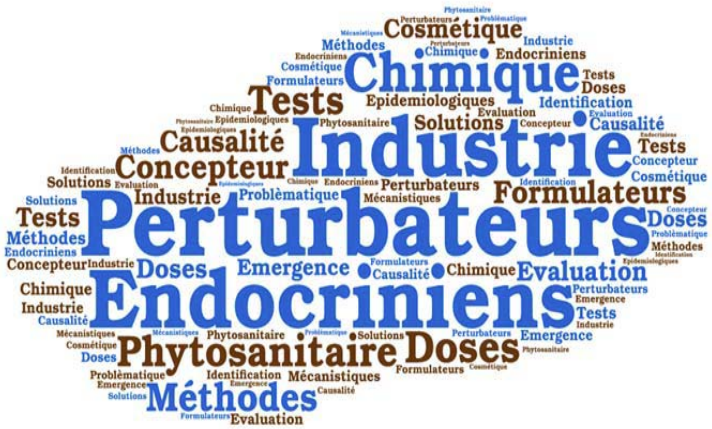
Fondation de la Maison de la Chimie



Stratégie des tests toxicologiques Tests OCDE et détermination des Faibles Doses.

Alain LOMBARD

Allotoxconsulting

allotoxconsulting@yahoo.fr

Les Méthodes de Détection des PE

- **Les méthodes « in silico » ou cristallographiques :**

  * QSARs et Modélisation de la liaison du ligand au récepteur.
- **Les méthodes In Vitro Biochimiques/Mécanistiques :**

  * Liaison à une protéine de transport, à une enzyme, à un Récepteur, et

  * Liaison d'un coactivateur ou un corépresseur à un récepteur
- **Les méthodes In Vitro Cellulaires :**

  * Expression de gènes naturels (protéines, enzymes, réponse cellulaire) et

  * Expression de gènes rapporteurs (β-galactosidase, luciférases).
- **Les méthodes « In organo » (Cultures organotypiques) :**

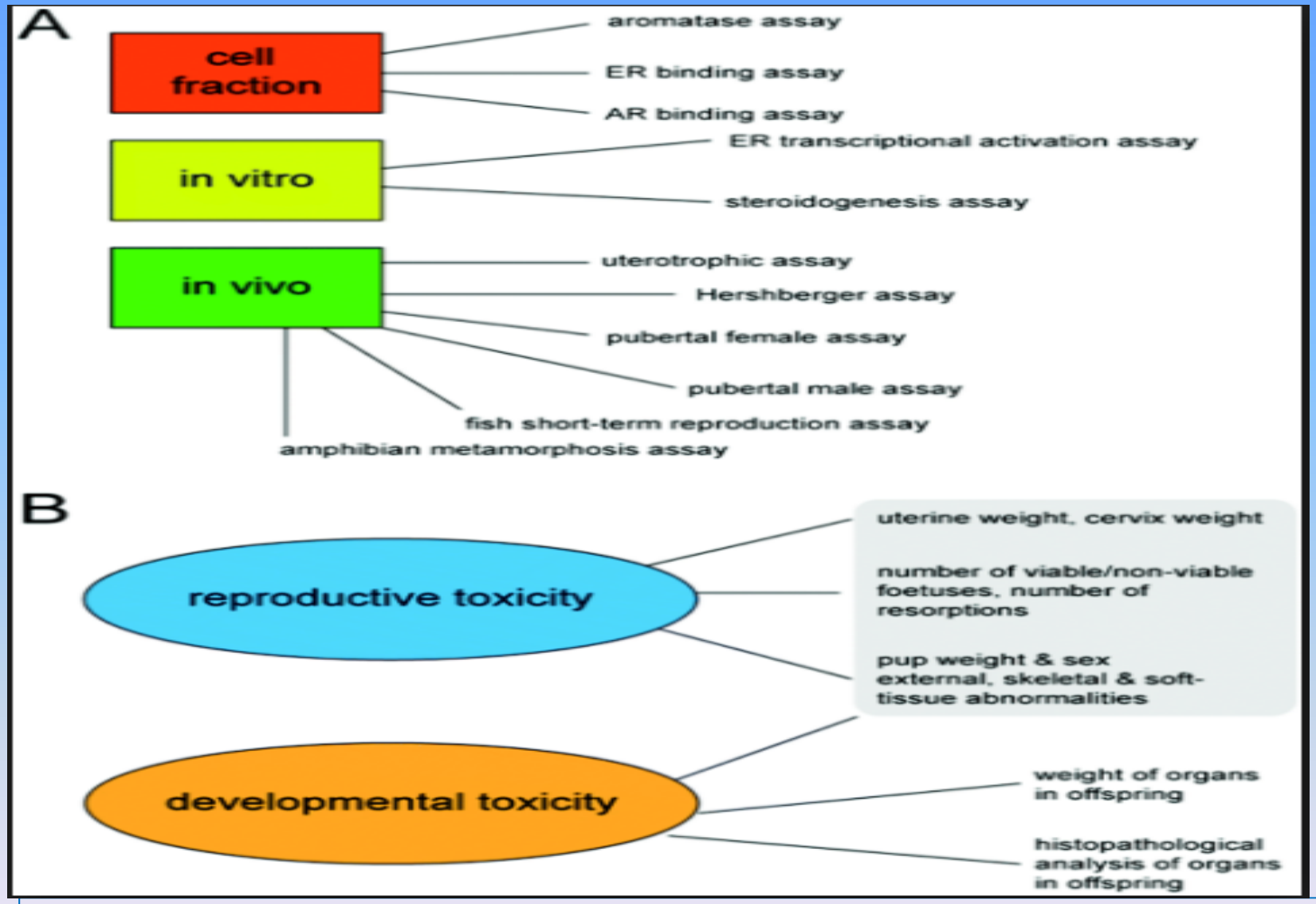
  *Expression de gènes naturels (protéines, enzymes, réponse cellulaire)
- **Les méthodes In vivo (souris, poisson-zèbre, xénope) :**

