

MODÈLES EXPÉRIMENTAUX : NOUVEAUX HORIZONS POUR LES MALADIES RARES ENDOCRINIENNES

MARDI
5 DÉCEMBRE
2023



Développement d'un modèle de culture de testicule foetal pour l'étude du développement gonadique

Dr Valeska Bidault PH, MD, PhD, FEAPU
HFME GHE, Hospices Civils de Lyon
Inserm U1208 SBRI
Université Claude Bernard Lyon 1

COLLOQUE RECHERCHE
FIRENDO - 7^{ème} ÉDITION -

MODÈLES EXPÉRIMENTAUX :
NOUVEAUX HORIZONS POUR
LES MALADIES RARES ENDOCRINIENNES

MARDI 5 DÉCEMBRE 2023

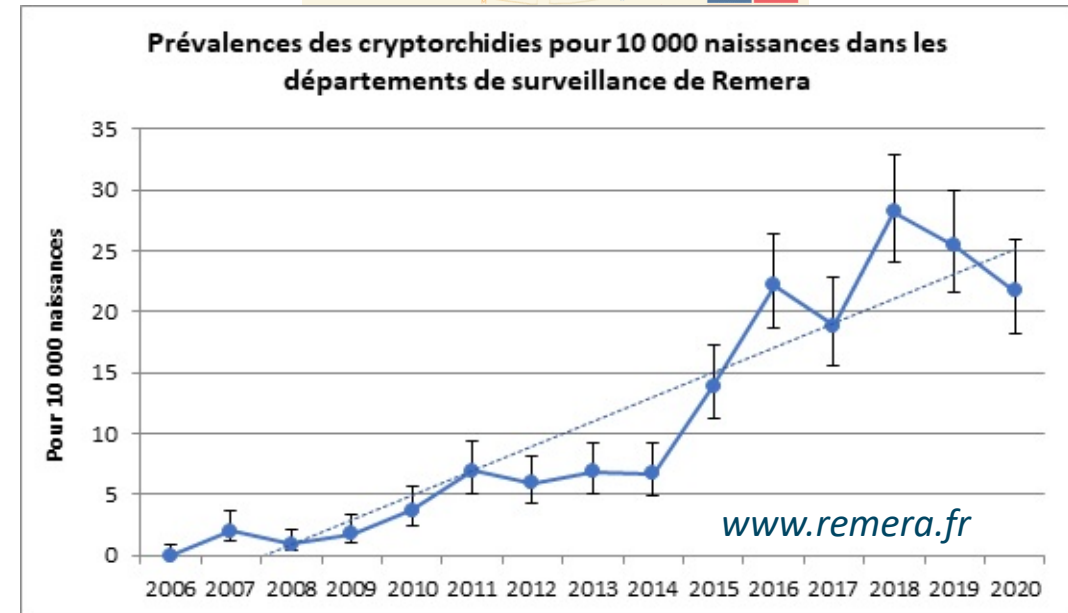
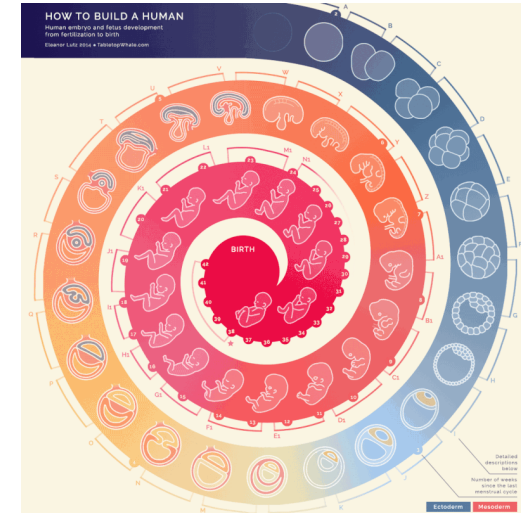


CONTEXTE DE LA RECHERCHE

DÉVELOPPEMENT TESTICULAIRE FŒTAL

- Augmentation prévalence des variations du développement génital (VDG) sur les 20 dernières années
- <20%: causes génétiques identifiées
- Concept de « syndrome de dysgénésie testiculaire »
 - Anomalies de migration testiculaire
 - Anomalies du développement génital
 - Baisse de la qualité du sperme et hypofertilité
 - Cancers (testicule, prostate,...)

