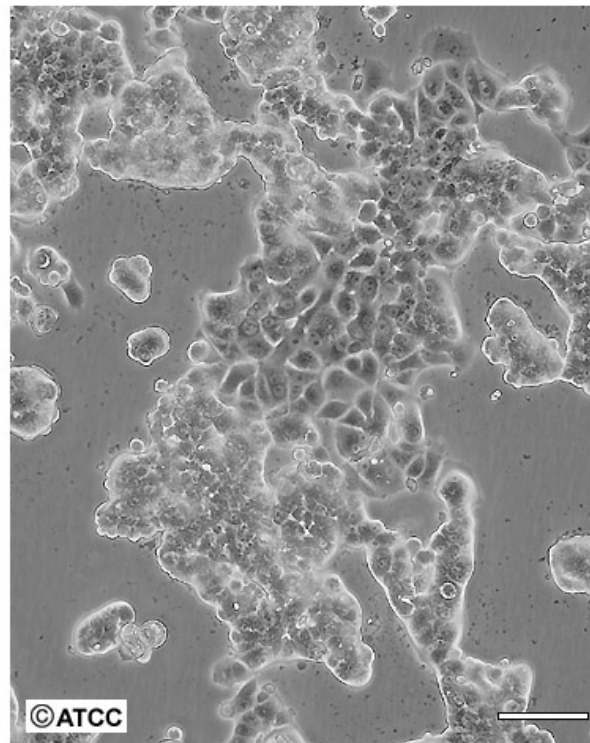
➤ *Ex: E-SCREEN – MCF-7 (cancer du sein)*

ATCC Number: **HTB-22**
Designation: **MCF-7**



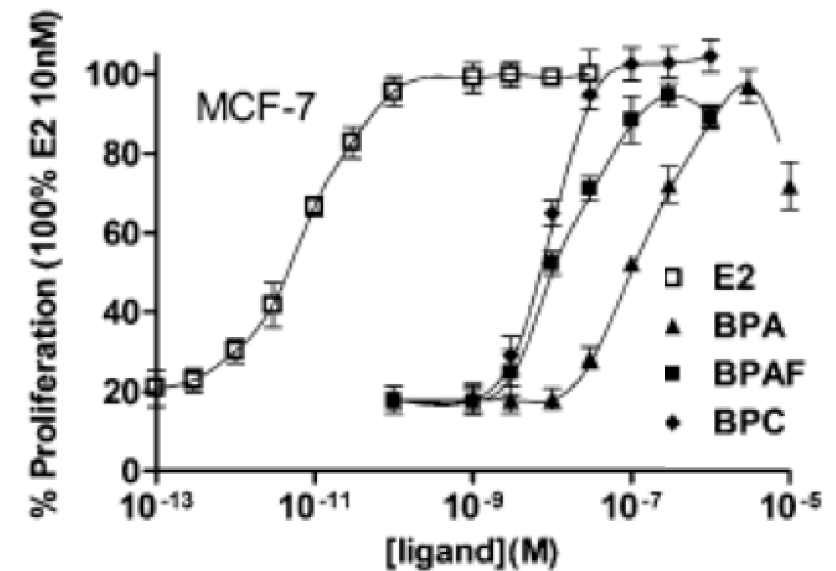
Low Density

Scale Bar = 100μm



High Density

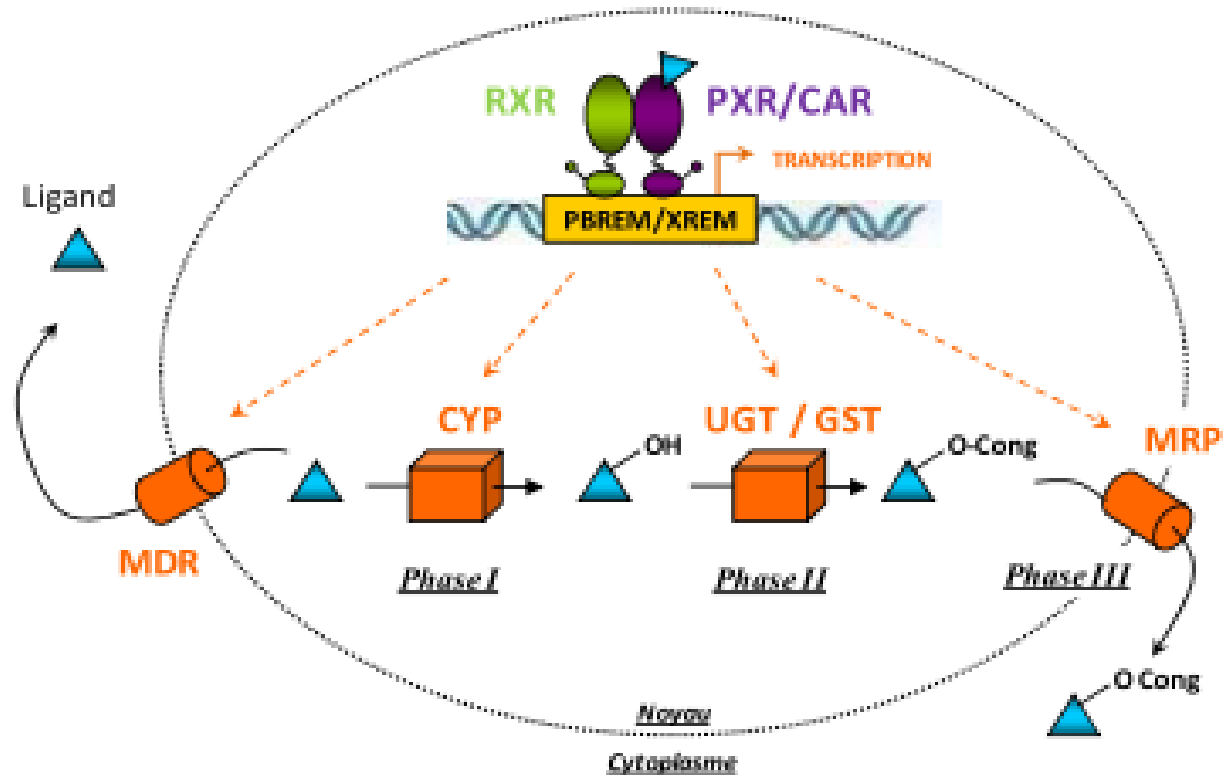
Scale Bar = 100μm



Résistance à la chimiothérapie

➤ Activation de la détoxification

Exposition à un agent **anti-cancéreux** (e.g. SN38) avec et sans pré-traitement à PE

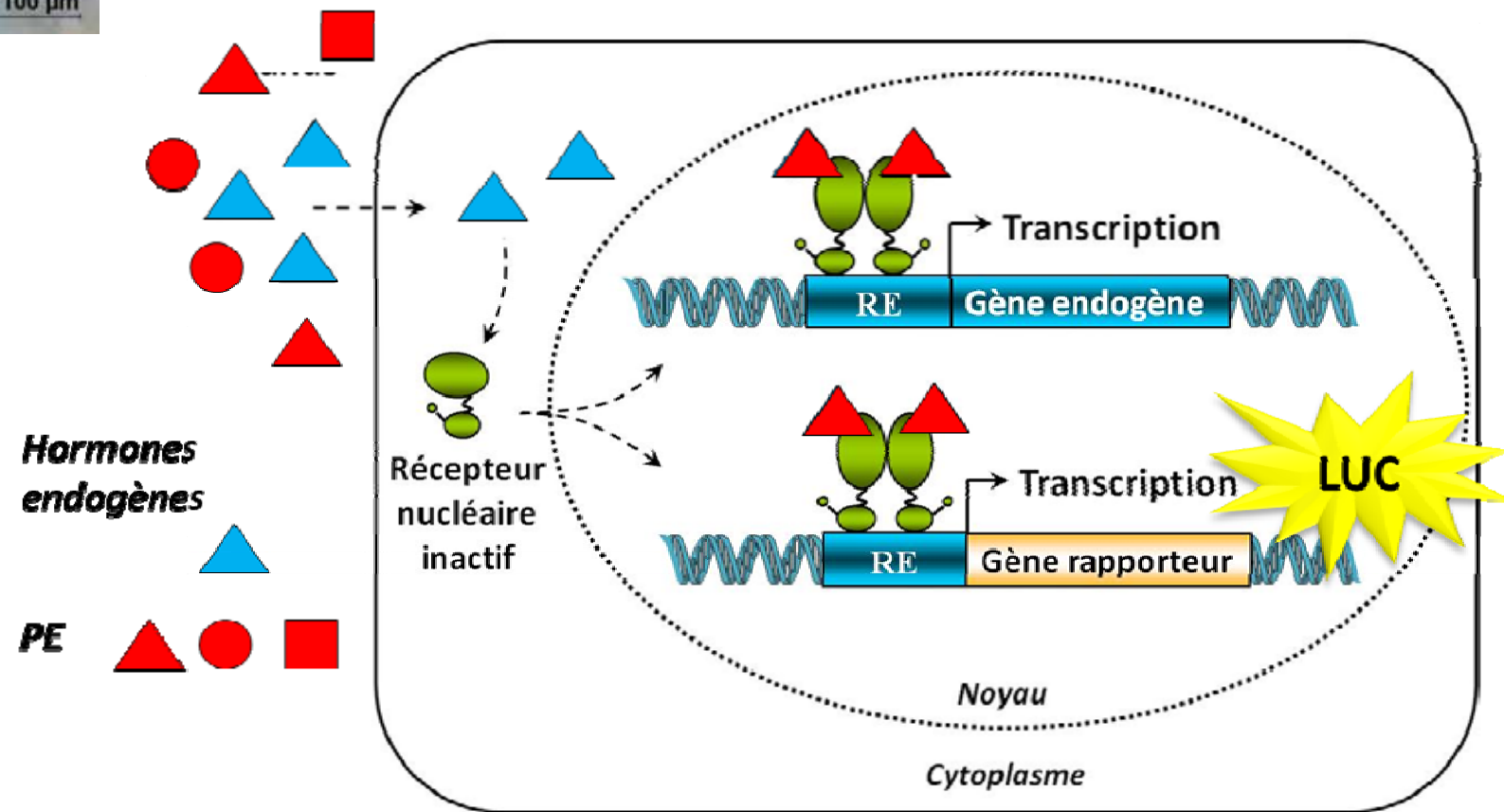
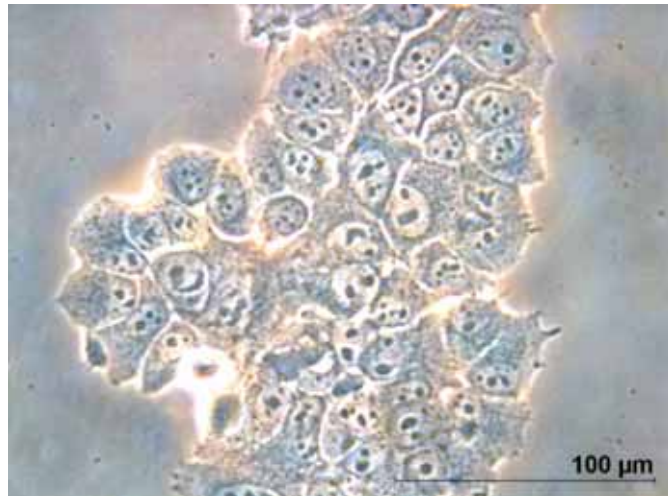


