

Proposition pour l'appel d'offre interne ECCOREV 2010 **Bisphenol A et Altération de la Spermatogénèse: projet BiPAS**

Résumé

Le projet proposé a pour but d'étudier les effets nocifs et les mécanismes d'action du **bisphénol A (BPA)**, un polluant environnemental utilisé dans l'industrie du plastique et suspecté d'être un perturbateur endocrinien, sur la spermatogénèse et la cancérogenèse. Pour ce faire, nous utiliserons un modèle original *ex-vivo* validé (coculture de cellules testiculaires germinales et de cellules de Sertoli chez le rat) et nous étudierons les étapes clés de la spermatogénèse en alliant analyse physiologique et l'étude des modifications de l'expression des transcrits (transcriptomique) sous l'effet du BPA. Cette étude devrait faire émerger des gènes/protéines altérés par le BPA susceptibles de servir de support de tests pour des puces ADN dédiées à la toxicologie. Ce partenariat n'a que très rarement été mis en œuvre en toxicologie de la reproduction entre physiologiste, cytobiologiste et toxicologue, et jamais sur le BPA.

Contexte du projet

Depuis environ cinq décennies, on observe une **altération significative de la qualité du sperme** dans les pays industrialisés. C'est la publication de Carlsen et coll. ¹ qui, selon une méta-analyse de 61 études réalisées dans le monde entier, révélait que le volume séminal et la concentration des spermatozoïdes avaient diminué d'environ 50% depuis 50 ans. Plus récemment, Jensen et coll. ² ont montré une **diminution de la fécondité** chez les femmes danoises qui pourrait être reliée à la moindre qualité du sperme chez leurs partenaires. Parallèlement à l'altération des paramètres de sperme, d'autres pathologies génitales comme la **cryptorchidie, l'hypospadias ou le cancer du testicule**, sont en constante augmentation en Europe ³.

Ces troubles de la reproduction ont rapidement été associés avec **l'accroissement des concentrations et des variétés de toxiques dans notre environnement**. Actuellement, la nouvelle réglementation REACH (Registration, Evaluation and Authorization of Chemicals) impose des études toxicologiques et reprotoxicologiques pour environ 30 000 substances vendues en quantité supérieure à 1 tonne par an pour les enregistrements réalisés entre décembre 2010 et juin 2018. Cette réglementation concerne en particulier les substances carcinogènes, mutagènes et toxiques pour la reproduction (CMR). La Commission Européenne estime le **coût de cette évaluation entre 2.8 et 5.2 billions sur 5 ans**. Le rapport du « Joint Research Centre » de la Commission Européenne estime qu'en moyenne 2893 toxiques pour la reproduction et 2135 toxiques pour le développement sont à tester. En même temps, il y existe une forte pression sociale pour **réduire le nombre d'animaux sacrifiés** pour la réalisation des études toxicologiques et d'appliquer la règle des « 3R » (Reduce, Refine, Replace). En effet l'application de la réglementation REACH nécessitera le sacrifice de millions d'animaux si des tests toxicologiques *in vivo* sont utilisés. Par ailleurs, ces tests sont d'un intérêt limité pour la compréhension des mécanismes d'action des toxiques.

Il est donc essentiel pour des raisons économiques, éthiques et de santé publique d'utiliser des **méthodes alternatives** pour faire évoluer la toxicologie réglementaire: c'est le sens de

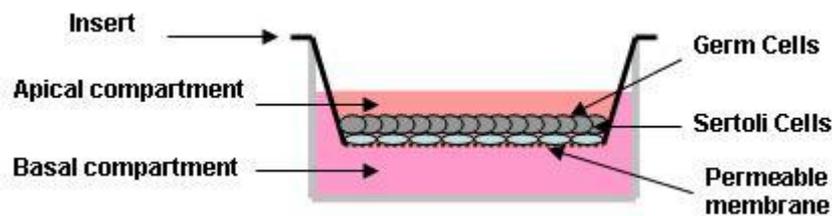
l'article publié récemment par Thomas Hartung «Toxicology for the twenty-first century» dans *Nature* en juillet 2009⁴.

Modèle cellulaire

Actuellement, il est très difficile d'étudier les mécanismes influençant la spermatogénèse avec les seules méthodes *in vivo* couramment utilisées : tests de fertilité, poids testiculaire, analyse microscopique de coupes de testicules, analyse de sperme.

La toxicologie utilise de plus en plus les cultures cellulaires comme alternative aux tests sur animaux qui permettent de s'affranchir des variabilités interindividuelles rencontrées *in vivo*, tout en épargnant de nombreuses vies animales, car la toxicologie de la reproduction concerne 90% des animaux testés. Cependant les méthodes alternatives actuelles utilisent soit des cellules germinales soit des cellules de Sertoli en culture. Or ces cellules primaires ne « tiennent » pas plus de 3 ou 4 jours en culture, ce qui ne permet pas d'étudier les effets long terme des contaminants environnementaux.