  *Expression de gènes naturels ou de gènes rapporteurs

➔ Chacune des méthodes présente des avantages et des inconvénients.

Ce qui incite à croiser les résultats afin de bien détecter les propriétés PE des substances chimiques.

Chaine de tests de détection des PE



Source : Beyond a means of exposure: a new view of the mother in toxicology research,Mary C. Catanese, Alexander Suvorov and Laura N. Vandenberg, Toxicology Research , 3, 2015

EFSA Journal 2013;11(3):3132

Table 2: *In vivo* mammalian toxicity screens and tests listed in the OECD CF, showing their known or potential responsiveness to various (selected and not exhaustive) endocrine modalities/axes/pathways. For each test, its level of the CF is shown: those at Level 3 are suitable for identification of endocrine activity, while those at Levels 4 and 5 are more suitable for hazard identification and characterisation. **M**: screen providing some mechanistic information; **A**: screen or test providing some apical information; **P**: apical endpoints potentially responsive, but not yet fully evaluated.

Endocrine modalities/axes/ pathways	***Assays***														
	Uterotrophic assay (OECD 440) (Level 3)	Hershberger assay (OECD 441) (Level 3)	Enhanced 28-day study (OECD 407) (Level 4)	90-day study (OECD 408) (Level 4)	1-generation study (OECD 415) (Level 4)	Male pubertal assay (US EPA OPPTS 890.1500) (Level 4)	Female pubertal assay (US EPA OPPTS 890.1450) (Level 4)	Intact adult male assay (no TG available) (Level 4)	Prenatal dev tox study (OECD 414) (Level 4)	Chronic tox and carcinogenicity studies (OECD 451-3) (Level 4)	Enhanced reproductive screening assay (OECD 421) (Level 4)	Enhanced combined 28-day/reproductive screening assay (OECD 422) (Level 4)	Developmental neurotoxicity study (OECD 426) (Level 4)	Extended 1-generation study (OECD 443) (Level 5)	2-generation study (OECD 416) (Level 5)
Oestrogen	M		A	A	A		A		A	A	A	A	A	A	A
Anti-estrogens	M		A	A	A		A		A	A	A	A	A	A	A
Androgen	M	M	A	A	A	A		A	A	A	A	A	A	A	A
Anti-androgen		M	A	A	A	A		A	A	A	A	A	A	A	A
Thyroid		M	M/A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Anti-thyroid		M	M/A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Steroidogenesis			A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
HPA/Corticosteroid axis			P	P	P				P	P	P	P	P	P	P
Somatotropic axis			P	P	P				P	P	P	P	P	P	P
Vitamin D signalling			P	P	P				P	P	P	P	P	P	P
Retinoid signalling			P	P	P				P	P	P	P	P	P	P
PPAR pathway			P	P	P				P	P	P	P	P	P	P
Other potential endocrine modalities not covered in OECD, 2012b			P	P	P				P	P	P	P	P	P	P