Activation PXR → Augmentation de la détoxification (enzymes + transporteurs)



Augmentation de l'élimination de l'agent chimiothérapeuthique ...

Utilisation de lignées cellulaires à gène rapporteur



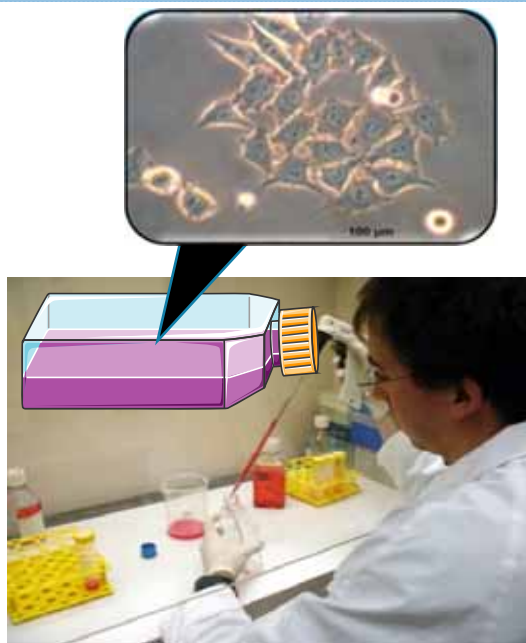
Diversité des modèles cellulaires bioluminescents

Récepteur Nucléaire	Isotype	Espèce	Lignée cellulaire	Type de récepteur
ER	α , β	h, zf	HeLa, MCF-7, BG1, HepG2, LS174T, ZFL	WT, ER α -DBD
AR		h, zf	HeLa, U2OS, LS174T	WT, ER α -DBD
PR		h, zf	HeLa, MCF-7, U2OS	WT, ER α -DBD
GR		h, zf	HeLa, MCF-7, U2OS	WT
MR		h, zf	HeLa, U2OS	GAL4DBD, ER α -DBD
ERR	α , β , γ	h, zf	HeLa	GAL4DBD
PPAR	α , β , γ	h	HeLa	GAL4DBD
RAR	α , β , γ	h	HeLa, MCF-7	WT, ER α -DBD
TR	α , β	r	HeLa	GAL4DBD
VDR		h	HeLa, MCF-7	WT
ROR	α , γ	h	HeLa	GAL4DBD
PXR		h, m	HeLa, HepG2, LS174T	WT, GAL4DBD
CAR		h, m	HeLa	WT, GAL4DBD
AhR		h, zf, r	HeLa, HepG2, LS174T	WT

H, homme; zf, poisson zèbre; r, rat; m, souris

Grimaldi et al, Front Endocrinol 2015

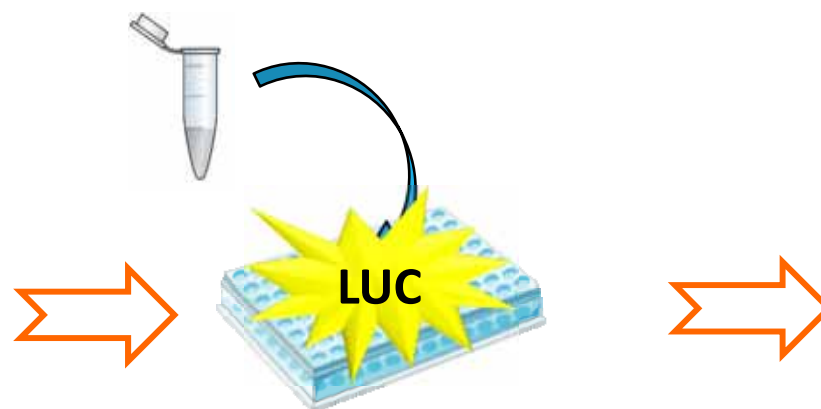
Utilisation de lignées cellulaires pour analyser les PE



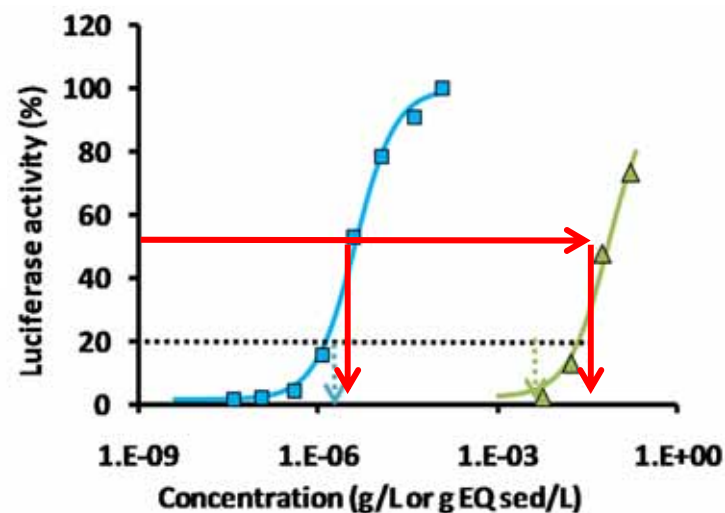
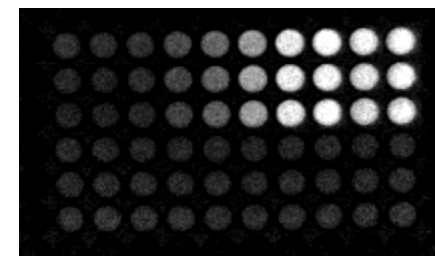
Culture continue en routine

+

ensemencement de plaques 96 puits
(conditions stériles)