=> Rôle des Perturbateurs endocriniens+++



Kalfa et al, Clin. Genet., 2019

Gaspari et al, Sex Dev., 2021

Skakkebaek et al, Nature Review Endocrinol., 2022

CONTEXTE DE LA RECHERCHE

LES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS : ENJEU DE SANTÉ PUBLIQUE



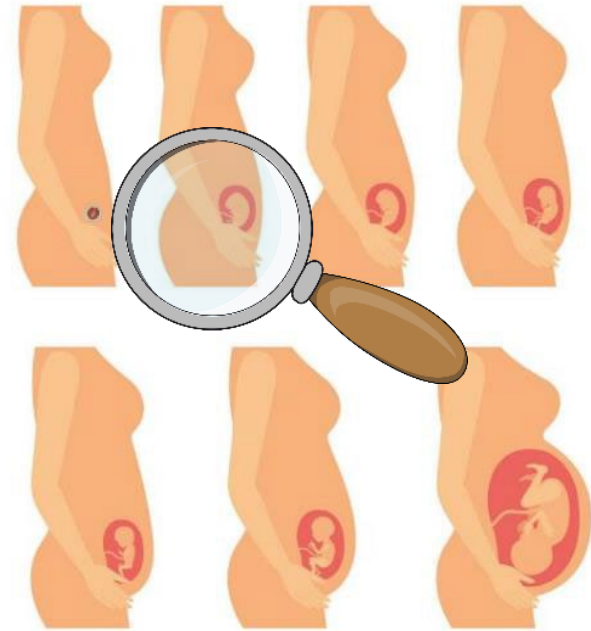
OMS 2012: substance ou un mélange de substances qui altère les fonctions du système endocrinien et, de ce fait, induit des effets nocifs sur la santé d'un organisme intact, de ses descendants ou de (sous)populations

- Largement présents dans l'environnement
- Sensibilité accrue chez les femmes enceintes, nourrissons, enfants
- Études difficiles :
 - demi-vie courte
 - relation dose-réponse non monotone
 - effet cocktail
 - Sensibilité variable selon les espèces



[Stratégie nationale sur les perturbateurs endocriniens](#)
[| Ministères Écologie](#)
[Énergie Territoires](#)
ecologie.gouv.fr

HYPOTHÈSE DE RECHERCHE



8^{ème} semaine de grossesse

15^{ème} semaine de grossesse

Fenêtre de développement du testicule foetal

Exposition à des produits phytosanitaires (PP) ou perturbateurs endocriniens (PE) pendant la grossesse

→ Impact sur développement testiculaire foetal > Dysgénésie testiculaire > VDG?

OBJECTIFS DE LA RECHERCHE



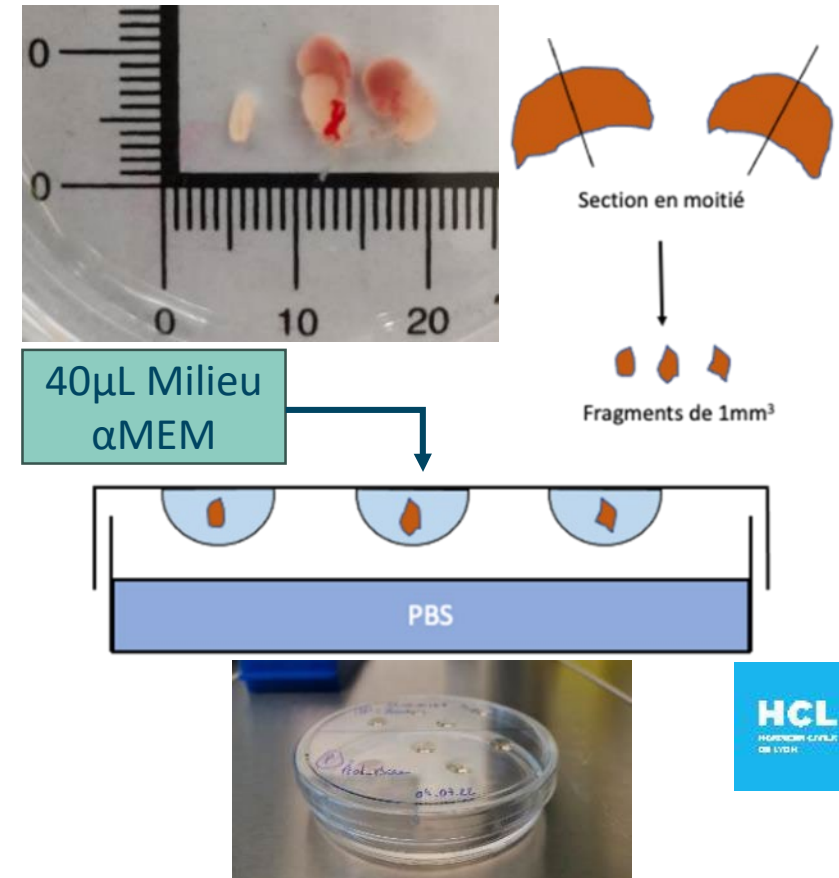
- **But de la recherche:** étudier l'impact de PP ou PE identifiés ou supposés durant la fenêtre critique du développement testiculaire foetal sur la santé génitale et gonadique masculines
- **Approches**
 - 1- Développer une méthode d'étude de la gonade foetale
 - 2- Recenser les expositions maternelles à risque pendant la grossesse
 - 3- Evaluer le passage transplacentaire de PP ou PE au cours du développement testiculaire foetal
 - 4- Mettre à jour les référentiels de mesure des organes génitaux externes masculins et développer les outils d'évaluation de la qualité du tissu testiculaire néonatal