Table 3: Aquatic *in vivo* ecotoxicity screens and tests listed in the OECD CF, showing their known or potential responsiveness to various (selected and not exhaustive) endocrine modalities/axes/pathways. For each test, its Level of the CF is shown: those at Level 3 are suitable for identification of endocrine activity, while those at Levels 4 and 5 are more suitable for hazard identification and characterisation. **M**: screen providing some **mechanistic** information; **A**: screen or test providing some apical information; **P**: apical endpoints potentially responsive, but not yet fully evaluated.

	Vertebrate assays										***Invertebrate assays***							
Endocrine modality/ axes/ pathways	Fish short term reproduction assay (TG 229) (Level 3)	21 d Fish Assay (TG 230) (Level 3)	Androgenised female stickleback screen (GD 140) (Level 3)	Amphibian metamorphosis assay (TG 231) (Level 3)	*Xenopus* embryo thyroid signalling assay (expected to be Level 3)	Fish sexual development test (TG 234) (Level 4)	Larval amphibian growth & development assay (Level 4)	Fish reproduction partial lifecycle test (Level 4)	Fish lifecycle toxicity test (US EPA OPPTS 850.1500) (Level 5)	Medaka multigeneration test (Level 5)	Mollusc partial lifecycle toxicity test (Level 4)	Chironomid toxicity test (TG 218/219) (Level 4)	*Daphnia* reproduction test (TG 211) (Level 4)	Mysid 2-generation toxicity test (Level 5)	Copepod reproduction & development test (Level 5)	Chironomid lifecycle toxicity test (TG 233) (Level 5)	Mollusc lifecycle toxicity test (Level 5)	*Daphnia* multigeneration test (Level 5)
Oestrogen	M/A	M				M/A	M/A	M/A	A	M/A	P						P	
Anti-oestrogens	M/A	M				M/A	M/A	M/A	A	M/A	P						P	
Androgen	M/A	M	M			M/A	M/A	M/A	A	M/A	P						P	
Anti-androgen	M/A	M	M			M/A	M/A	M/A	A	M/A	P						P	
Thyroid				M/A	M		M/A	P	P	P								
Anti-thyroid				M/A	M		M/A	P	P	P								
Steroidogenesis	M/A	M				M/A	M/A	M/A	A	M/A	P						P	
HPA-axis - Corticosteroid axis							P	P	P	P								
Somatotropic axis							P	P	P	P								
Vitamin D							P	P	P	P								
Retinoid signalling							P	P	P	P	P						P	
PPAR pathway							P	P	P	P								
Epigenetic effects										P				P				P
Ecdysteroid system												A	P	A	A	A		A
Juvenile hormone system												A	P	A	A	A		A

Pourquoi la validation des tests ?

Pour une acceptation mutuelle des données au niveau international

- **Tests standardisés**
  - But du test sur une base scientifique reconnue
  - Applicable, prédictif, performant.
  - Transférable, répétable, reproductible en intra et inter laboratoires

- **Bonnes pratiques de Laboratoire** ➔ **Seules variables de l'étude**
  - Personnel spécialement formé
  - conditions de réalisation des tests standardisées
  - Conditions stables tout au long de l'étude
  - Procédures de travail standardisées