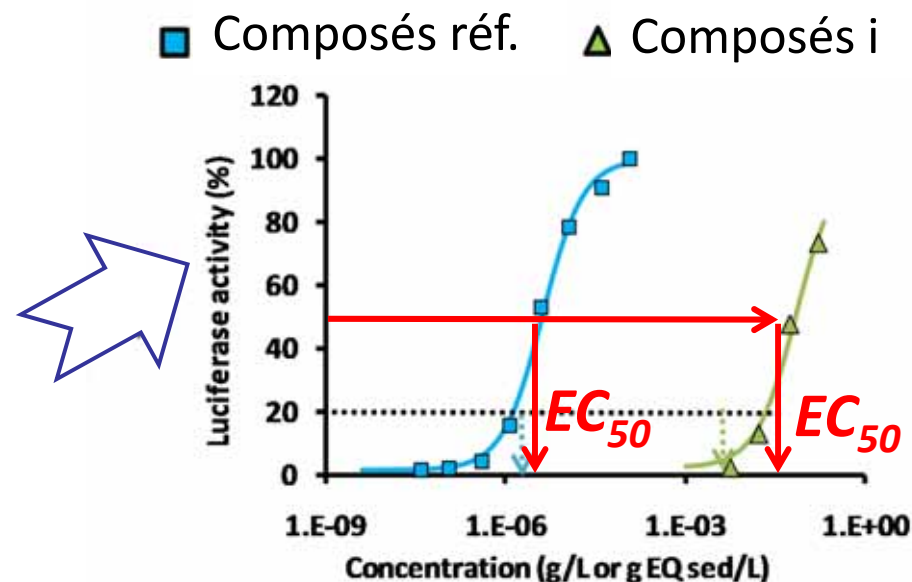
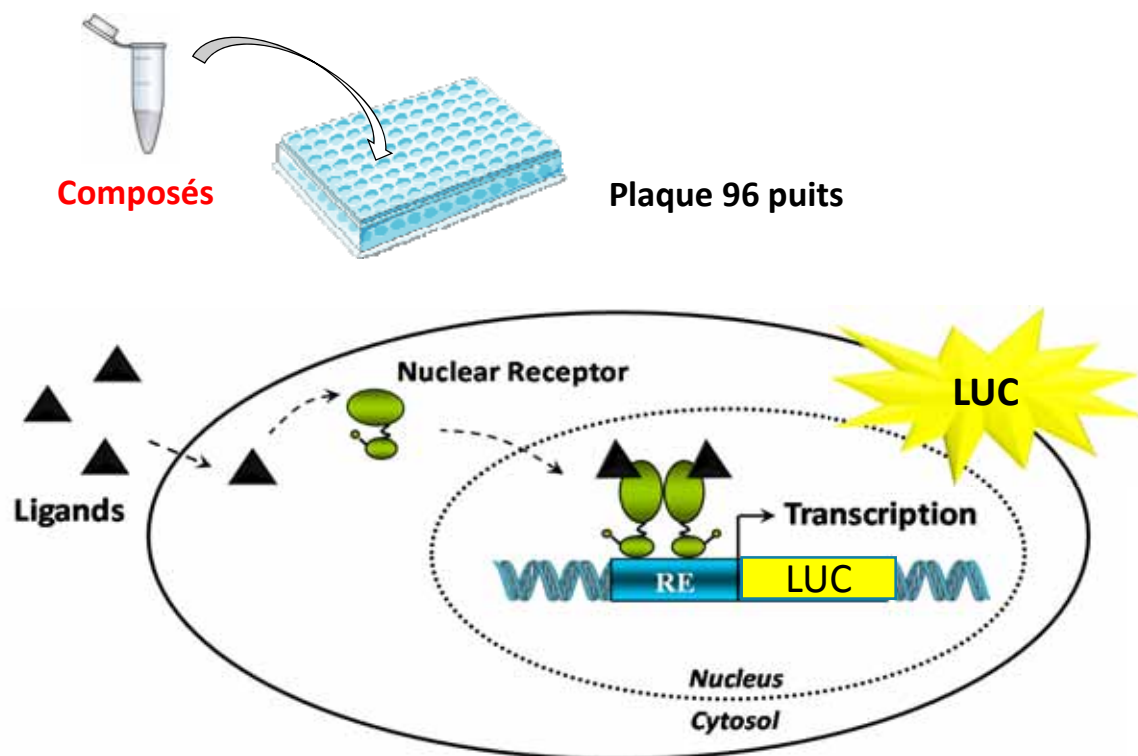


Exposition à des dilutions en
séries des échantillons (16-24h)



Lecture de luminescence
ou fluorescence

Évaluation du potentiel PE de composés individuels



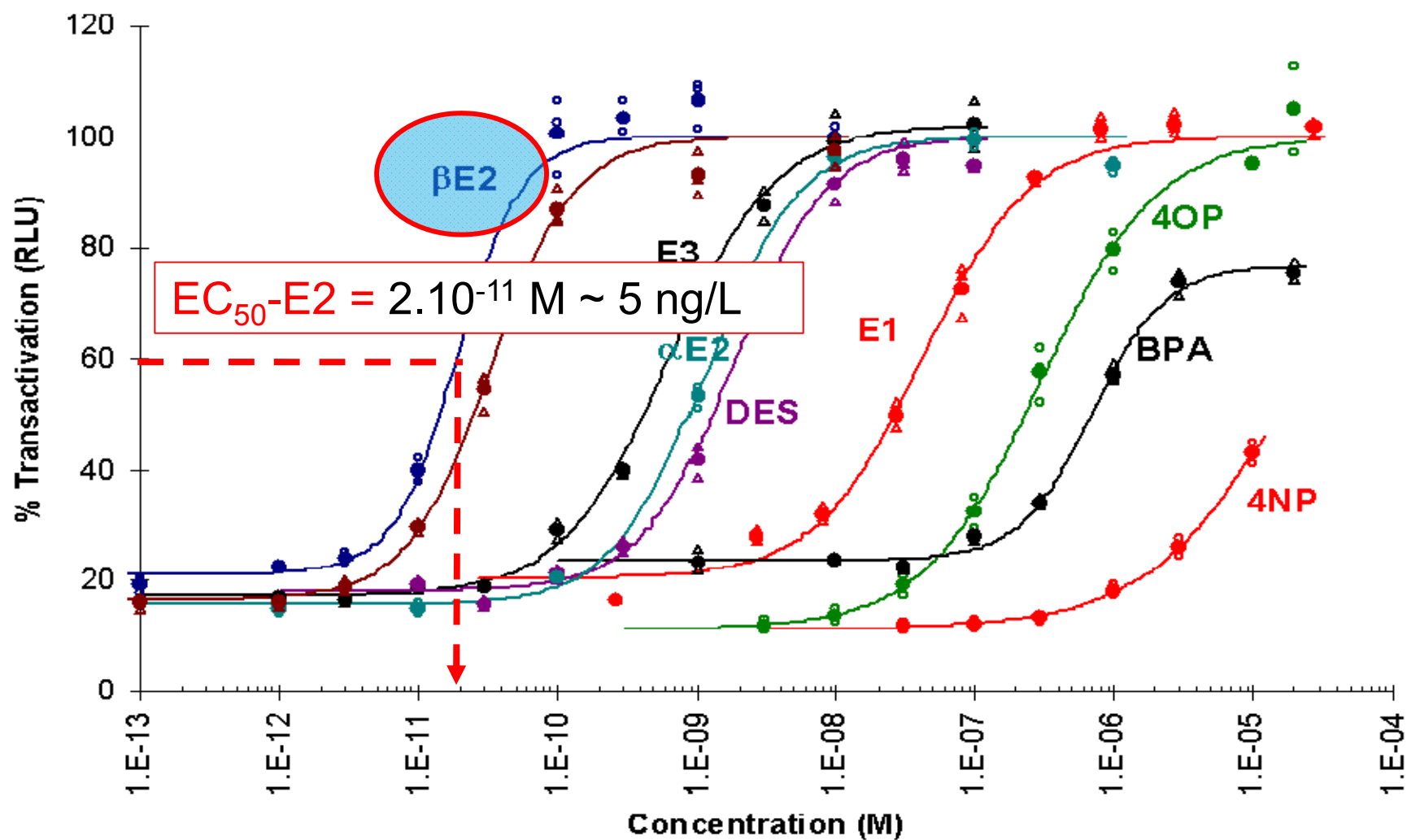
Mesure **quantitative** de l'activité PE de diverses substances

$REP = EC_{50} \text{ composé ref} / EC_{50} \text{ composé i}$ (REP = Relative potency)

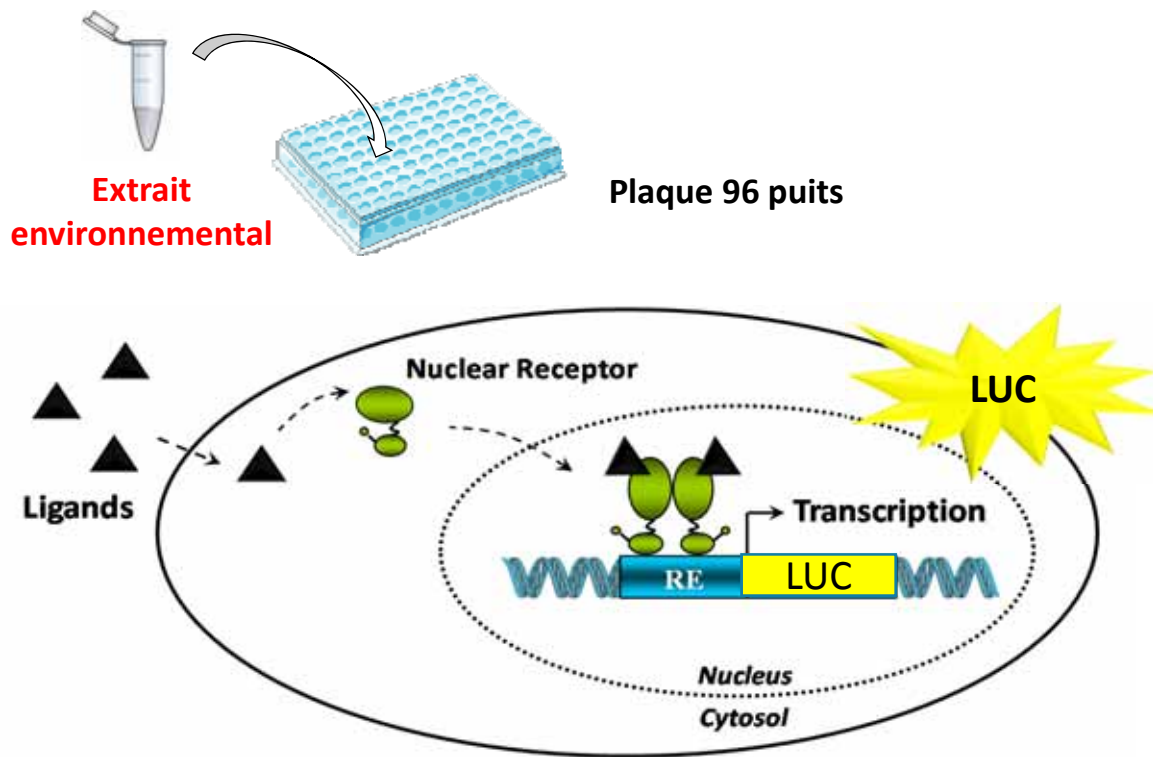
EC_{50} = concentration induisant 50 % de l'effet maximum

