



HAL
open science

Déterminer les mécanismes par lesquels les perturbateurs endocriniens altèrent le développement neurologique en utilisant des organoïdes de cerveau humain, ou “ mini-cerveaux ”

Khalfallah Olfa, Cinquanta Guillaume

► **To cite this version:**

Khalfallah Olfa, Cinquanta Guillaume. Déterminer les mécanismes par lesquels les perturbateurs endocriniens altèrent le développement neurologique en utilisant des organoïdes de cerveau humain, ou “ mini-cerveaux ”. *Les Cahiers Espace, Environnement, Risques et Résilience*, 2024, 1. hal-04400001

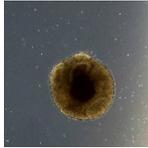
HAL Id: hal-04400001

<https://hal.science/hal-04400001>

Submitted on 18 Jan 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

*Highlight***Déterminer les mécanismes par lesquels les perturbateurs endocriniens altèrent le développement neurologique en utilisant des organoïdes de cerveau humain, ou « mini-cerveaux »**

D'après les travaux issus du projet NEUROPOL soutenu par l'Académie 3, Université Côte d'Azur :

KHALFALLAH Oifa, CINQUANTA Guillaume

Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire (IPMC),

Université Côte d'Azur, CNRS, UMR7275, 660 route des Lucioles, 06560 Valbonne, France

Contexte général

Nous sommes constamment exposés à une multitude de composés chimiques présents dans les produits du quotidien tels que les plastiques, détergents, cosmétiques, médicaments et même notre alimentation. Plusieurs centaines de ces produits chimiques sont des perturbateurs endocriniens (PE), c'est à dire des substances exogènes, naturelles ou synthétisées par l'industrie chimique, qui reproduisent les caractéristiques des hormones naturellement présentes dans le corps, perturbant ainsi l'équilibre physiologique du système hormonal. Les hormones jouant un rôle clé sur le développement et le fonctionnement des organes, les PE peuvent avoir un effet délétère non seulement sur l'individu qui est exposé mais également sur sa descendance. De nombreux travaux ont montré que l'exposition à ces PE augmente le risque de problèmes de croissance, malformations génitales, stérilité, puberté précoce, cancers hormono-dépendant (sein, prostate, cerveau) obésité, diabète (1), et plus récemment, de troubles du neurodéveloppement (TND) (2-4). Les TND résultent de perturbations lors de la formation du cerveau pendant la grossesse, altérant le fonctionnement cognitif et/ou affectif de l'enfant. Les TND, qui touchent environ 10% des enfants, regroupent des pathologies diverses comme les Troubles du Spectre de l'Autisme (TSA), les Troubles Envahissants du Développement (TED), les Troubles avec Déficit de l'Attention avec ou sans Hyperactivité (TDAH) ou encore la déficience intellectuelle. Malgré ces données et face au lobbying des industriels, la réglementation sur l'utilisation des PE reste insuffisante pour protéger la population.

Le projet NEUROPOL vise à analyser les effets des PE sur le neurodéveloppement humain et ainsi déterminer les liens entre PE et TND afin de mieux réglementer leur utilisation et protéger la population.

Le point sur la réglementation actuelle

Pour être considéré comme un PE, un produit chimique doit produire un effet néfaste qui doit être une conséquence biologiquement plausible d'une altération de la fonction endocrinienne. L'évaluation de ces effets néfastes sur la population se fait en 2 temps : par des études épidémiologiques puis sur des modèles cellulaires et / ou animaux. Les études épidémiologiques analysent la fréquence des pathologies en lien avec l'exposition à un facteur donné, dans ce cas les PE. Ces analyses sont réalisées sur des groupes d'individus représentatifs de la population générale appelés cohortes, et combinent des informations issues de questionnaires, médicales et d'analyses biologiques. Ainsi, des

