

Développement d'un test physiologique rapide *in vivo* pour mesurer les effets de perturbations thyroïdiennes

J.B. Fini¹, P. Balaguer², B. Demeneix¹

¹UMR7221, CNRS / MNHN, 75005, Paris, France

² U 896 Inserm, 34394, Montpellier, France

Introduction

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.

La thyroïde est une glande qui produit la thyroxine (tetraiodothyronine ou T₄) dont une certaine fraction est présente dans le sang et qui va être activée par désiodation (en triiodothyronine ou T₃) dans les tissus cibles de l'hormone. Les deux pathologies couramment associées au dysfonctionnement de la thyroïde sont :

- l'hypothyroïdie (faible production de T₄) 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.

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 ».

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.

Méthodes

Têtards transgéniques

Des générations F1 et F2 de têtards transgéniques ont été produites en croisant des fondateurs transgéniques avec des *X. laevis* sauvages. Les fondateurs (géniteurs) ont été produits en intégrant le transgène TH/bZIP couplé avec un gène de protéine fluorescente verte (GFP). Les têtards ont été triés par stade selon la classification de Nieuwkoop et Faber (NF).

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.

Produits Chimiques, Traitements, Imagerie

Voir Fini *et al.* 2007 pour plus de détail.

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 puit avec la tête au centre du puit. 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

Selon les méthodologies déjà publiées par le laboratoire.

Résultats

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).

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 mM) (inhibition au niveau de la glande); le NH3 (2M) (antagoniste au niveau du récepteur) et l'acide iopanoïque (10mM) (un inhibiteur de la désiodase). Les effets perturbateurs du BPA (10 mM) et du TBBPA (1 mM) peuvent aussi être détectés avec notre test rapide. Ces résultats font l'objet d'une récente publication (Fini *et al.*, 2007).

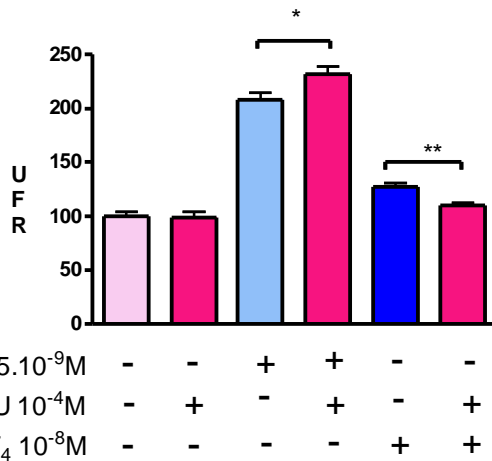


Figure 1 : L'effet avec le PTU (un antagoniste)

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.

Un dernier objectif de ce projet était d'évaluer, par des méthodes biologiques, l'activité de ligands naturels, synthétiques et environnementaux des récepteurs des hormones thyroïdiennes alpha et bêta. 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.

Discussion et conclusion

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.

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*.

Références

- Fini, J.B., Le Mevel, S., Turque, N., Palmier, K., Zalko, D., Cravedi, J.P., Demeneix, B.A. (2007). *Environmental science & technology* 41, 5908-5914.
- Furrow, J.D., Brown, D.D., 1999 *Molecular endocrinology* (Baltimore, Md 13, 2076-2089.
- Nieuwkoop, P. D., Faber, J. (1994). Normal Table of *Xenopus laevis*. New York, Garland Publishing.
- Turque, N., Palmier, K., Le Mevel, S., Alliot, C., Demeneix, B.A., 2005. *Environmental health perspectives* 113, 1588-1593.

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