Évaluation du potentiel PE de composés individuels

➤ Exemple de l'activité oestrogénique

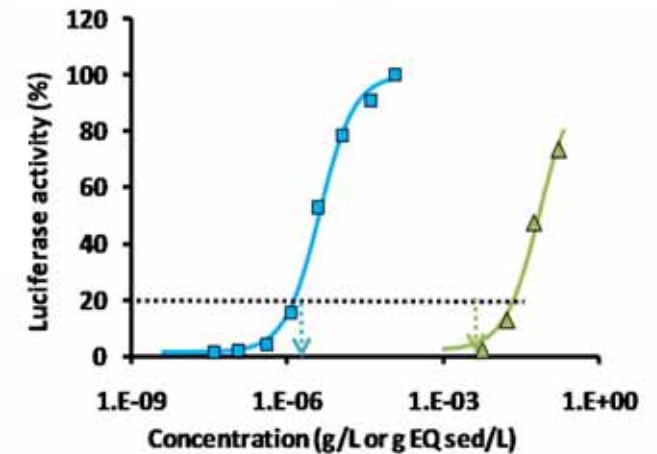


Évaluation du potentiel PE de matrices complexes



→ Détection de l'ensemble des ligands présents dans le mélange complexe

■ Composés réf. ▲ Matrice complexe



$$\text{BioTEQ} = \frac{\text{EC}_{20} \text{ ref. compound}}{\text{EC}_{20} \text{ Extract}}$$

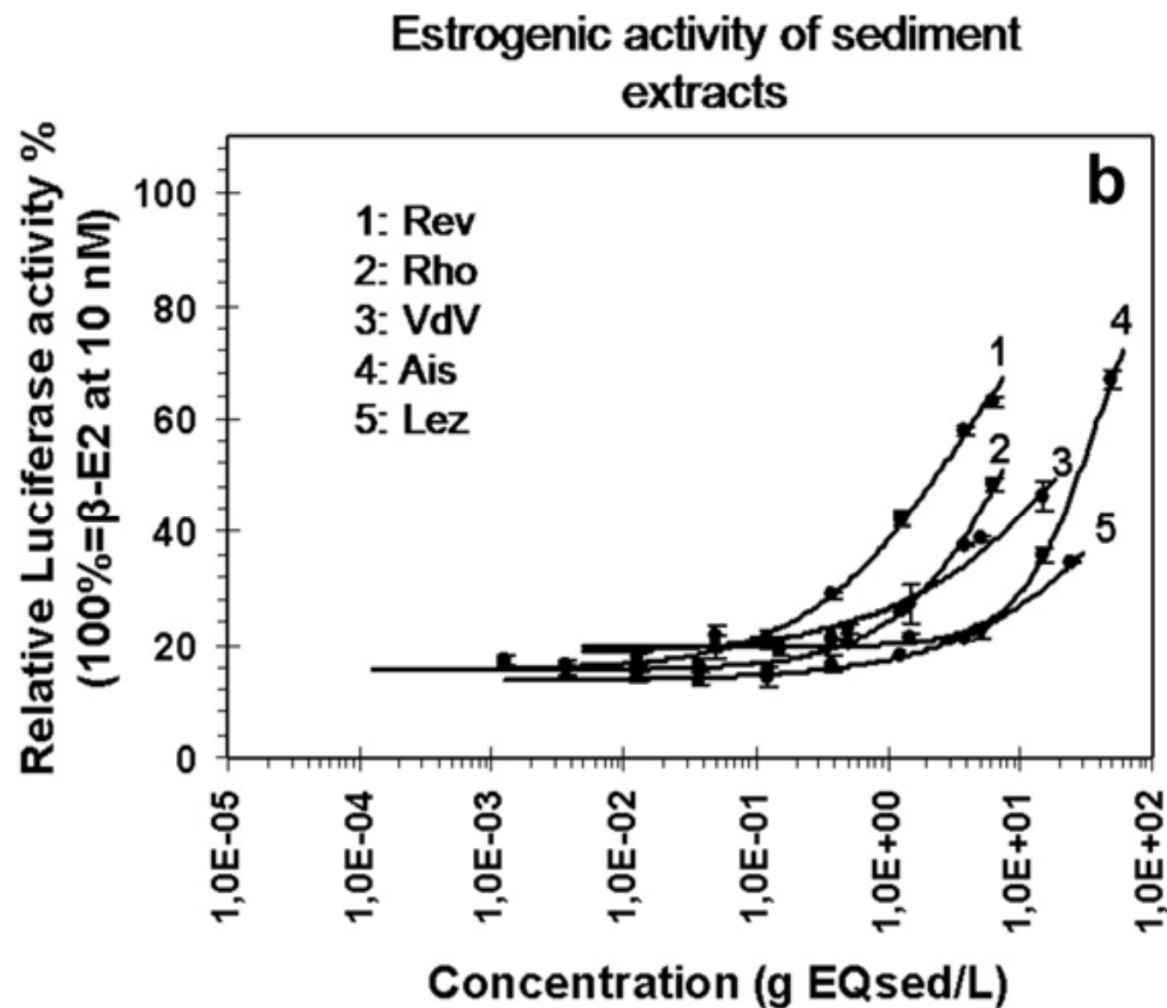
(e.g. E2-EQ pour l'activité oestrogénique)

Bio-TEQ = Quantification intégrée des composés actifs

✓ *BioTEQs = profil toxicologique = « fingerprint »*

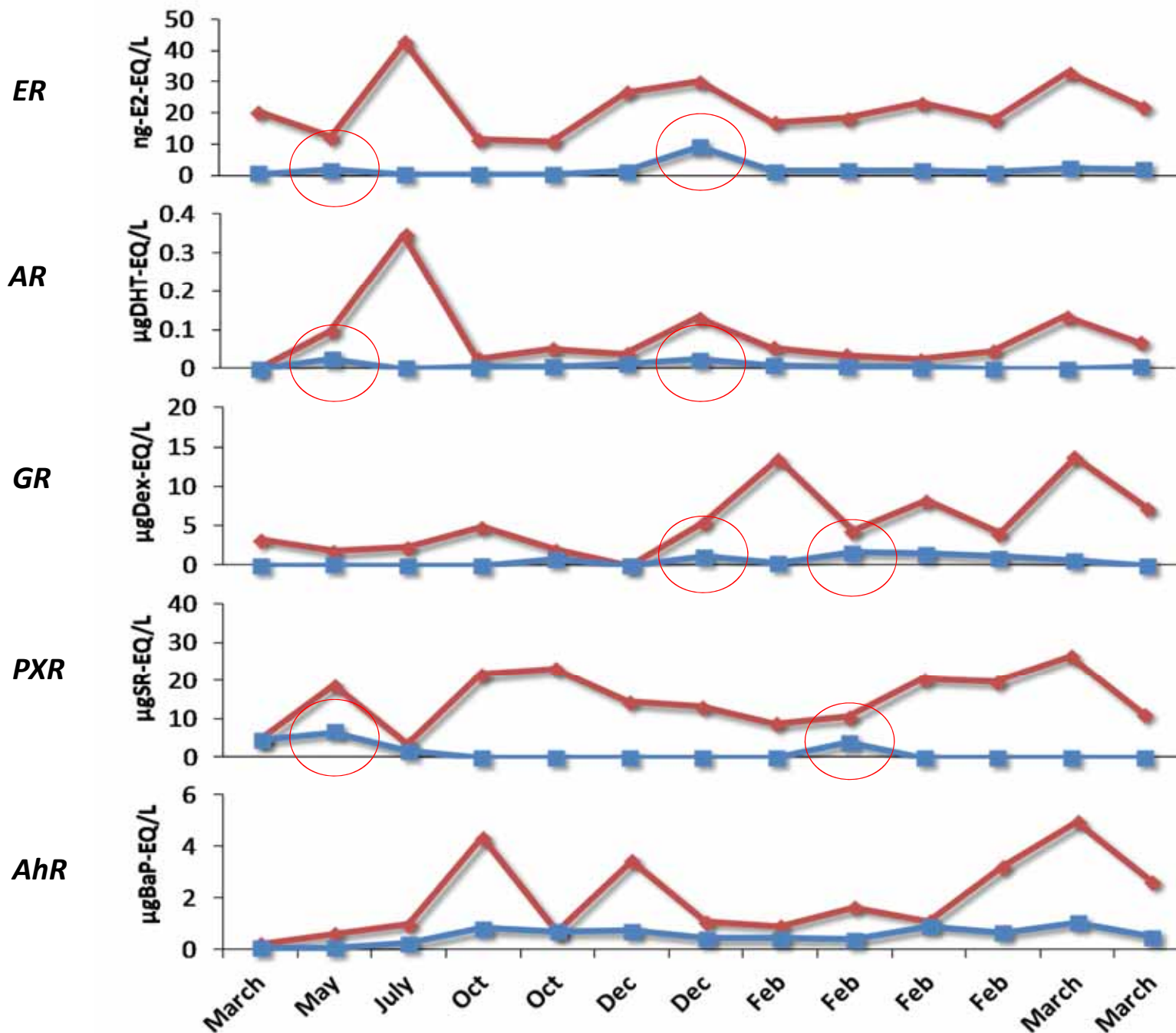
Détection de PE dans des sédiments de rivière

