

# Test alternatif pour la toxicologie de la reproduction

Philippe Durand et Odette Prat

## Résumé

Une altération sévère des paramètres reliés à la fertilité masculine a été observée en Europe et dans les pays industrialisés, associée à l'augmentation des toxiques environnementaux. Actuellement, les tests réglementaires permettant de détecter l'impact des produits chimiques sur la reproduction utilisent un grand nombre d'animaux de laboratoire. Pour des raisons éthiques, économiques et de santé publique, il est urgent de trouver des tests alternatifs utilisant moins d'animaux, moins coûteux et plus rapides. Cet article décrit une méthodologie permettant de diviser par vingt le nombre de rongeurs requis pour ces études, et par là même les délais et les coûts expérimentaux. Les auteurs, qui maîtrisent des technologies complémentaires, proposent un système original de culture *ex vivo* de tubes séminifères de rat mimant parfaitement la situation *in vivo*, ainsi qu'une batterie de tests comprenant analyse cytophysiologique et toxicogénomique. L'association d'une culture cellulaire modèle, d'une bonne connaissance de la physiologie et des techniques « omics » peut conduire en toxicologie à des applications biotechnologiques de la plus grande utilité pour l'industrie chimique et pharmaceutique.

## Mots-clés

**Toxicologie, spermatogenèse, culture cellulaire, physiologie, cytologie, transcriptomique, métabolomique, xénobiotiques.**

## Abstract

### Alternative approaches for testicular toxicity

Severe impairment of parameters related to male fertility is observed in Europe and in industrialized countries, related to increased environmental toxicants. Currently the regulatory tests to detect the impact of chemicals on reproduction require a large number of laboratory animals. For ethical, economic and public health reasons, it is urgent to find alternative tests using fewer animals, less expensive and faster. This article describes a methodology to divide by 20 the number of rodents needed for such studies, and thus the experimental time and cost. The authors, specialists of complementary techniques, offer a unique system made of rat seminiferous tubules in culture, mimicking the *in vivo* situation, and a battery of interacting cytophysiological and toxicogenomic analyses. The association of a cell culture model, a good knowledge of physiology and "omics" technology can lead to biotech applications in toxicology most useful for chemical and pharmaceutical industry.

## Keywords

**Toxicology, spermatogenesis, cell culture, physiology, cytology, transcriptomics, metabolomics, xenobiotics.**

Depuis environ cinq décennies, on observe une altération significative de la qualité du sperme dans les pays industrialisés. Selon une méta-analyse de 61 études réalisées dans le monde entier [1], le volume séminal et la concentration des spermatozoïdes de l'éjaculat ont diminué d'environ 50 % en cinquante ans. Parallèlement à l'altération des paramètres du sperme, d'autres pathologies génitales comme la cryptorchidie, l'hypospadias ou le cancer du testicule sont en constante augmentation en Europe et les autres pays industrialisés [1].

Ces troubles de la reproduction ont rapidement été associés à 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 une 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). Le rapport du « Joint Research Centre »

de la Commission européenne estime qu'environ 3 000 toxiques pour la reproduction et 2 000 toxiques pour le développement sont à tester. En même temps, il existe une forte pression sociale pour réduire le nombre d'animaux sacrifiés pour la réalisation des études toxicologiques et pour 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 classiques *in vivo* sont utilisés. Ces tests sont par ailleurs d'un intérêt limité pour la compréhension des mécanismes d'action des toxiques.

## Tests alternatifs aux tests sur animaux

### Une attente importante pour les besoins de REACH

Les cultures cellulaires constituent une alternative aux tests sur animaux ; elles permettent de s'affranchir des variabilités interindividuelles rencontrées *in vivo*, tout en épargnant de nombreuses vies animales. De plus, 90 % des animaux

utilisés pour les études de toxicologie (constituant 70 % des coûts de REACH) le sont pour la toxicologie de la reproduction. 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 en 2009 dans *Nature* par Thomas Hartung, « Toxicology for the twenty-first century » [2].

Une étude française récente de la Direction générale de la compétitivité de l'industrie et des services (Ministère de l'Économie, de l'Industrie et de l'Emploi) souligne la nécessité du « développement de nouveaux outils plus innovants et présentant une alternative pertinente aux tests sur animaux. » Ces tests alternatifs sont « une attente de nombreux acteurs industriels et prestataires de services. » Cependant, le nombre d'acteurs privés français reste limité du fait du faible nombre de prestataires développant des tests non normés OCDE [3].