MATÉRIELS ET MÉTHODES

DÉVELOPPER MÉTHODE ÉTUDE GONADE FŒTALE: CULTURE EN HANGING DROPS

(MASTER2 G. SCHNEIDER, AO JC HCL L. RENAULT)

- Echantillons foétaux 8-16 SA:
 - Parcours en orthogénie, après consentement écrit des patientes
 - Dissection surrénales et testis à l'état frais, puis morcellement en fragments de 1mm³ pour culture
- Culture en hanging drop dans milieu avec ou sans stimulation hormonale (*Melau et al, J Clin Endocrinol Metab, 2021*)
- Dosages stéroïdes dans liquide de culture, RNA seq, histologie, immuno-marquage...
- Congélation protocoles PMA pour conservation de tissus



MATÉRIELS ET MÉTHODES

RECENSER LES EXPOSITIONS MATERNELLES À RISQUE PENDANT LA GROSSESSE

- Questionnaire ciblé sur les expositions maternelles pendant la grossesse
 - Professionnelle
 - Domestique
 - Environnementale
- Corrélation phénotype et données épidémiologiques sur région AuRA (registre REMERA)



Hypospadias and Environment : a Case-Control Study

Lucas Michon*, Elisabeth Gnansia*, Ludivine de Brosses*, Sourour Addad*, Catherine Cuoq*,
Véronique Dimper*, Emmanuelle Amar*

*Registre des Malformations en Rhône-Alpes, REMERA
lucas.michon@remera.fr
www.remera.fr



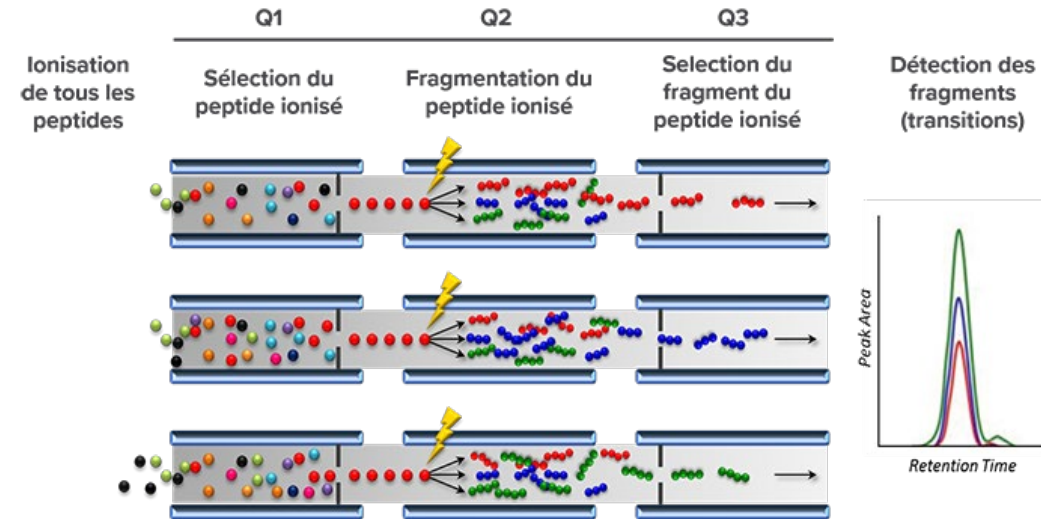
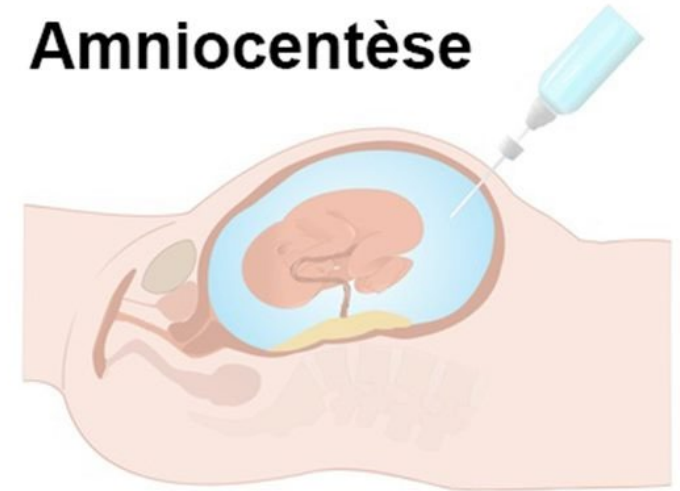
=> AAP PHRC-I 11/2023 GENITAuRA