  } **=** **Réactif Biologique** **+** **Substance testée**

Pour une acceptation des données au niveau réglementaire

- EU-REACh
- US-EPA
- Autres agences

} **Qualité des études / fiabilité des résultats**

Cotation Klimisch

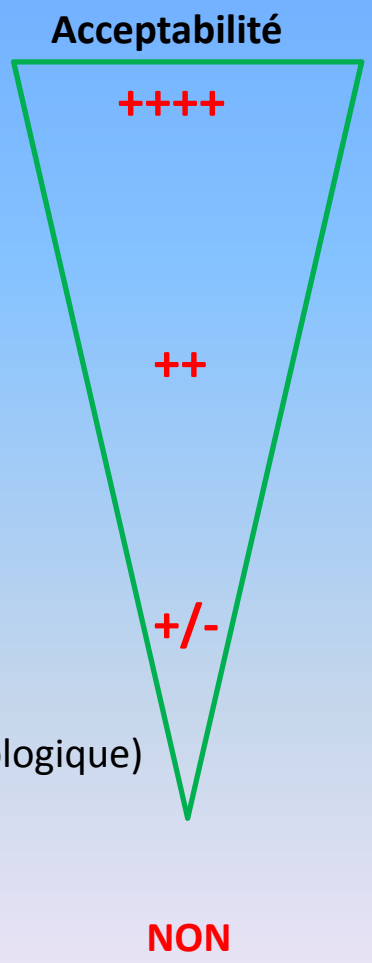
Guidance document on standardized test guidelines for evaluating chemicals for endocrine disruption N° 150 2012

Pourquoi la validation des tests ?

Confiance dans la Qualité des Etudes et la Fiabilité des résultats

Cotation Klimisch

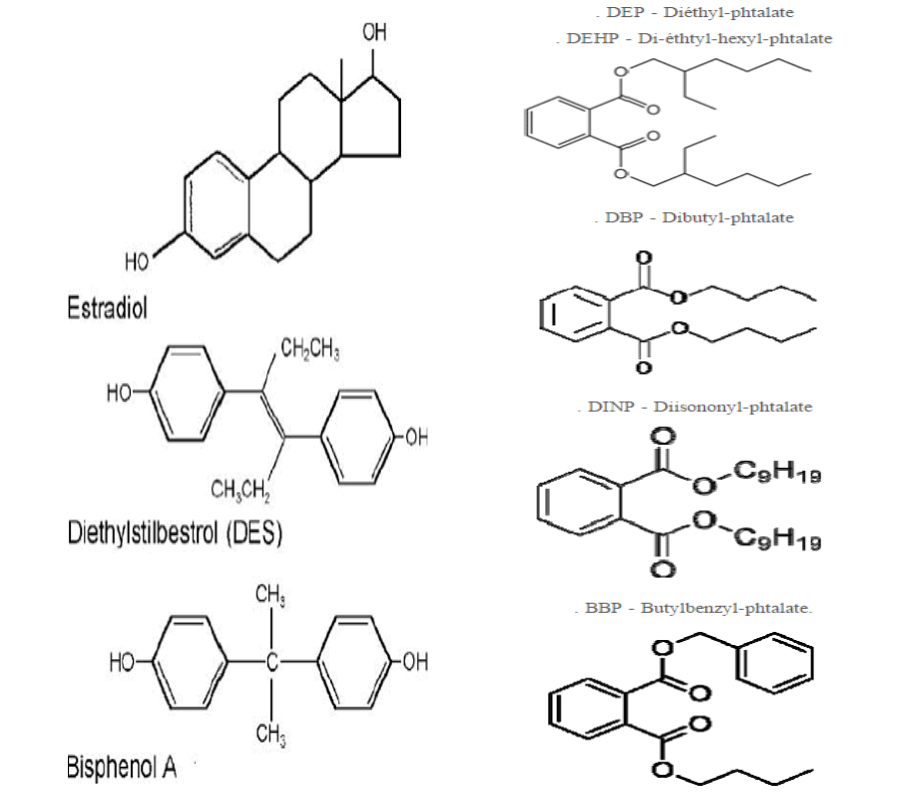
- **1 = Fiable sans restrictions** :
  -Préférablement BPL
  -Conforme / très proche de méthodes validées et/ou standardisées(LD)
  - Conforme à une méthode spécifique
- **2 = Fiable avec restrictions** :
  - Non BPL
  - Déviations acceptables(permettant de conclure) à une LD
  - Bonne description + pertinence scientifique
- **3 = Non fiable** :
  -Interférences système d'essai / substance d'essai
  -Système d'essai non pertinent par rapport à l'exposition (ex : voie non physiologique)
  -Méthode non acceptable ou insuffisamment décrite pour l'évaluation,
  non convaincante pour un jugement d'expert
- **4 = Non évaluable** : Niveau de détail insuffisant:
  - Résumés, littérature secondaire, revues