études épidémiologiques ont démontré que les enfants nés de femmes ayant été exposées à des PE pendant la grossesse ont un risque accru de présenter des altérations du développement neurologique et des anomalies comportementales. Cependant, ce type d'études ne permet pas de rendre compte de l'exposition simultanée à plusieurs PE (effet cocktail) dont l'effet cumulé peut être supérieur à celui des PE pris isolément (5) De plus, l'effet délétère des PE peut se manifester plusieurs années après l'exposition initiale, ce qui rend complexe l'étude des liens de causalité entre les PE et la pathologie humaine. Par conséquent, même si les études épidémiologiques constituent la base pour identifier les effets délétères des PE sur la santé humaine, elles ne sont généralement pas suffisantes pour réglementer l'utilisation des PE. Pour cela, il est indispensable de compléter ces études par l'analyse des effets des PE sur les fonctions biologiques en utilisant des modèles cellulaires et / ou animaux. En Europe, les essais réglementaires pour évaluer les effets des PE sur le développement neuronal reposent essentiellement sur l'expérimentation chez l'animal, majoritairement des rongeurs, complétés par des études sur des modèles cellulaires. Ces résultats ont ainsi conduit la Commission Européenne à prendre en compte les PE dans le règlement REACH (Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals) qui impose une évaluation des risques pour la santé humaine et l'environnement pour les substances chimiques enregistrées (règlement n°1907/2006 du 18 décembre 2006). Cependant, les tests utilisés pour la réglementation présentent des limites. En effet, la formation et la structure du cerveau humain sont beaucoup plus complexes que celles des autres espèces. Ainsi, il est de plus en plus évident que les études portant sur les animaux de laboratoire couramment utilisés ne peuvent ni modéliser complètement le neurodéveloppement humain ou les TND, ni prédire de manière fiable les effets des PE à cause de processus toxicodynamiques distincts, limitant la pertinence des résultats obtenus. Par conséquent, il est fort possible que des PE qui n'ont pas d'effet mesurable chez l'animal perturbent quand même le neurodéveloppement chez l'Homme. Ces modèles ne sont donc pas pertinents pour prédire les effets sur la santé humaine. De plus, ces analyses sont longues et coûteuses limitant considérablement le nombre de PE testés, et l'utilisation de plusieurs centaines de molécules restent non réglementée. Il est donc urgent de développer des stratégies qui intègrent plusieurs modèles *in vivo*, *in vitro* et *in silico* pour générer de nouvelles connaissances pertinentes pour le développement neurologique et la santé humaine.

Etude sur le cerveau humain : les organoïdes cérébraux

Un grand nombre d'analyses reposent soit sur l'utilisation de modèles animaux, soit de modèles cellulaires humains cultivés en mono-couches (en 2D) qui ne permettent pas de recréer les interactions multicellulaires complexes tri-dimensionnelles qui se produisent dans le cerveau, limitant considérablement l'étude du neurodéveloppement humain. Toutefois, la capacité des cellules souches pluripotentes embryonnaires ou induites (iPSC : *induced pluripotent stem cells*) à s'autoorganiser en trois dimensions et à se différencier *in vitro* dans tous les types de cellules qui composent un organisme adulte a permis une avancée majeure dans le domaine. Ces cellules sont utilisées pour générer des organoïdes cérébraux humains qui reproduisent le développement en 3D de certaines régions du cerveau en préservant les interactions fonctionnelles complexes entre les différentes populations cellulaires : neurones, astrocytes et oligodendrocytes. Ainsi, il est possible de modéliser la formation du cortex humain, région du cerveau qui contrôle les fonctions cognitives supérieures telles que le langage, le raisonnement, l'apprentissage, les émotions ou l'intelligence, altérées dans les TND. Le cortex humain se forme à partir de progéniteurs neuraux selon un processus extrêmement bien contrôlé dans le temps et dans l'espace. Après des étapes de prolifération et différenciation, les neurones GABAergiques inhibiteurs issus de la partie ventrale du cortex migrent vers le cortex dorsal, à l'origine des neurones glutamatergiques excitateurs, et s'interconnectent pour former un réseau fonctionnel (Fig. 1 panneau supérieur). Dans le cadre du projet NEUROPOL, nous avons modélisé toutes ces étapes en cultivant des iPSCs dans différents milieux de manière à obtenir des organoïdes