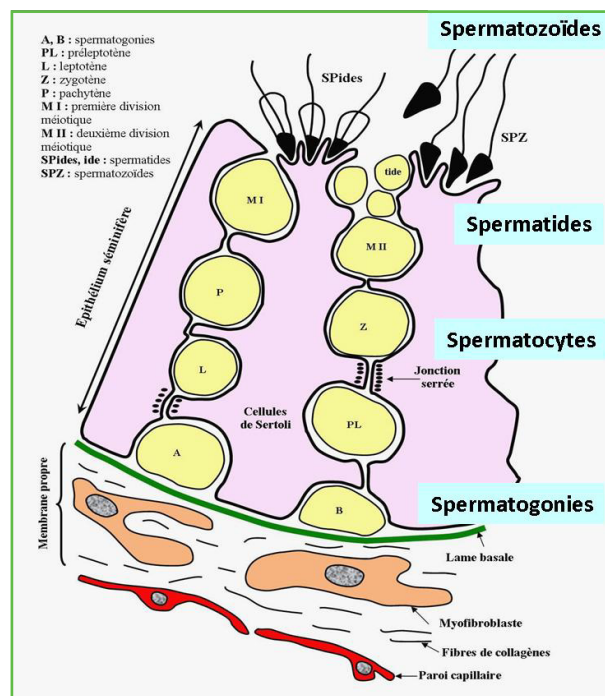
### Un modèle original de test toxicologique ex vivo

Or, dans une démarche qualifiée de « physiotoxicogénomique », le Laboratoire de génomique fonctionnelle de la reproduction, dirigé par Philippe Durand, situé dans l'Institut de génomique fonctionnelle de Lyon (UMR 5242 CNRS/INRA/UCBL/ENS), a développé un modèle original de la barrière hémato-testiculaire (BHT) *ex vivo*, associant en culture des cellules testiculaires germinales et des cellules de Sertoli<sup>(1)</sup> chez le rat. Ce modèle permet de maintenir les jonctions nécessaires entre les différents types cellulaires et de réaliser 80 % de la différenciation des cellules germinales mâles (spermatogenèse) sur quatre semaines de cultures. Il a été validé physiologiquement par de nombreuses publications résumées dans une revue récente par Durand *et coll.* [4].

Ce laboratoire étudie les perturbations induites sur les étapes clés de la spermatogenèse par des polluants de différentes natures mais susceptibles d'agir de façon autonome et/ou synergique dans l'organisme : métaux et produits chimiques, dont certains sont suspectés d'être des perturbateurs endocriniens. Une caractéristique importante de ce modèle *ex vivo* pour les études de toxicologie est sa sensibilité. Il est en effet en mesure de répondre à des quantités très faibles de substances toxiques, semblables à celles trouvées dans les liquides biologiques. Par ailleurs, il faut absolument éviter de tester des concentrations trop fortes, peu ou pas en lien avec la réalité, car elles peuvent générer des réponses faussement positives. En outre, ce modèle de co-culture permet la mise en œuvre des technologies globales de la toxicogénomique, afin d'aborder les aspects mécanistiques des toxiques environnementaux sur la durée, et notamment d'éventuels mécanismes de réparation difficiles à visualiser par des approches plus classiques. Ce modèle devrait ainsi constituer une percée méthodologique pour l'évaluation toxicologique des composés chimiques, sur une période de temps relativement longue.

### Un travail pluridisciplinaire

Pour ce faire, le Laboratoire de génomique fonctionnelle de la reproduction collabore avec Georges Pointis (équipe INSERM U895, Université de Nice), Odette Prat (Service de biochimie et de toxicologie nucléaire, CEA Marcoule), Marie-Roberte Guichaoua (Laboratoire de biologie de la reproduction, Hôpital de la Conception, Marseille) et Philippe Bulet (Laboratoire AGIM – AGeing Imaging Modeling –, BioPark d'Archamps). Ce consortium est né de la convergence stra-



Coupe d'un tube séminifère et différents stades de la spermatogenèse.

tégique entre des équipes maîtrisant des connaissances et des technologies complémentaires : un modèle original de cellules testiculaires en culture, la physiologie de la spermatogenèse, la transcriptomique et la protéomique<sup>(2)</sup>. Une batterie de tests a été mise en œuvre tels que des analyses de physiologie cellulaire, parmi lesquelles des analyses de la fonctionnalité de la barrière hémato-testiculaire (BHT), l'étude des modifications de l'expression des gènes transcrits, l'étude des perturbations cytogénétiques<sup>(3)</sup> induites, et l'étude des modifications du protéome des cellules et des milieux de culture sous l'effet des produits polluants, seuls ou en mélange. Ces études ont permis de faire émerger des gènes/peptides/métabolites altérés susceptibles de servir de support à des tests dédiés à la toxicologie de la reproduction, du type puce à oligonucléotides, tests PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR)<sup>(4)</sup> ou tests de détection de métabolites spécifiques.

Il convient de souligner que la connaissance du mode d'action des molécules étudiées peut également aider à déterminer, dans un deuxième temps, si les observations faites chez l'animal sont transposables à l'homme, ce qui demeure un problème majeur dans ce type d'étude [5].

Le caractère pluridisciplinaire de ces études mérite d'être souligné car ce type de partenariat n'a été que très rarement réalisé en toxicologie de la reproduction entre physiologistes, cytobiologistes, biochimistes et toxicologues, et en particulier avec l'apport des techniques « omics »<sup>(2)</sup> ou globales qui se prêtent à l'étude des mécanismes cellulaires et des échanges intercellulaires. De plus, ces techniques permettent enfin de pratiquer une biologie intégrée en fusionnant des disciplines jusque là étanches.