➤ Détection de xenoestrogènes



Site	E2-EQ (ng/g)
Rév	6.43
Rho	1.69
Lez	0.83
VdV	0.29
Ais	0.20

Profil d'activité PE d'un effluent hospitalier



Avant
traitement



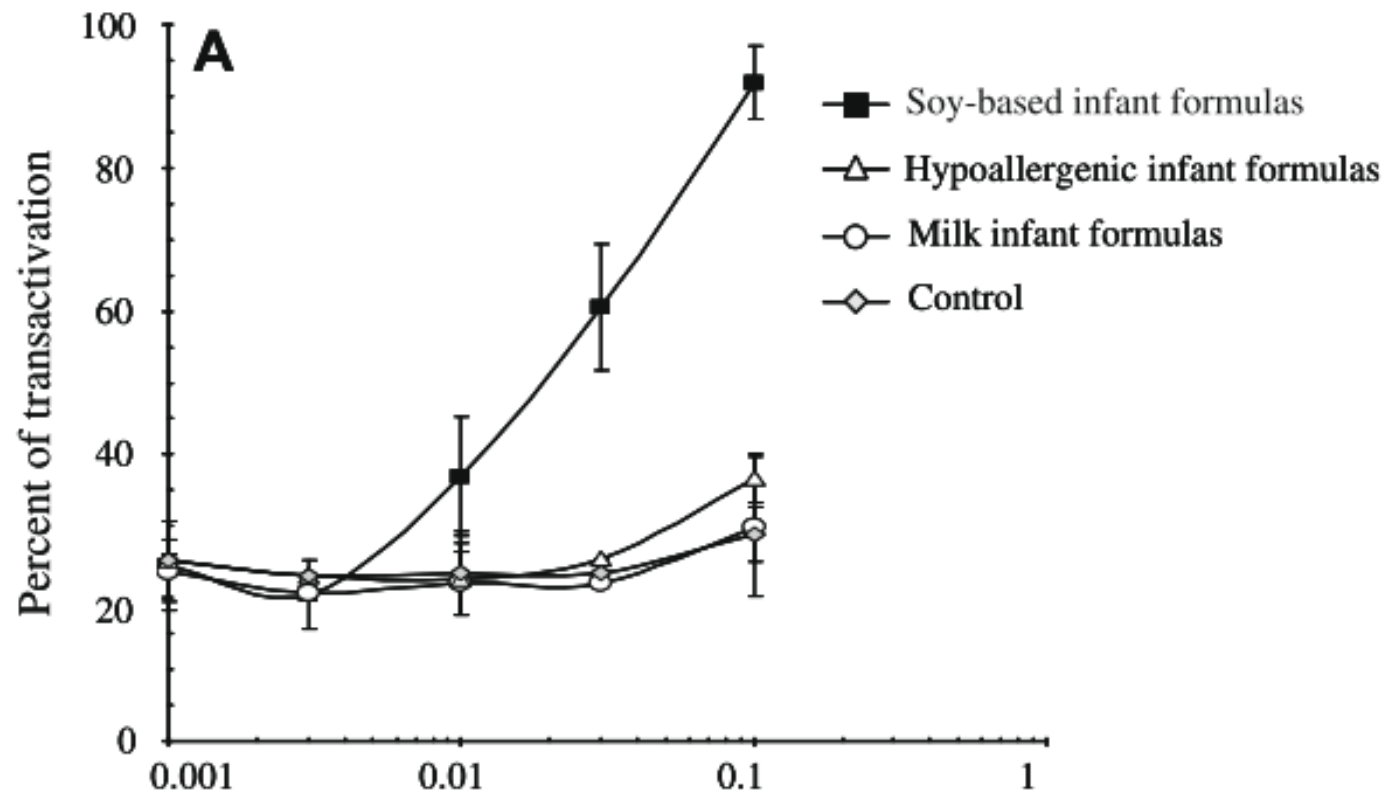
Après
traitement



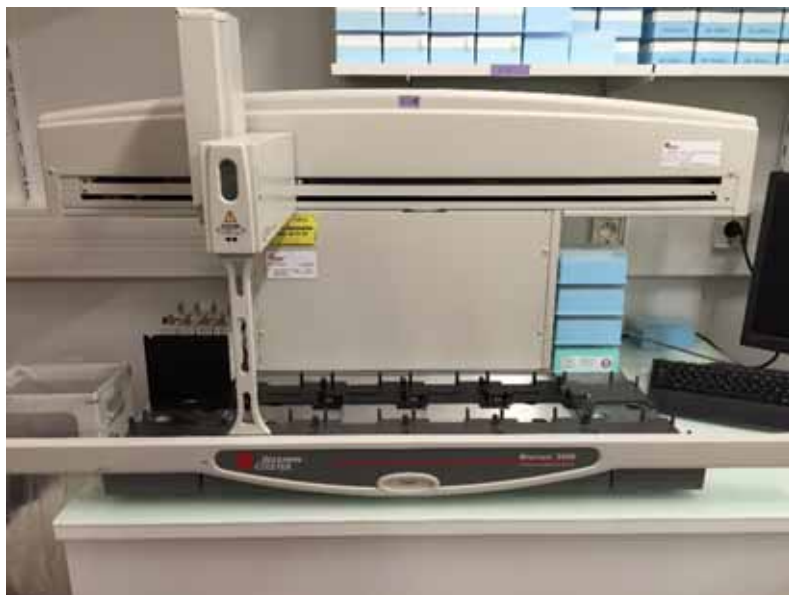
✓ *Évaluation
de la performance
du traitement*

Agence Nationale de la Recherche
ANR
PANACEE

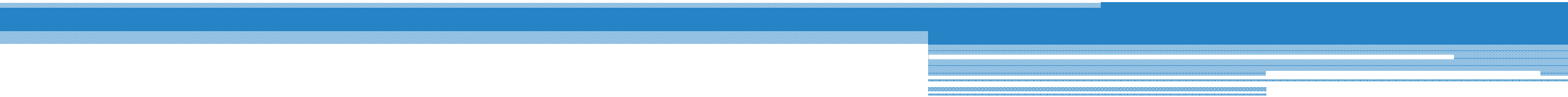
Détection de PE dans des préparations alimentaires



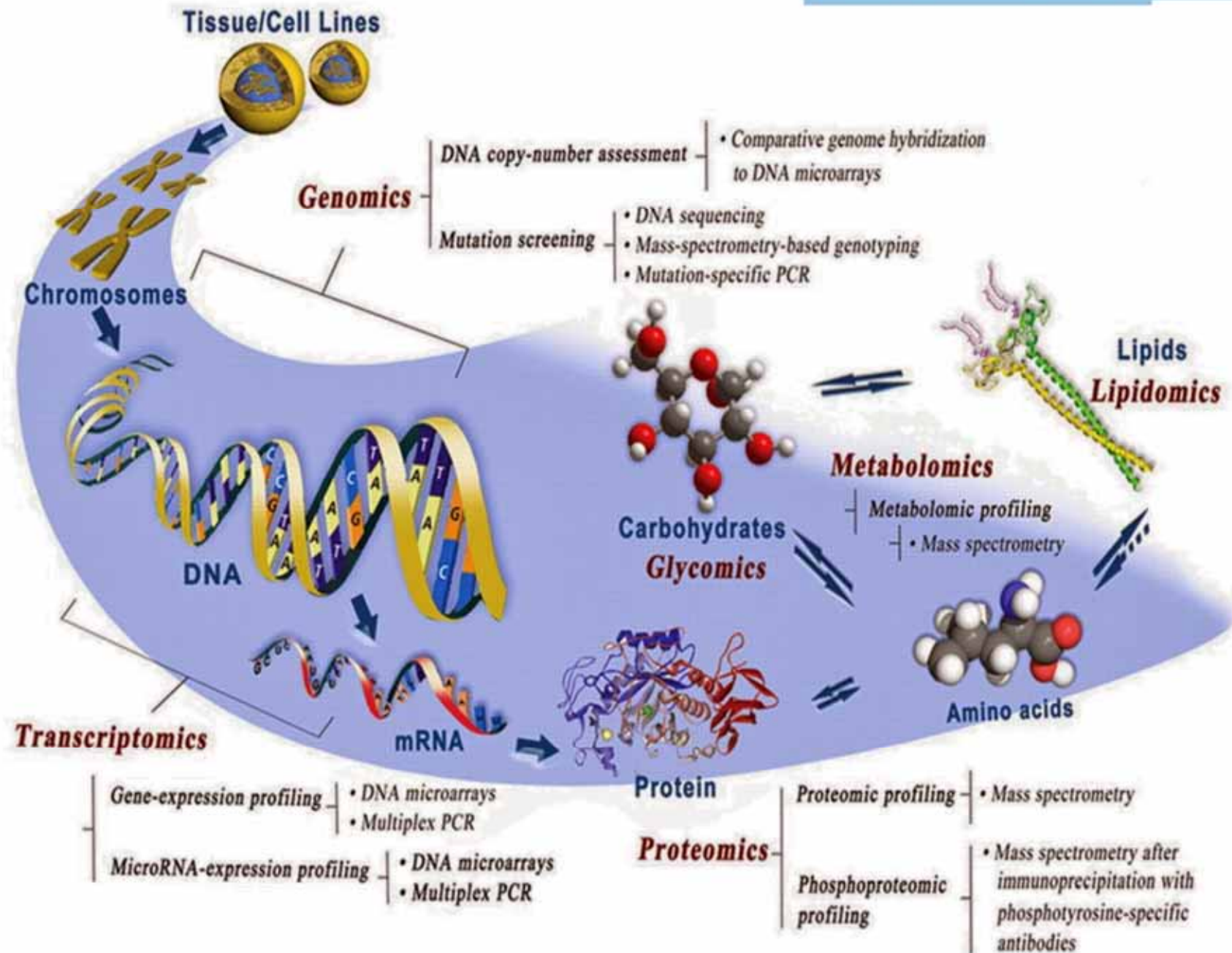
Criblage très haut-débit - Automatisation