MATÉRIELS ET MÉTHODES

EVALUER LE PASSAGE TRANSPLACENTAIRE DE PP
OU PE AU COURS DU DÉVELOPPEMENT
TESTICULAIRE FŒTAL

- Laboratoires BRGM INRAE/ ISA (UCBL1)
- Etude de l'exposome fœtal
- Dosage en spectrométrie de masse
 - PP ou PE supposés ou validés, virus...
 - Liquides amniotiques dans cadre de PLA précoces <22SA

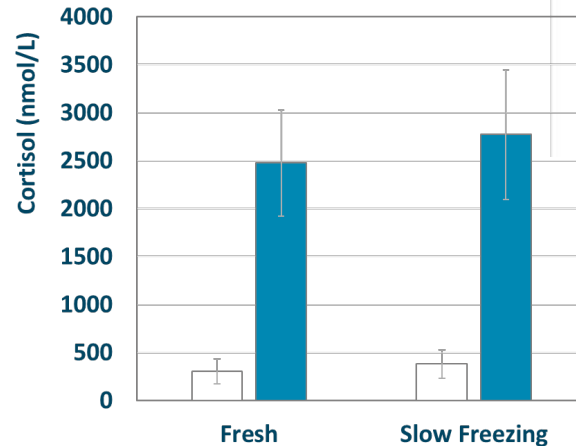
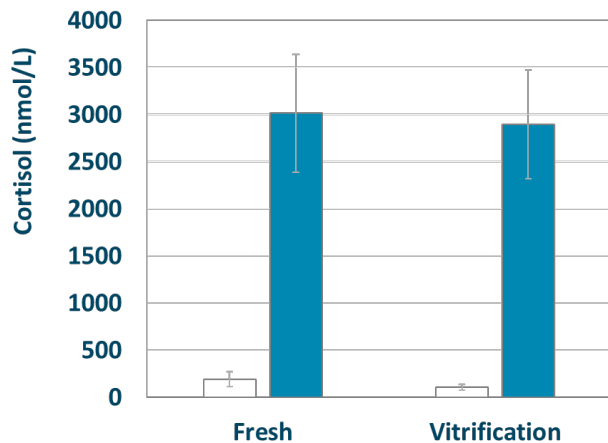
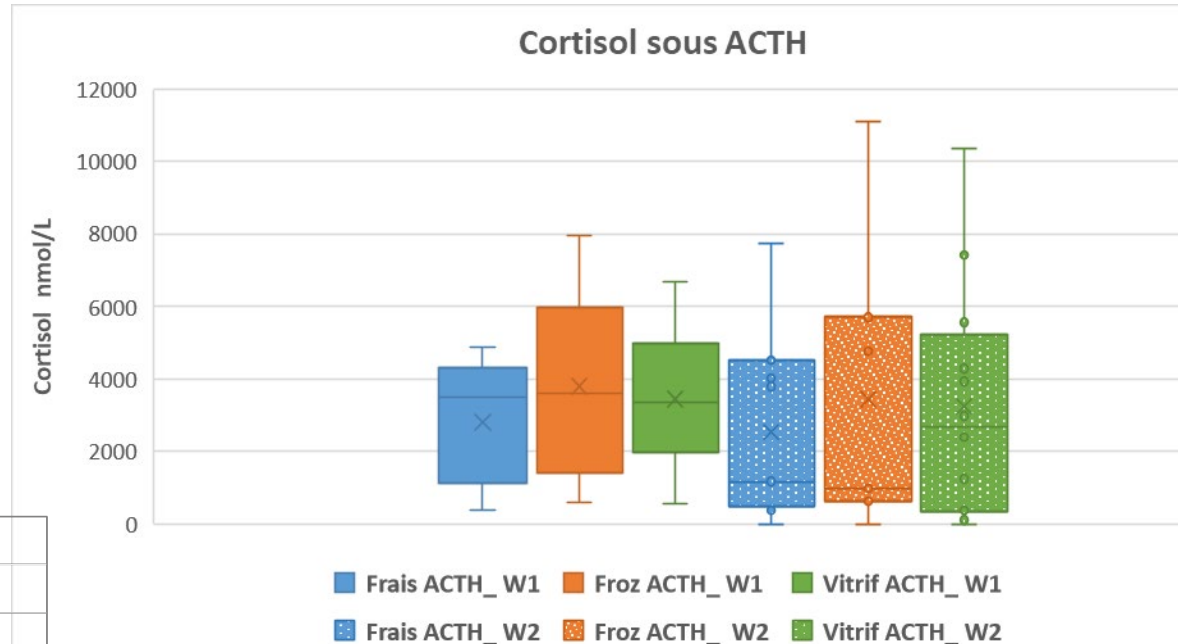
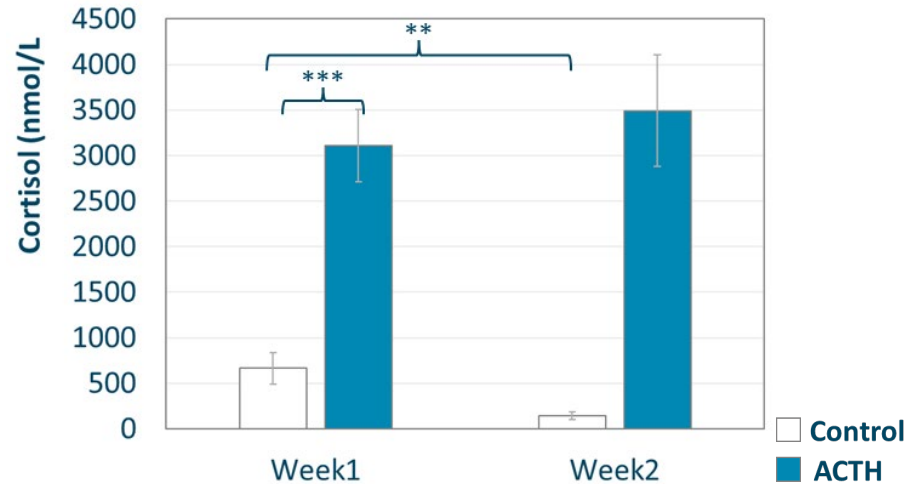
Amniocentèse