corticaux dorsaux (6) et des organoïdes corticaux ventraux (7). Les organoïdes dorsaux et ventraux sont ensuite cultivés ensemble de manière à former des assemblages, permettant la migration des interneurons GABAergiques de l'organoïde ventral vers l'organoïde dorsal afin de générer un réseau neuronal fonctionnel. Nous avons analysé ces différentes étapes par des analyses morphologiques (taille/morphologie des organoïdes), moléculaires en utilisant des marqueurs spécifiques de la prolifération et des différentes populations cellulaires (RT-PCR, immunofluorescence avec imagerie confocale et par feuillet de lumière) et fonctionnelles (électrophysiologie par patch clamp). Nos résultats montrent que les organoïdes cérébraux que nous avons générés récapitulent bien la formation du cortex cérébral humain (Figure 1 panneau inférieur), ce qui en fait à l'heure actuelle le meilleur modèle pour étudier la formation du cortex humain.

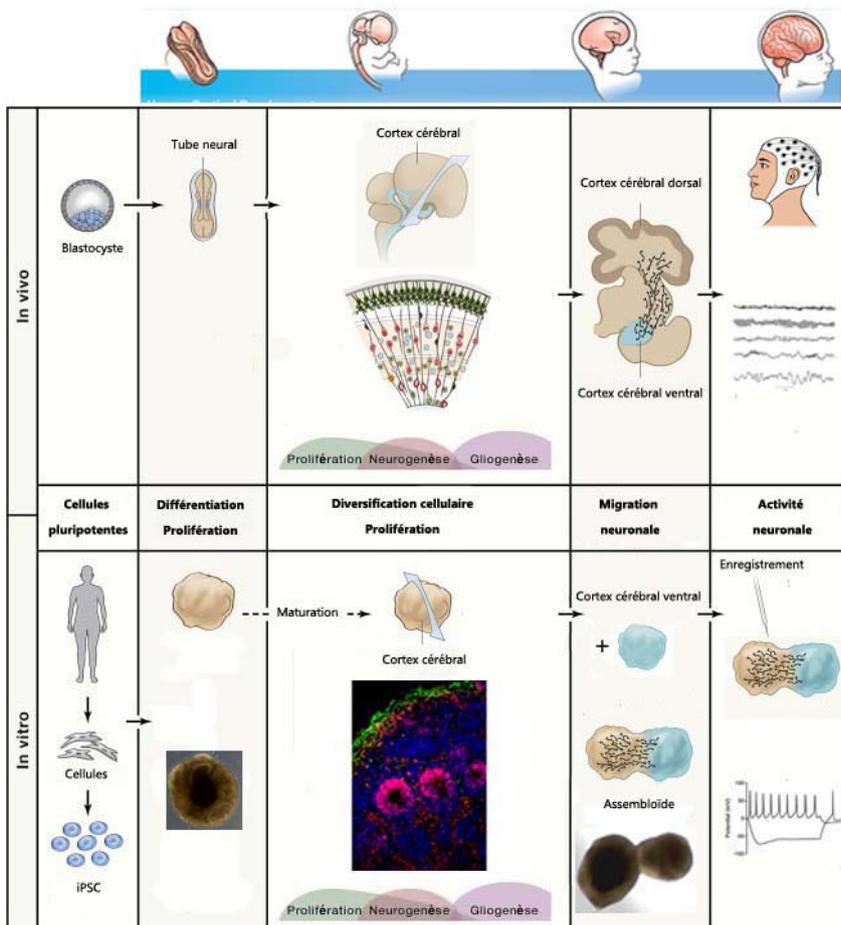
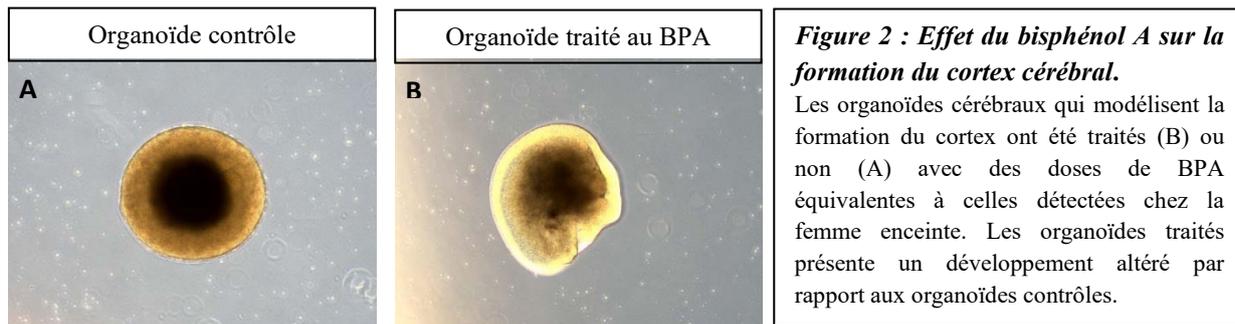