Méthodes *in vivo* – Réponses individuelles



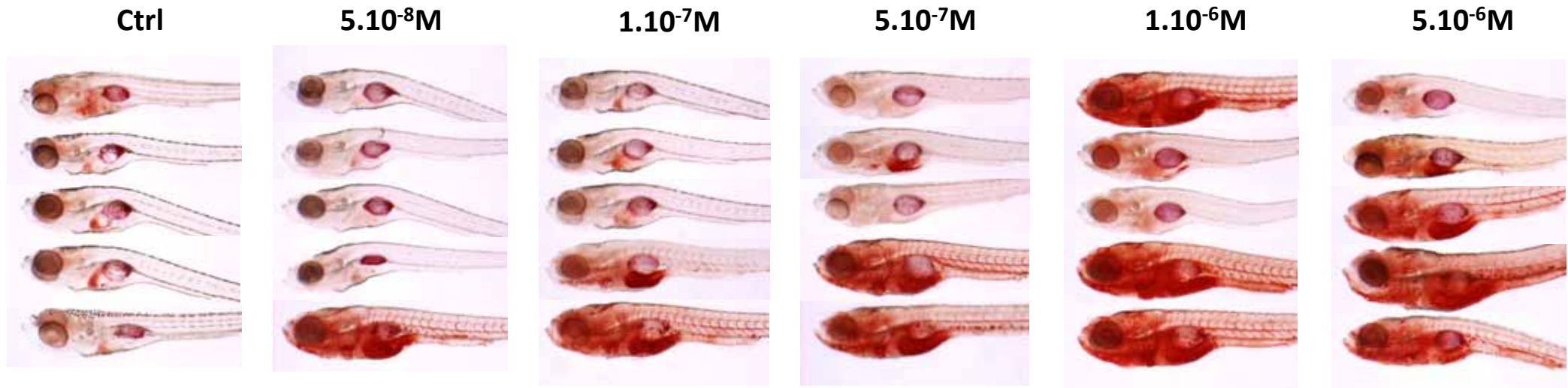
Expression de gènes, protéines ...



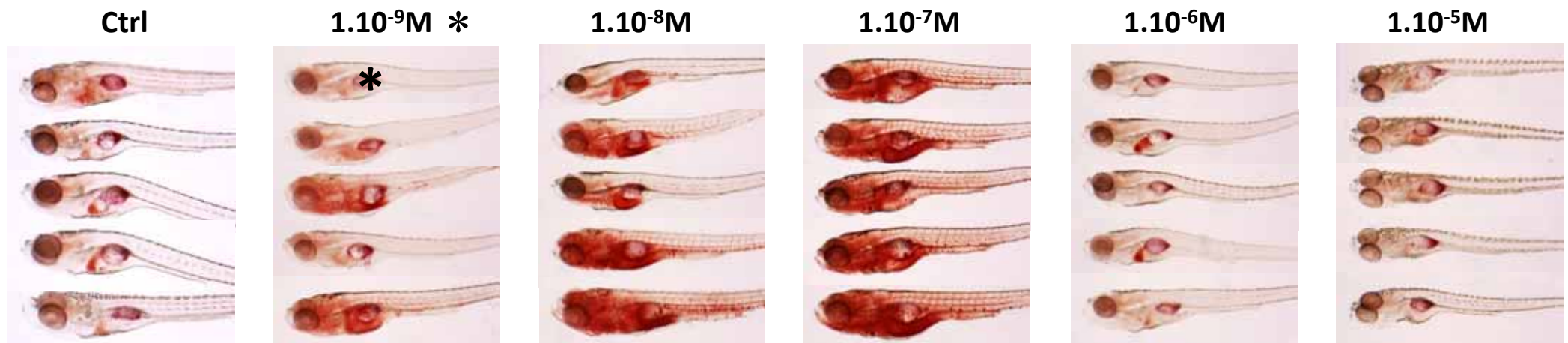
Accumulation d'oil red O chez le poisson zèbre

➤ Activation de PPAR γ

Composé perfluoré (PFOA)



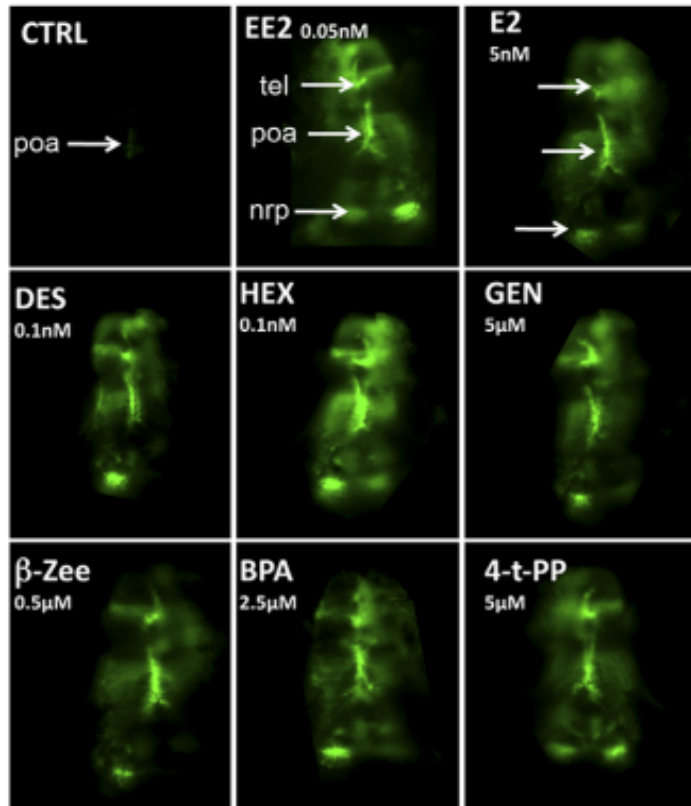
Phtalate (MEHP)



Organismes transgéniques

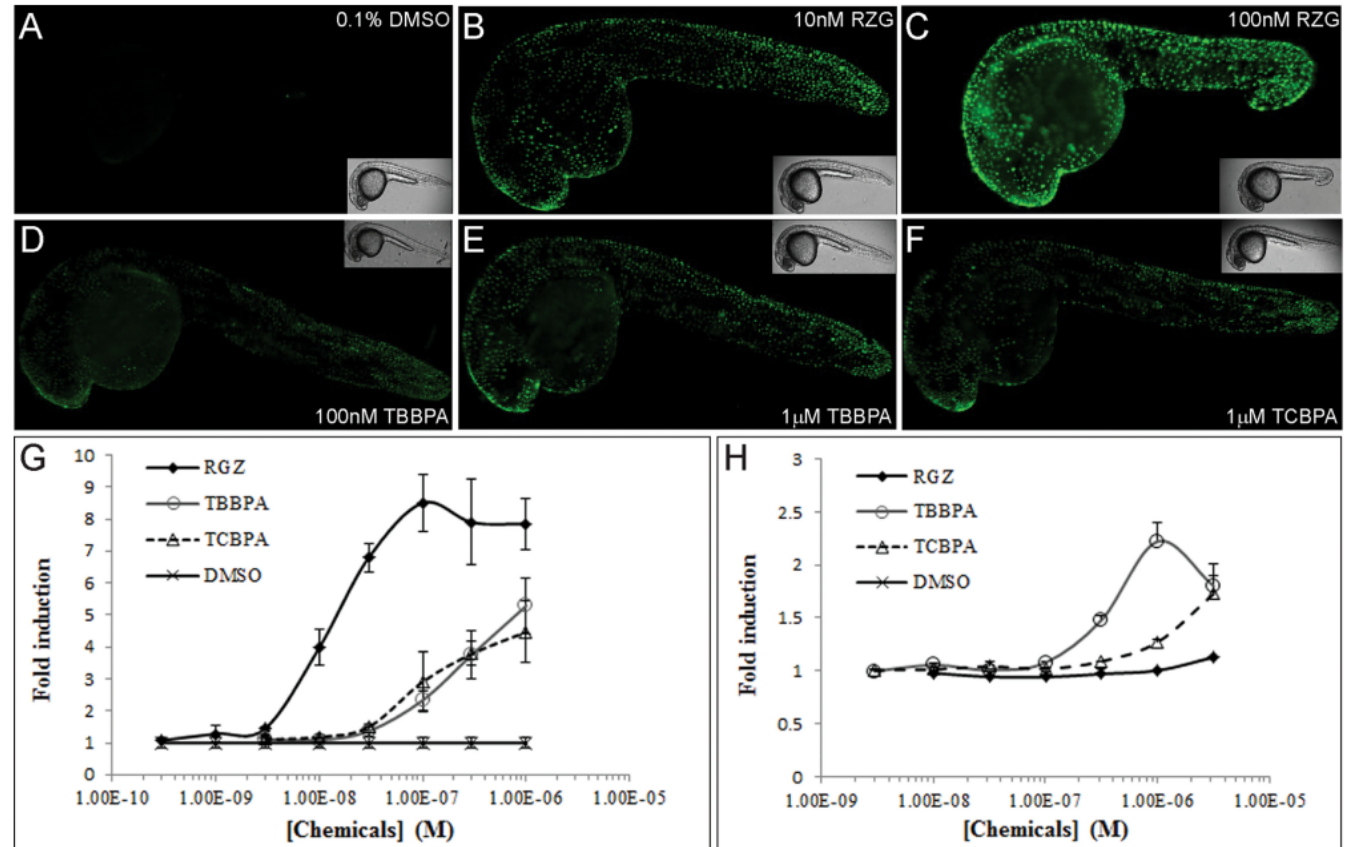
➤ Embryons de poisson zèbre

✓ Modèle *Cyp19a1b*-GFP (oestrogénicité)