RÉSULTATS PRÉLIMINAIRES : LE MODÈLE D'ÉTUDE

FONCTIONS SÉCRÉTOIRES SURRÉNALIENNES MAINTENUES EN CULTURE

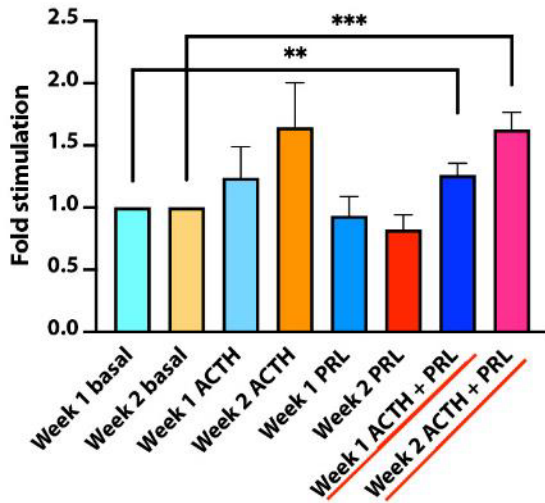
(M2 G. SCHNEIDER, PHD L. RENAULT)



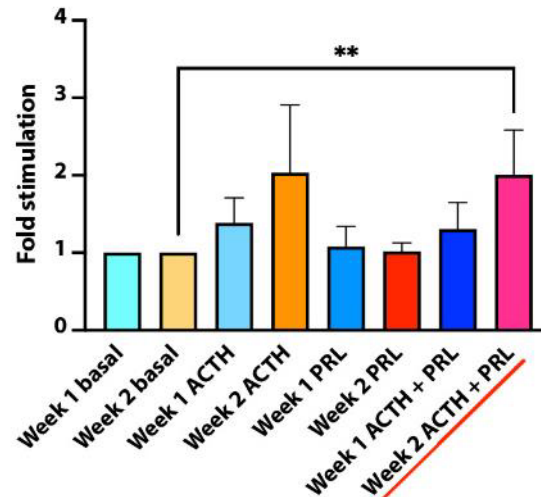
RÉSULTATS PRÉLIMINAIRES : LE MODÈLE D'ÉTUDE

RÔLE TROPHIQUE DE LA PROLACTINE SUR LA ZONE FŒTALE SURRÉNALIENNE?