Le modèle proposé, mis au point et validé par notre collaborateur Philippe Durand^{5,6}, utilise un système original chez le rat de cellules germinales et de cellules de Sertoli en coculture dans des chambres bicamérales (figure ci-contre).



Ces cultures maintiennent la **barrière hémato-testiculaire (BHT) intacte** et permettent d'étudier les phases mitotiques et méiotiques ainsi que le début de la spermatogénèse jusqu'au stade de spermatide ronde sur une période de 4 semaines, durée nécessaire pour observer la toxicité chronique des toxiques et leur éventuelle réversibilité. Ce modèle permet de mettre dans le compartiment basal un toxique qui doit donc traverser la barrière hémato-testiculaire avant d'atteindre les cellules germinales mimant ainsi ce qui arrive *in vivo*. D'ailleurs ce modèle a été validé physiologiquement en démontrant le maintien des jonctions cellulaires et par l'analyse microscopique de coupes histologiques en tout point semblables à des coupes testiculaires de rats de 28 jours⁷.

Contaminant

Parmi les très nombreux produits susceptibles d'être responsable, au moins en partie, de pathologies testiculaires, il en est un qui suscite beaucoup de craintes aujourd'hui, il s'agit du **bisphénol A (BPA)**, qui rentre dans la composition du polycarbonate, et constitue un des plus gros volumes de produits chimiques manufacturés dans le monde (bouteilles eau minérale, sodas, biberons, etc.)

En effet, vendredi 5 février 2010, l'AFSSA a émis une alerte sur les risques possibles liés à son utilisation en particulier parce qu'il entre dans la fabrication des biberons. (http://tempsreel.nouvelobs.com/actualites/societe/20100205.OBS5974/bisphenol_a).

Une étude canadienne récente⁸ a montré que de nombreuses marques de biberons pouvaient relâcher du BPA jusqu'à 500 µ/L surtout après chauffage! Cheng et coll.⁹ ont montré que le BPA perturbe la BHT mais reconnaît dans le même temps : « qu'il manque un vrai modèle

d'étude *in vitro* pour aller plus loin dans la compréhension des mécanismes moléculaires de toxicité.» **Nous avons donc choisi le BPA en raison du besoin urgent d'études complémentaires en toxicologie de la reproduction pour ce contaminant et parce que nous possédons un modèle adéquat pour l'étudier.** Les expositions au toxique seront réalisées dans le laboratoire de P. Durand à des concentrations faibles déterminées par nos propres tests de cytotoxicité et en nous basant sur les travaux de la littérature.

Méiose

1- Effet du BPA sur le déroulement de la première division méiotique chez le rat

L'altération des événements fondamentaux de la prophase tels que l'appariement des chromosomes et la recombinaison génétique peut bloquer la méiose ou altérer la qualité génétique des gamètes. **Nous utiliserons des anticorps dirigés contre des protéines impliquées dans ces événements :**

- SCP3 est l'anticorps de base pour étudier l'appariement des homologues. Il révèle les éléments axiaux et latéraux des complexes synaptonémaux du stade leptotène au stade diplotène de la prophase I. Cet anticorps fournit des données quantitatives et qualitatives sur la fréquence des stades de la prophase I et les anomalies des complexes synaptonémaux.
- YH2AX/SCP3 : Le marquage avec YH2AX révèle la formation et la réparation des cassures double-brin (CDB) lors de la prophase I.
- RAD51/SCP3 : Rad 51 est une protéine de réparation des CDB dont le marquage est significatif au stade leptotène.
- MLH1/SCP3 : Mlh1 est une protéine de réparation associée à la régulation et la résolution des crossing-over, le nombre et la distribution des spots Mlh1 correspond à celui des chiasmats.

2- Action mutagène du BPA au cours de la phase de multiplication spermatogoniale

Le marquage SCP3, couplé à la coloration de la chromatine par le DAPI et à la révélation des centromères par un sérum anti-CREST, permet de quantifier au cours du stade pachytène les micronoyaux contenant des chromosomes ou des fragments chromosomiques.

Cette approche va nous permettre de cibler les événements de la méiose qui subissent les effets du BPA, et par comparaison avec les résultats de l'étude transcriptomique, d'identifier, de localiser et reconnaître la fonction de nouvelles protéines au cours de la méiose par l'approche immunocytochimique.