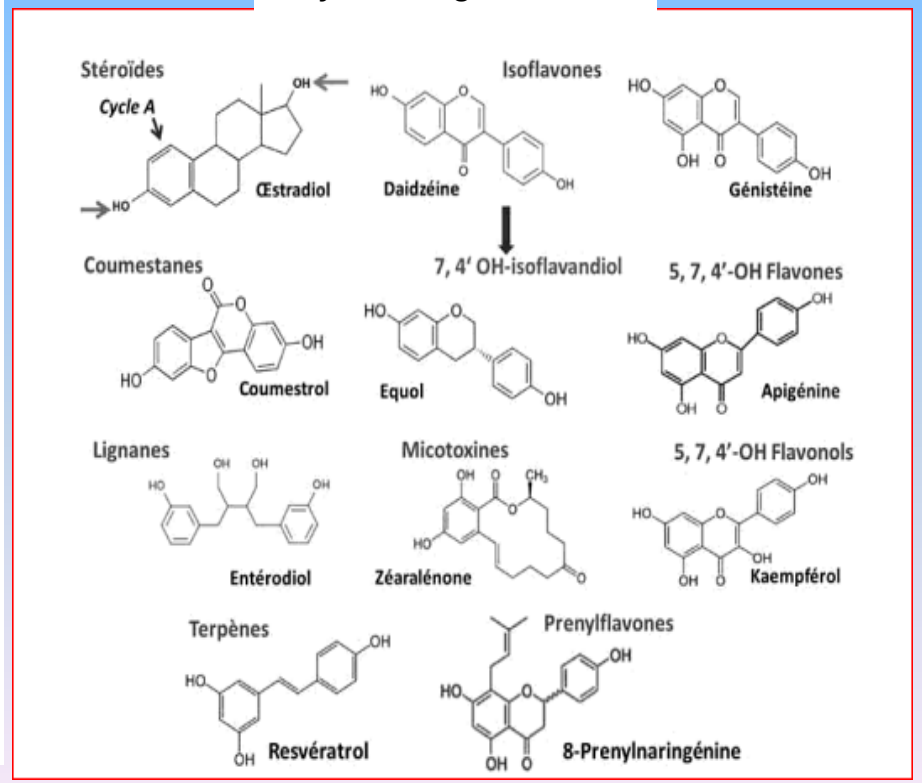
Niveau 1 Stratégie de tests OCDE (2012)

Level 1 Existing Data and Non-Test Information	• Physical & chemical properties, e.g., MW reactivity, volatility, biodegradability • All available (eco)toxicological data from standardized or non-standardized tests. • Read across, chemical categories, QSARs and other *in silico* predictions, and ADME model predictions

Tri & classement par ordre de priorité basé sur les informations existantes



Phytoestrogènes

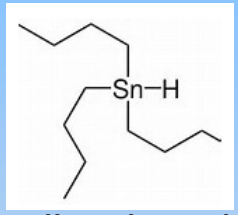


Niveau 2 Stratégie de tests OCDE (2012)

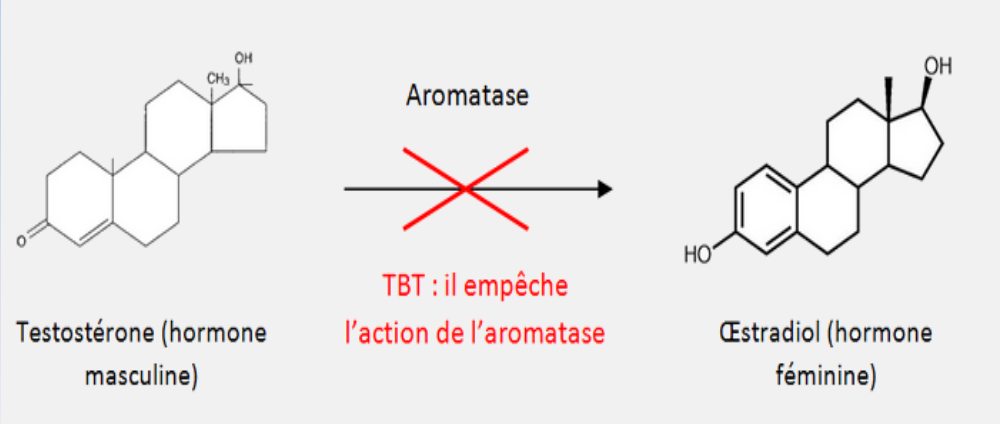
Level 2	
In vitro assays providing data about selected endocrine mechanism(s) / pathways(s) (Mammalian and non mammalian methods)	• Estrogen or androgen receptor binding affinity • Estrogen receptor transactivation (OECD TG 455 – OECD TG 457) • Androgen or thyroid transactivation (If/when TGs are available) • Steroidogenesis in vitro (OECD TG 456) • MCF-7 cell proliferation assays (ER ant/agonist) • Other assays as appropriate