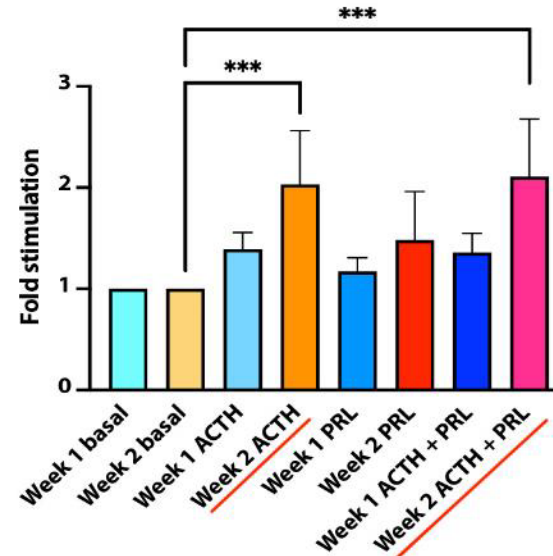
DHEAS 10^5 nM



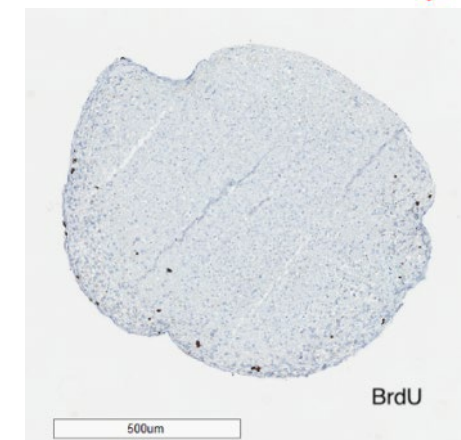
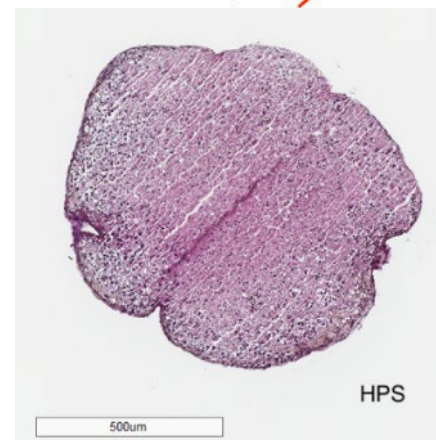
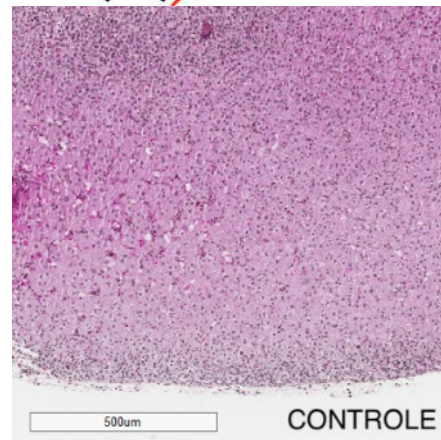
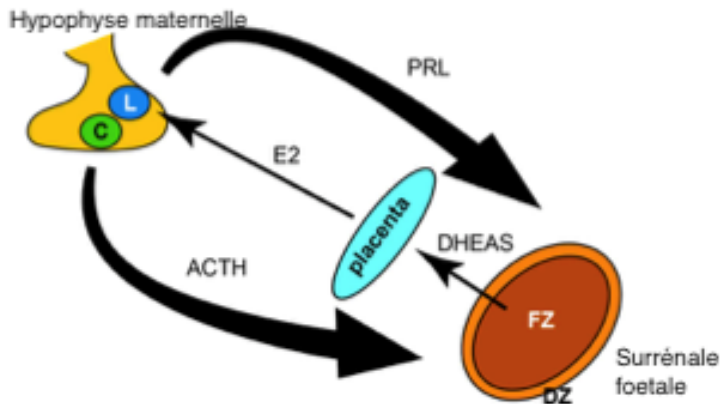
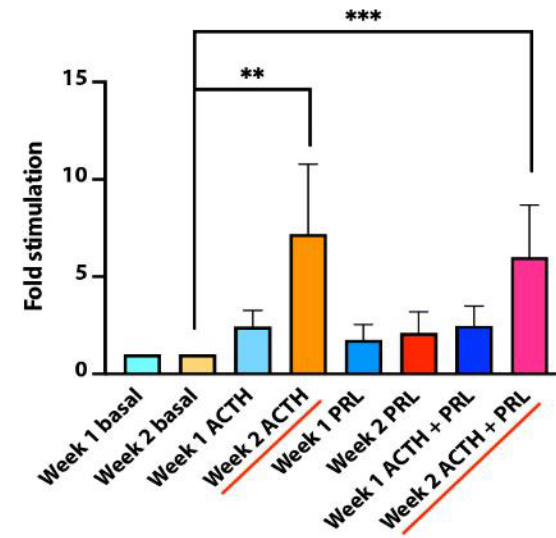
Androstenedione (D4)
50 nM