Transcriptome

Le problème de la toxicologie aujourd'hui, c'est de répondre au problème de santé publique concernant les populations (incluant les enfants) exposées à de faibles doses de polluants environnementaux de façon chronique. Or la toxicologie classique sur animaux éclaire plus sur la toxicité aiguë à forte dose chez l'animal que sur les modifications cellulaires intimes.

La connaissance des génomes de nombreux organismes, dont le rat, et le développement récent des puces à ADN nous permettent aujourd'hui de démultiplier les essais de type Northern blot ou RT-PCR à l'échelle du génome entier. En particulier cette technologie permet de visualiser la dérégulation de l'expression génique dans son ensemble sous l'influence de faibles concentrations de toxique. Peu de techniques sont assez sensibles pour répondre à ce problème. L'utilisation de logiciels bioinformatique intégrant en permanence les données remises à jour de la littérature permet alors de relier les gènes induits ou réprimés

à des fonctions biologiques et à des voies métaboliques ou de régulation cellulaire. A ce jour, nous n'avons trouvé qu'une étude utilisant les puces à ADN pour mesurer l'impact du BPA¹⁰ et ce seulement sur des homogénéisats de testicules de souris, modèle mal adapté à l'étude fine des mécanismes cellulaires car trop de types cellulaires s'y retrouvent, moyennant la réponse. En utilisant 2 concentrations de BPA pour traiter les cellules et 3 prélèvements à J0, J16 et J28, à comparer aux cellules non traitées, une étude courte sur 1 an est possible.

Cette approche devrait nous permettre de trouver les gènes / protéines cibles du BPA et de les intégrer dans un contexte de fonctionnement cellulaire en les soumettant aux physiologistes du consortium pour en tirer une interprétation biologique pertinente.

Mode d'interaction

Nous pensons donc que le projet BiPAS couplant le **modèle de la BHT de Philippe Durand** qui a une connaissance approfondie de la physiologie de la spermatogénèse, **l'expertise de Marie Guichaoua en immunocytochimie** et en particulier sa maîtrise de l'étape de tous les dangers, la méiose, et **l'expertise en expression génique d'Odette Prat** pour étudier les mécanismes toxicologiques, pourront, apporter des réponses éclairées à une interrogation urgente sur le **BPA**.

Demande financière : coût total projet 8700 €

Equipe cytobiologie

Coût de l'immunocytochimie sur la méiose	
Anticorps primaires	
SCP3 x2	680
YH2AX	340
RAD51	340
MLH1	340
Anticorps secondaires	
Anti-lapin FITC	170
Anti-souris alexa 546	194
Shandon single cytofunnel boîte de 500	620
Milieu de Ham'F 10, flacons de 500ml x10	128
Total	2812

Equipe transcriptome

Coût des expériences puces Agilent (€)	
Kit de 10 puces de 4 génomes rat (44K)	3635
Kit de marquage avec amplification Quick Amp	1718
Kit d'hybridation (pour 10 lames)	220
Solutions de lavage	315
Total pour 10 points (quadruplets)	5888

Description du consortium

Marie-Roberte GUICHAOUA (affiliée ECCOREV) impliquée à 30 %

Laboratoire de Biologie de la Reproduction
Hôpital de la Conception, 147, Bd Baille, 13385, Marseille cedex 5
Laboratoire de Biogénotoxicologie et Mutagenèse Environnementale EA 1784
FR CNRS 3098 ECCOREV , Europôle de l'Arbois
13100 Aix-en-Provence
Tél +33491383749
Fax + 33491383897
Email mguichaoua@ap-hm.fr

Docteur en Médecine, Docteur en Biologie Humaine
Praticien Hospitalier / Professeur des Universités. Responsable de la discipline « Médecine et Biologie du Développement et de la Reproduction » Faculté de Médecine de Marseille,
Responsable de l'UF de Spermiologie (3201) laboratoire de Biologie de la Reproduction, Hôpital de la Conception, Marseille.

3 principales publications en rapport avec le sujet

Tassistro, V., Ghalamoun, R., Saias-Magnan, J. & Guichaoua, M. Meiosis in normal and abnormal spermatogenesis, a new index to evaluate spermatogenesis. Indian J Med Res 129, 268-278 (2009).

Perrin, J. et al. Evolution of DNA strand-breaks in cultured spermatocytes: the Comet Assay reveals differences in normal and gamma-irradiated germ cells. Toxicol In Vitro 21, 81-9 (2007).

Guichaoua, M. R. et al. Meiotic anomalies in infertile men with severe spermatogenic defects. Hum Reprod 20, 1897-902 (2005).