### Applications biotechnologiques

Enfin, l'aspect applicatif de ces recherches est la conception d'un outil de criblage automatisable, mentionné

plus haut, qui doit permettre à terme de diminuer drastiquement le nombre d'animaux nécessaires aux études de reproductologie (par un facteur 50) ainsi que le coût de ces études, mais aussi de générer une activité pérenne dans le secteur biotechnologique privé<sup>(5)</sup>.

Les gènes et métabolites déterminants pour l'altération de la spermatogenèse constituent une signature d'action de ces contaminants. De par l'éventail des xénobiotiques testés, différents par leur physico-chimie ainsi que par leurs mécanismes d'action dans l'organisme, un pool de biomolécules permet de « signer » une atteinte de la spermatogenèse. À terme, ce pool restreint de biomolécules sera intégré à un test automatisé en microplaque de mesure d'expression génique par PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR) et/ou un test de détection de métabolites spécifiques.

Ces tests, utilisant le modèle *ex vivo* décrit plus haut, pourraient constituer une alternative économique aux tests sur animaux pour cribler des centaines de produits chimiques dont il faudra déterminer, pour des raisons réglementaires, s'ils sont toxiques pour la fertilité masculine. Dans ce type de test, c'est plus précisément leur interaction avec la spermatogenèse qui pourra être élucidée.

### Notes et références

- (1) Les **cellules de Sertoli** se trouvent au sein des tubes séminifères des testicules ; leur principale fonction est de nourrir les futurs spermatozoïdes appelés spermatides.
- (2) Le terme **omics** désigne les méthodologies d'analyse globale d'un organisme, d'un tissu ou de cellules à un moment donné et dans un environnement donné, afin de déterminer la fonction de ses gènes. Il recouvre essentiellement la **transcriptomique**, c'est-à-dire l'analyse globale des ARN messagers ou transcrits présents qui transforment les gènes en protéines, la **protéomique**, qui décrit l'ensemble des protéines présentes, et la **métabolomique**, c'est-à-dire l'ensemble des petites molécules issues du métabolisme d'un organisme.
- (3) **Cytogénétique** : étude des phénomènes génétiques au niveau de la cellule, c'est-à-dire au niveau des chromosomes sans la nécessité d'extraire l'ADN ; en particulier anomalies chromosomiques (de nombre et de structure), recombinaison de chromosomes.
- (4) **qRT-PCR** (« **quantitative real time polymerase chain reaction** ») : méthode d'amplification de l'ADN qui a révolutionné la biologie moléculaire dans les années 1980 et permis l'étude des génomes à grande échelle.
- (5) Philippe Durand est à l'origine des co-cultures permettant d'étudier la barrière hémato-testiculaire (BHT) en chambre bicamérale. Il est le

co-fondateur, en mars 2012, de la start-up lyonnaise Kallistem qui sera dédiée à ces criblages ([www.kallistem.com](http://www.kallistem.com)).

- [1] Carlsen E., Giwercman A., Keiding N., Skakkebaek N.E., Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years, *Brit. Med. J.*, **1992**, *305*, p. 609.
- [2] Hartung T., Toxicology for the twenty-first century, *Nature*, **2009**, *460*, p. 208.
- [3] [www.industrie.gouv.fr/portail/chiffres/rapport-toxicologie-ecotoxicologie-2010.pdf](http://www.industrie.gouv.fr/portail/chiffres/rapport-toxicologie-ecotoxicologie-2010.pdf) (synthèse : [www.industrie.gouv.fr/portail/chiffres/synthese-toxicologie-ecotoxicologie-2010.pdf](http://www.industrie.gouv.fr/portail/chiffres/synthese-toxicologie-ecotoxicologie-2010.pdf)).
- [4] Perrard M.H. *et coll.*, Analyse de la spermatogenèse *ex vivo*. Application à l'analyse de la toxicité testiculaire [European regulation REACH and the assessment of testicular toxicity], *Médecine/Sciences*, **2010**, *26*, p. 305.
- [5] *Cancer : approche méthodologique du lien avec l'environnement*, Chap. 5: Environnement et cancer : apport de la toxicologie, Publication Inserm, **2005**, p. 43-50.



P. Durand

#### Philippe Durand

est directeur de recherche INRA, directeur scientifique de Kallistem\*.

**Odette Prat** (auteur correspondant)

est chercheur, spécialiste de toxicogénomique environnementale, à l'Institut de biologie environnementale et de biotechnologie, CEA Marcoule\*\*.



O. Prat

\* Kallistem, École Normale Supérieure de Lyon, 46 allée d'Italie, F-69364 Lyon Cedex 07.

Courriel : [philippe.durand@kallistem.com](mailto:philippe.durand@kallistem.com)  
[www.kallistem.com](http://www.kallistem.com)

\*\* Institut de biologie environnementale et de biotechnologie, Service de biochimie et de toxicologie nucléaire, CEA Marcoule, F-30207 Bagnols-sur-Cèze.

Courriel : [odette.prat@cea.fr](mailto:odette.prat@cea.fr)