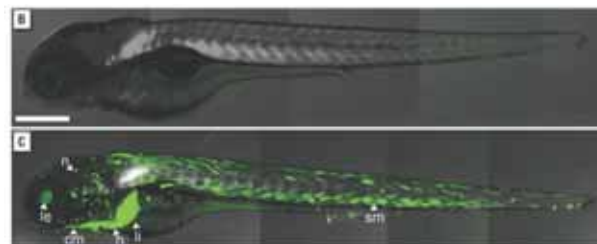
Brion et al. 2012, PLOS

✓ Modèle *(Gal4)hPPARγ*-GFP



Riu et al. 2014 Tox. Sci.

✓ Modèle *ERE*-GFP (oestrogénicité)

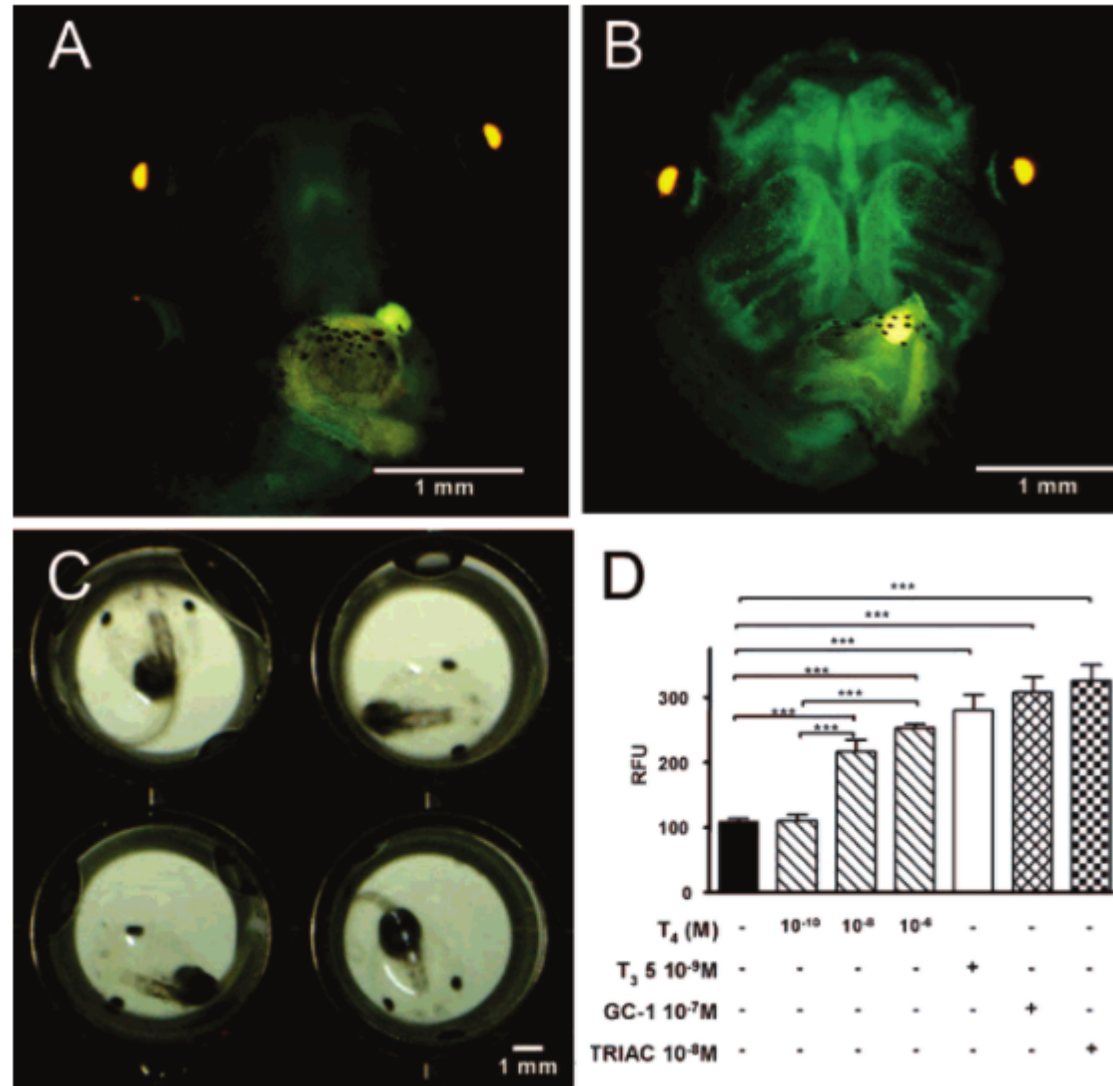


Lee et al. 2012, Env. Sci. Tech.
Gorelick et al. 2014 Env. Sci. Tech.

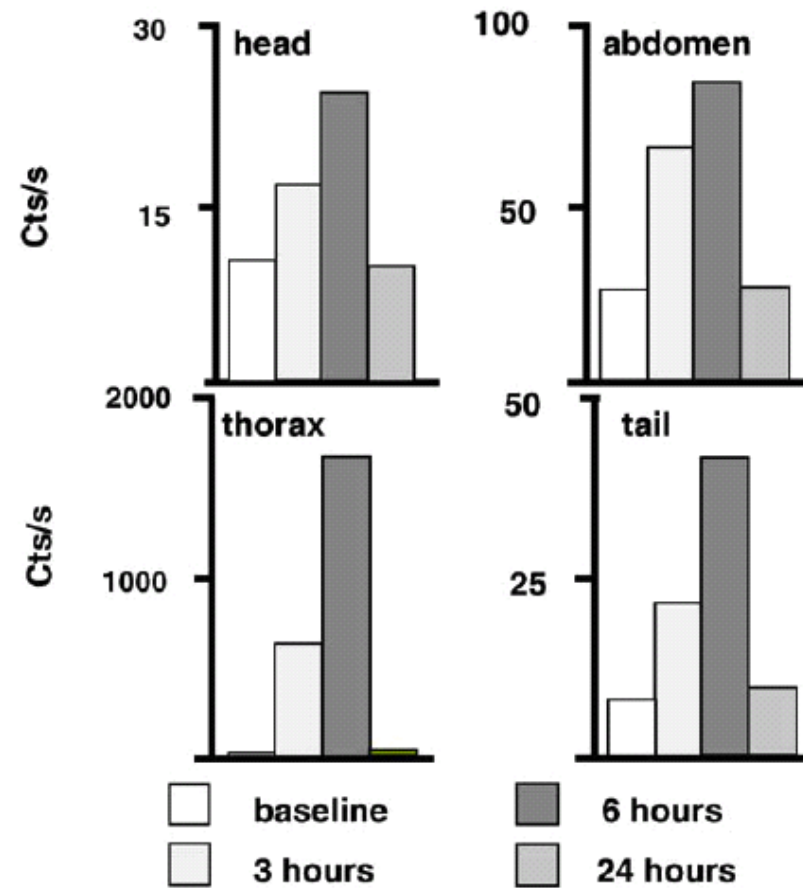
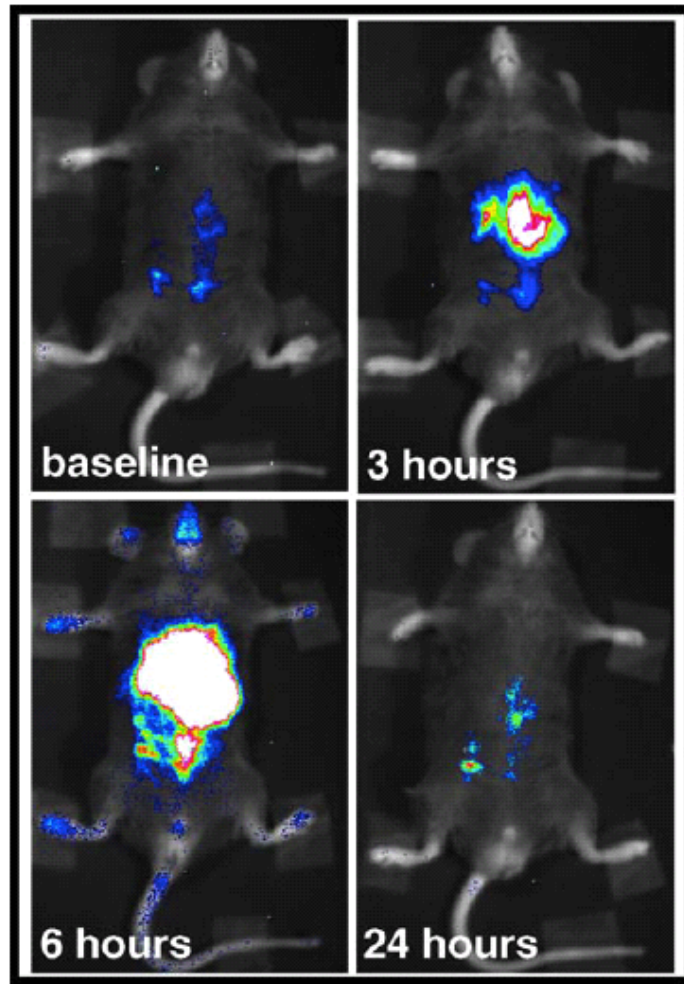
Organismes transgéniques