Odette PRAT (affiliée ECCOREV) impliquée à 30 %

CEA / iBEB/ SBTN/ LEPC
Site de Marcoule
BP 17171
F-30207 Bagnols-sur-Ceze
Tel +33466791914
Fax +33466791905
Email odette.prat@cea.fr

Chercheur CEA, Ingénieur (Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Montpellier), Docteur en chimie organique, DEA de Biologie et Santé (Montpellier), post-doctorat en Biophysique (San Diego, USA), de 1985 à 2000 : chef de projet R&D dans l'industrie du diagnostic biomédical (lignes cancérologie, puis endocrinologie et auto-immunité).

Responsable du groupe " Transcriptomique" au sein du service SBTN, Institut de Biologie Environnementale et de Biotechnologie, Service de Biochimie et Toxicologie Nucléaire, Laboratoire de Protéines Cibles (de toxiques environnementaux).

3 principales publications en rapport avec le sujet

Prat, O. et al. Alterations in gene expression in cultured human cells after acute exposure to uranium salt: Involvement of a mineralization regulator. Toxicol In Vitro 24, 160-168 (2010).

Prat, O. et al. New insights into uranium toxicity: A gene expression analysis on human kidney cells. Toxicology Letters 164, S297-S297 (2006).

Prat, O. et al. Transcriptomic and proteomic responses of human renal HEK293 cells to uranium toxicity. Proteomics 5, 297-306 (2005).

Philippe DURAND (équipe collaborative hors ECCOREV) impliqué à 20 %

Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon
(IGFL – UCBL) UMR 1288.
Ecole Normale Supérieure, 69364. Lyon
Tel 04 72 72 89 65
Email Philippe.Durand@ens-lyon.fr

Responsable du groupe "Génomique Fonctionnelle de la Reproduction" de l'Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon depuis 2007.

Entre 1995 et 2006 Directeur de l'Unité 418 de l'INSERM "Communications Cellulaires et différenciation", Lyon. Entre 1986 et 1999 a exercé comme directeur de recherche puis Chef de département de Physiologie animale à l'INRA, Nouzilly
Maîtrise de Physiologie (Paris VI). D.E.A. de Physiologie de la Reproduction (Paris VI).
Thèse de 3e cycle (Paris VI) : Physiologie de la Reproduction. Thèse de Doctorat d'Etat ès Sciences. Lauréat du prix Max Ferdinand JAYLE de l'Académie des Sciences (1993).

3 principales publications en rapport avec le sujet

- Perrard, M. H. et al. Analysis of the intratesticular control of spermatogenesis by ex-vivo approaching. *Folia Histochem Cytobiol* 47, S89-94 (2009).
- Perrard, M. H. et al. Development of the meiotic step in testes of pubertal rats: comparison between the in vivo situation and under in vitro conditions. *Mol Reprod Dev* 65, 86-95 (2003).
- Staub, C. et al. The whole meiotic process can occur in vitro in untransformed rat spermatogenic cells. *Exp Cell Res* 260, 85-95 (2000).

Bibliographie

1. Carlsen, E., Giwercman, A., Keiding, N. & Skakkebaek, N. E. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *Brit. Med. J.* 305, 609-13 (1992).
2. Jensen, T. K. et al. Declining trends in conception rates in recent birth cohorts of native Danish women: a possible role of deteriorating male reproductive health. *Int J Androl* 31, 81-92 (2008).
3. Skakkebaek, N. E. et al. Germ cell cancer and disorders of spermatogenesis: an environmental connection? *Apmis* 106, 3-11; discussion 12 (1998).
4. Hartung, T. Toxicology for the twenty-first century. *Nature* 460, 208-12 (2009).
5. Perrard, M. H. et al. Development of the meiotic step in testes of pubertal rats: comparison between the in vivo situation and under in vitro conditions. *Mol Reprod Dev* 65, 86-95 (2003).
6. Staub, C. et al. The whole meiotic process can occur in vitro in untransformed rat spermatogenic cells. *Exp Cell Res* 260, 85-95 (2000).
7. Perrard, M. H. et al. Analysis of the intratesticular control of spermatogenesis by ex-vivo approaching. *Folia Histochem Cytobiol* 47, S89-94 (2009).
8. Cao, X. L. & Corriveau, J. Migration of bisphenol A from polycarbonate baby and water bottles into water under severe conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 6378-6381 (2008).
9. Li, M. W., Mruk, D. D., Lee, W. M. & Cheng, C. Y. Disruption of the blood-testis barrier integrity by bisphenol A in vitro: is this a suitable model for studying blood-testis barrier dynamics? *Int J Biochem Cell Biol* 41, 2302-14 (2009).
10. Oh, J. H. et al. Analysis of Gene Expression in the Testes of Mice Exposed to Bisphenol A and Nonylphenol. *Biochip Journal* 3, 12-20 (2009).