Figure 1 : Modélisation de la formation du cerveau humain à l'aide d'organoïdes cérébraux.

Panneau supérieur : étapes clés du développement du cortex humain. Après la conception, les cellules du tube neural prolifèrent et se différencient pour générer des neurones qui migrent et se connectent pour former un réseau fonctionnel. L'activité neuronale, qui reflète la fonction cérébrale, est mesurée par des enregistrements électrophysiologiques. Toutes ces étapes sont récapitulées dans les organoïdes cérébraux et sont analysables par des tests que nous avons développés (panneau inférieur).

Le projet NEUROPOL a pour but d'utiliser le modèle des organoïdes cérébraux pour évaluer les effets des PE de la famille des phénols : bisphénol A (BPA), F et S, triclosan et parabènes, qui sont presque systématiquement détectés chez les femmes enceintes (8) et sont associés à un risque accru de TND chez les enfants d'après des études épidémiologiques (2-4, 8). Nos premiers résultats montrent que l'exposition des organoïdes cérébraux à des doses de BPA correspondant aux taux détectés chez la femme enceinte induit une désorganisation qui pourrait être à l'origine d'anomalies de la formation du cortex chez l'enfant, en lien avec les TND (Figure 2). Ces résultats démontrent donc que les doses auxquelles nous sommes exposés quotidiennement ne sont pas sans danger et témoignent de la nécessité d'étudier les effets des PE auxquels à l'aide d'un modèle adéquat.



Actions et retombées du projet

Les PE représentent une grave préoccupation pour la santé des générations actuelles et futures et pour l'environnement, ainsi qu'une charge sociale, familiale et psychologique dont le coût annuel est estimé en Europe entre 150 et 260 milliards d'Euros par an (soit entre 1.2% et 2% du PIB) (9). Il est donc urgent d'agir pour réduire l'exposition aux PE, la meilleure façon d'y parvenir étant d'adopter une réglementation. En élucidant les effets concrets des PE sur des organoïdes de cerveaux humains, le projet NEUROPOL permettra de disposer de données scientifiques fiables concernant l'effet de ces molécules sur la santé mentale des enfants, et ainsi de permettre une meilleure réglementation de l'usage de ces polluants. Par ailleurs, dans la mesure où l'exposition aux PE est omniprésente, chaque personne et chaque enfant né aujourd'hui a en permanence des dizaines de produits chimiques dans son sang. L'exposition multiple aux PE peut entraîner des effets additifs ou synergiques, appelés effets cocktails, très peu étudiés jusqu'à présent. Enfin, contrairement aux idées reçues, la dose ne fait pas le poison. En effet, à faible dose, les PE peuvent se révéler plus dangereux qu'à des doses plus élevées. Ainsi, le modèle des organoïdes cérébraux développé dans le cadre du projet NEUROPOL permettra de déterminer les effets des PE seuls, ou en mélange, et à différentes doses.