➤ Embryons de xénope (axe thyroïdien)

Modèle TRE-GFP



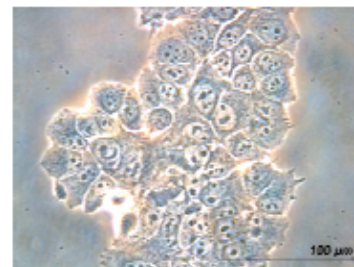
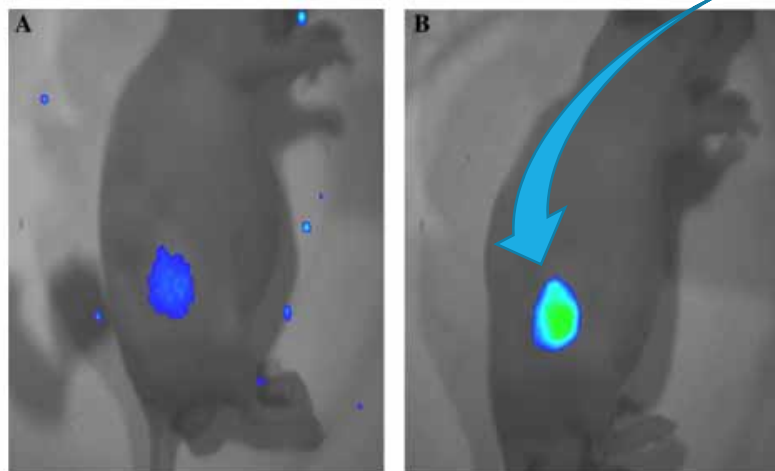
➤ *Souris ERE-LUC*



• Maggi A, et al., (2004a).

Xénogreffes sur souris

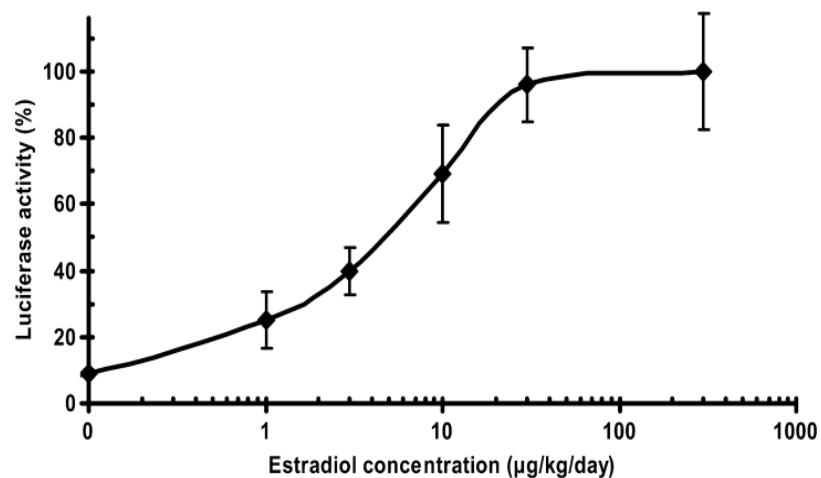
➤ *in vivo* vs *in vitro*



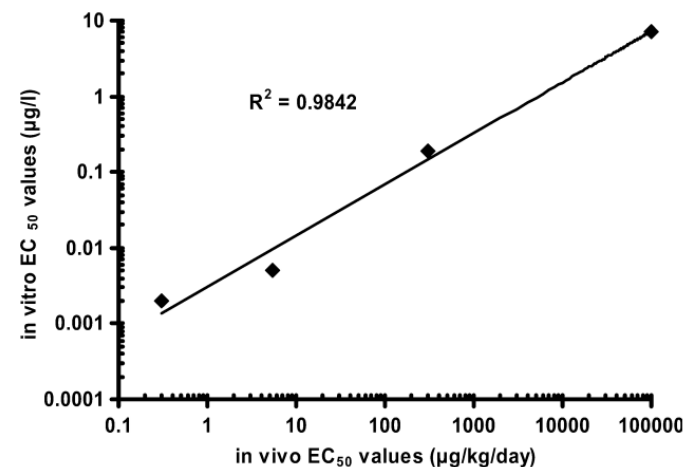
MELN (ERα)

Compound	In vitro EC ₅₀ (μg/L)	In vivo EC ₅₀ (μg/kg/day)	
		sc	Oral
EE ₂	0.0020 ± 0.0003	0.3 ± 0.05	3 ± 0.6
E ₂	0.005 ± 0.001	5.5 ± 1.5	100 ± 23
E ₁	0.19 ± 0.03	250 ± 79	~300
Gen	7.2 ± 4.0	~100,000	~80,000
OP	11 ± 3	nd	nd
2,4'-DDE	871 ± 290	nd	nd

✓ *Plus faible activité in vivo*



✓ *Réponse in vivo à l'EE2*



✓ *Corrélation in vitro vs in vivo*

➤ Méthodes *in silico*

- ✓ Méthodes d'avenir mais à améliorer
- ✓ *Enrichir avec des données issues des autres techniques (e.g. cristallographie +++)*

➤ Méthodes biochimiques

- ✓ Très utiles pour l'étude du mécanisme d'action
- ✓ Adaptées au criblage à haut débit
- ✓ *Non prise en compte du contexte « cellulaire » ...*

➤ Méthodes *in vitro* cellulaires

- ✓ Très utiles pour l'étude du mécanisme d'action et de la fonction
- ✓ Plus intégratives que les tests biochimiques
- ✓ Très adaptées à un criblage à haut débit
- ✓ *Prise en compte partielle de la pharmaco-cinétique du/des composés*

➤ Méthodes *in vivo*

- ✓ *Lourdes et coûteuses*
- ✓ Elles ont évolué et deviennent plus simples et plus abordables (i.e. techniques d'imagerie et modèles embryo-larvaires)

✓ *Enjeu = règle des 3R - Remplacer, réduire, raffiner l'expérimentation animale → Méthodes alternatives*

Tests normalisés - OCDE

TG	Title	Adoption year
440	Uterotrophic Bioassay in rodents: A short-term Screening Assay for Oestrogenic Properties	2007
407 (updated)	Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents	2008
211 (updated)	Daphnia Magna Reproduction Test	2011
441	Hershberger Bioassay in rats: A Short-Term Screening Assay for (Anti)Androgenic Properties	2009
229	Fish Short Term Reproduction Assay	2009
230	21-Day Fish Assay: A Short-Term Screening for Oestrogenic and Androgenic Activity, and Aromatase Inhibition	2009
231	Amphibian Metamorphosis Assay	2009
455	Stably Transfected Human Oestrogen Receptor- α Transcriptional Activation Assay for the Detection of Oestrogenic Agonist Activity of Chemicals	2009
233	Sediment-Water Chironomid Life-Cycle Toxicity Test Using Spiked Water or Spiked Sediment	2010
234	Fish Sexual Development Test	2011
456	H295R Steroidogenesis Assay	2011
457	BG1Luc Estrogen Receptor Transactivation in vitro Assay to Detect Estrogen Receptor Agonists and Antagonists	2012

➤ Test oestrogénique *in vivo* :
Bio-essai utérotrrophique chez les rongeurs
(OCDE 440)

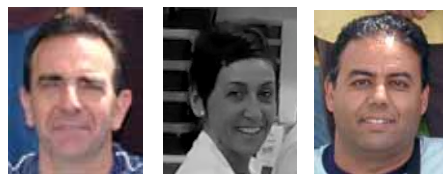
➤ Test androgénique *in vivo* :
Bioessais de Hershberger chez le rat
(OCDE 441)

➤ Test thyroïdien *in vivo* :
Bioessais de métamorphose chez le xénope
(OCDE 231)

➤ Tests oestrogéniques *in vitro* :
Tests de trans-activation sur Hela9903 **(OCDE455)**
& BG-1 **(OCDE 457)**

✓ **Enjeu** = règle des 3R - Remplacer, réduire, raffiner l'expérimentation animale → Méthodes alternatives

Remerciements



Patrick Balaguer
Marina Grimaldi
Abdelhay Boulahtouf



Albane le Maire
Vanessa Delfosse
Tiphaine Huet
William Bourguet



Selim Aït-Aïssa
François Brion
Nathalie Hinfray



Vincent Laudet



Daniel Zalko
Jean-Pierre Cravedi



Barbara Demeinex
Jean-Baptiste Fini

NovAlix (Illkirch)
Dominique Roecklin
Christina Muller
Valérie Vivat

IRB (Montpellier)
Sabine Gerbal
Martine Daujat

IGF (Montpellier)
Bertrand Beucher
Jean Marc Pascussi

INRA (Nice)
Roger Rahmani