Cortisone 10^2 nM

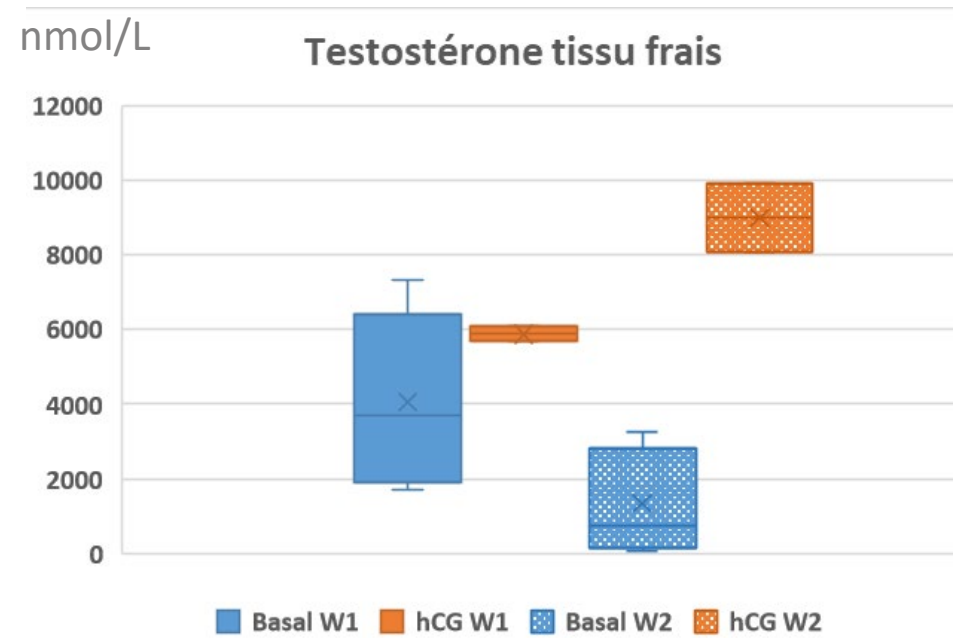
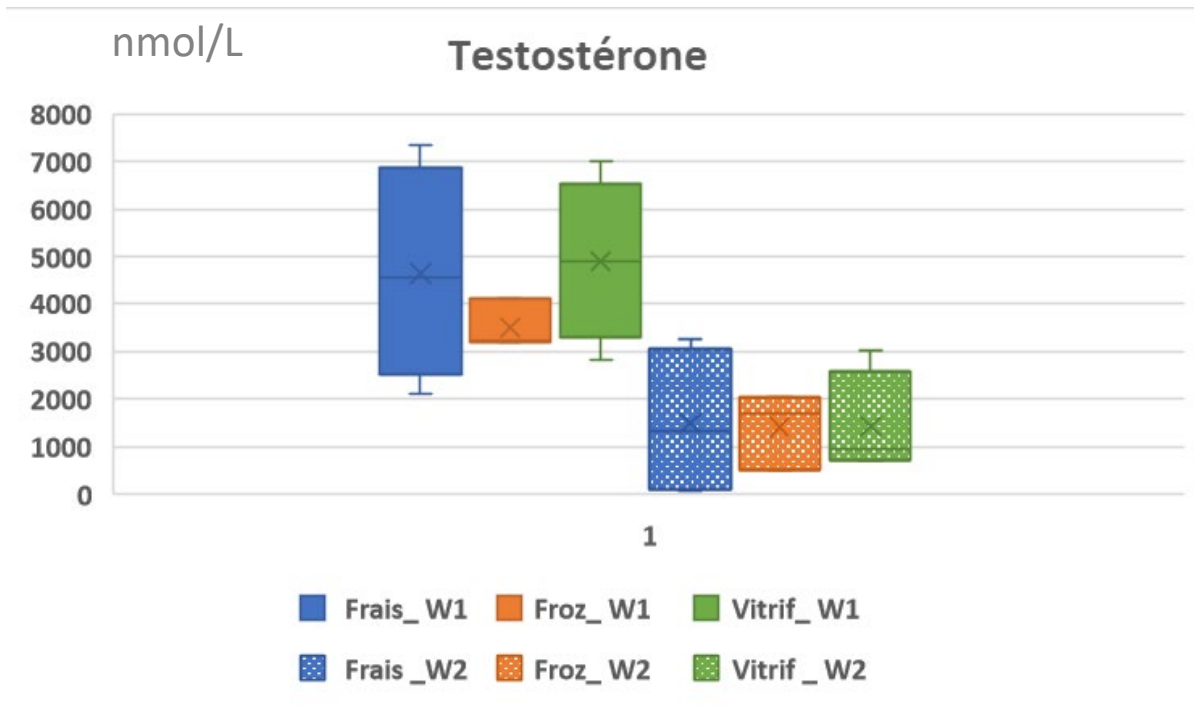