En plus des industriels et des pouvoirs publics, ce projet s'adresse à la société civile à qui il appartient de se saisir des preuves scientifiques de la dangerosité et de la toxicité des polluants que le projet mettra en avant. En sensibilisant le public, ces travaux ont pour but d'inciter les consommateurs à modifier leurs gestes quotidiens pour réduire leur exposition aux PE, notamment en consommant les produits issus de l'agriculture biologique ou en privilégiant l'utilisation de produits écologiques pour les produits d'entretien.

Références

1. **Kahn LG, Philippat C, Nakayama SF, Slama R, Trasande L.** Endocrine-disrupting chemicals: implications for human health. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2020 Aug;8(8):703-718. doi: 10.1016/S2213-8587(20)30129-7. PMID: 32707118; PMCID: PMC7437820.
2. **C. Cheroni, N. Caporale, G. Testa,** Autism spectrum disorder at the crossroad between genes and environment: contributions, convergences, and interactions in ASD developmental pathophysiology. *Mol. Autism.* **11**, 69 (2020).
- 3 **Braun JM.** Early-life exposure to EDCs: role in childhood obesity and neurodevelopment. *Nat Rev Endocrinol.* 2017 Mar;13(3):161-173. doi: 10.1038/nrendo.2016.186. Epub 2016 Nov 18. PMID: 27857130; PMCID: PMC5322271.
- 4 **Rivollier F, Krebs MO, Kebir O.** Perinatal Exposure to Environmental Endocrine Disruptors in the Emergence of Neurodevelopmental Psychiatric Diseases: A Systematic Review. *Int J Environ Res Public Health.* 2019 Apr 12;16(8):1318. doi: 10.3390/ijerph16081318. PMID: 31013727; PMCID: PMC6517937.

- 5 **A. Kortenkamp**, Low dose mixture effects of endocrine disrupters and their implications for regulatory thresholds in chemical risk assessment. *Curr. Opin. Pharmacol.* **19**, 105–111 (2014).
- 6 **Paşca AM, Sloan SA, Clarke LE, Tian Y, Makinson CD, Huber N, Kim CH, Park JY, O'Rourke NA, Nguyen KD, Smith SJ, Huguenard JR, Geschwind DH, Barres BA, Paşca SP.** Functional cortical neurons and astrocytes from human pluripotent stem cells in 3D culture. *Nat Methods.* 2015 Jul;12(7):671-8. doi: 10.1038/nmeth.3415. Epub 2015 May 25. PMID: 26005811; PMCID: PMC4489980.
- 7 **Birey F, Andersen J, Makinson CD, Islam S, Wei W, Huber N, Fan HC, Metzler KRC, Panagiotakos G, Thom N, O'Rourke NA, Steinmetz LM, Bernstein JA, Hallmayer J, Huguenard JR, Paşca SP.** Assembly of functionally integrated human forebrain spheroids. *Nature.* 2017 May 4;545(7652):54-59. doi: 10.1038/nature22330. Epub 2017 Apr 26. PMID: 28445465; PMCID: PMC5805137.
- 8 **Philippat C, Nakiwala D, Calafat AM, Botton J, De Agostini M, Heude B, Slama R;** EDEN Mother–Child Study Group. Prenatal Exposure to Nonpersistent Endocrine Disruptors and Behavior in Boys at 3 and 5 Years. *Environ Health Perspect.* 2017 Sep 15;125(9):097014. doi: 10.1289/EHP1314. Erratum in: *Environ Health Perspect.* 2018 Dec;126(12):129001. PMID: 28937960; PMCID: PMC5915182.
- 9 **Trasande L, Zoeller RT, Hass U, Kortenkamp A, Grandjean P, Myers JP, DiGangi J, Bellanger M, Hauser R, Legler J, Skakkebaek NE, Heindel JJ.** Estimating burden and disease costs of exposure to endocrine-disrupting chemicals in the European union. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015 Apr;100(4):1245-55. doi: 10.1210/jc.2014-4324. Epub 2015 Mar 5. PMID: 25742516; PMCID: PMC4399291.