Cortisol 10^3 nM



RÉSULTATS PRÉLIMINAIRES

CULTURE TESTICULAIRE: HCG SOUTIENT LA SÉCRÉTION DE TESTOSTÉRONE SUR 14 JOURS (PHD L. RENAULT, V. BIDAULT, I. PLOTTON)

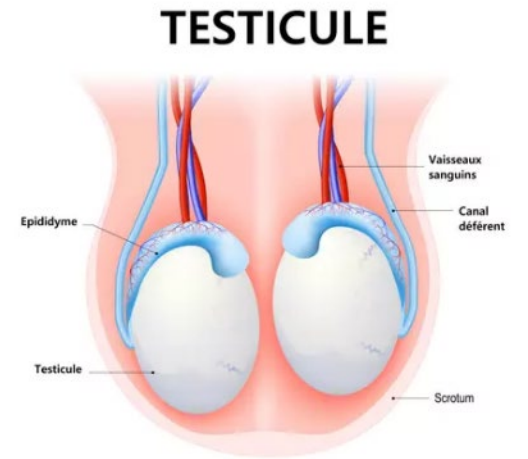


hCG 0.1UI/ μ L dans milieu de culture

CONCLUSION

UN MODÈLE DE CULTURE ENCOURAGEANT

- Modèle fiable pour une culture organotypique
- Reproductible
- Caractérisation du développement gonadique humain
- Exploitable pour le screening moléculaire: durée?
- Intérêt de la méthode de congélation des tissus: PMA?



PERSPECTIVES DE RECHERCHE

PROJET ECOFERTI *(EN COURS, PHD/AO JC HCL L. RENAULT)*



- AAP Jeune Chercheur HCL 2022, *Dr Lucie Renault*
- Effets potentiels de 5PP identifiés lors du projet PestiFERTI *(financement plan EcoPhyto II, J. Dupont INRAE Tours)*
- Comparaison 5PP/ cyclophosphamide sur cultures testiculaires
- Critère jugement principal:
 - nombre de cellules germinales pré/post-exposition

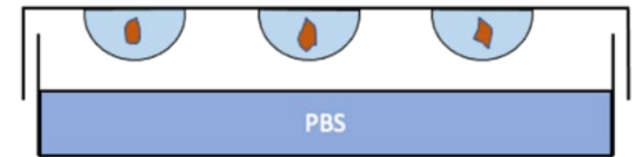


PERSPECTIVES DE RECHERCHE

CARACTÉRISATION DU MODÈLE DE CULTURE TESTICULAIRE

(M1 A. ZARLI, M2 T.D. PHAM), V. BIDAULT, I. PLOTTON)

- Stimulation hormonale : hCG
- Etude modifications épi-génétiques au cours de la culture
=> suivi méthylation de l'ADN par immuno-marquage
- RNA sequencing pour expression de gènes cibles
 - Développement testiculaire
 - Stéroïdogénèse testiculaire
=> Transcriptome 3D? (Dr Nathalie Beaujean, INRAE)
- Caractérisation histologique et cellulaire des tissus cultivés



PERSPECTIVES DE RECHERCHE

METTRE À JOUR LES RÉFÉRENTIELS DE MESURE DES ORGANES GÉNITAUX EXTERNES MASCULINS
ELABORER DE NOUVEAUX INDICATEURS DE QUALITÉ DU TISSU TESTICULAIRE

ETUDE GENITAURA (*V. BIDAULT, I. PLOTTON*)

- **Dépôt AAP PHRC-I 11/2023**

- Améliorer la caractérisation des VDG: réactualisation normes de taille OGE masculins
- Elaborer de nouveaux outils d'évaluation du tissu testiculaire: dosages AMH et INSL3 sur sang de cordon (CBPE)
- CHU et CHG région AuRA et Bourgogne Franche-Comté
+ 2 cliniques lyonnaises

PERSPECTIVES DE RECHERCHE

ETUDE GENITOX: PASSAGE TRANS-PLACENTAIRE DES PP/PE

(V. BIDAULT, I. PLOTTON)

- **AAP Anses 12/2023**
- Caractérisation de l'exposome des fœtus au cours de la période cible du développement testiculaire (partenariat ISA, Dr Yohann Clément)
- Détection en spectrométrie de masse de PP/PE sur liquides amniotiques de PLA « précoces » (avant 22 SA)
- Corrélation registre national des cancers testiculaires (source INCCa)



MERCI

Inserm

La science pour la santé
From science to health



CENTRE DE RÉFÉRENCE DU
DÉVELOPPEMENT GÉNITAL
DU FŒTUS À L'ADULTE



SBRI



Stem-cell & Brain
Research Institute

Lyon

CiC

Centre d'investigation Clinique
L Y O N

HCL

HOSPICES CIVILS
DE LYON