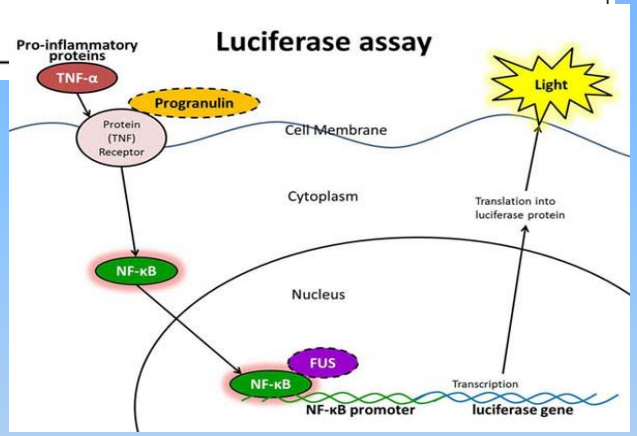
Tests *in vitro* renseignant sur le mécanisme

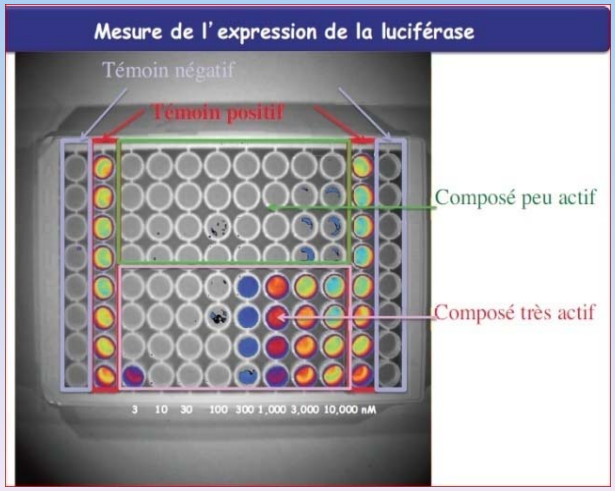
TriButylTin / Tri Butyl Etain
biocide (fongicide et molluscicide)



- Augmentation testostérone
- Neurotoxine ➔ masculinisation des femelles (PMF)







Test OCDE 455

Niveau 3 Stratégie de tests OCDE (2012)

	Mammalian Toxicology	Non-Mammalian Toxicology
Level 3 *In vivo* assays providing data about selected endocrine mechanism(s) / pathway(s)[1]	• Uterotrophic assay (OECD TG 440) • Hershberger assay (OECD TG 441)	• Xenopus embryo thyroid signalling assay (When/if TG is available) • Amphibian metamorphosis assay (OECD TG 231) • Fish Reproductive Screening Assay (OECD TG 229) • Fish Screening Assay (OECD TG 230) • Androgenized female stickleback screen (GD 140)

Tests *in vivo* sur un seul perturbateur endocrinien

Etude des Mécanismes et des effets

Niveau 3 Test Utérotrophique OCDE 440

Principe: induction de variations de poids des organes estrogéno par liaisons de substances aux récepteurs des estrogènes chez les femelles Rat immatures ou ovariectomies

Doses : Par gavage ou par injections sous cutanées pendant 10 jours consécutifs

Trois doses + témoin: dose maximale tolérée (MTD) dose maximum utilisable = 1000mg/kg/j.

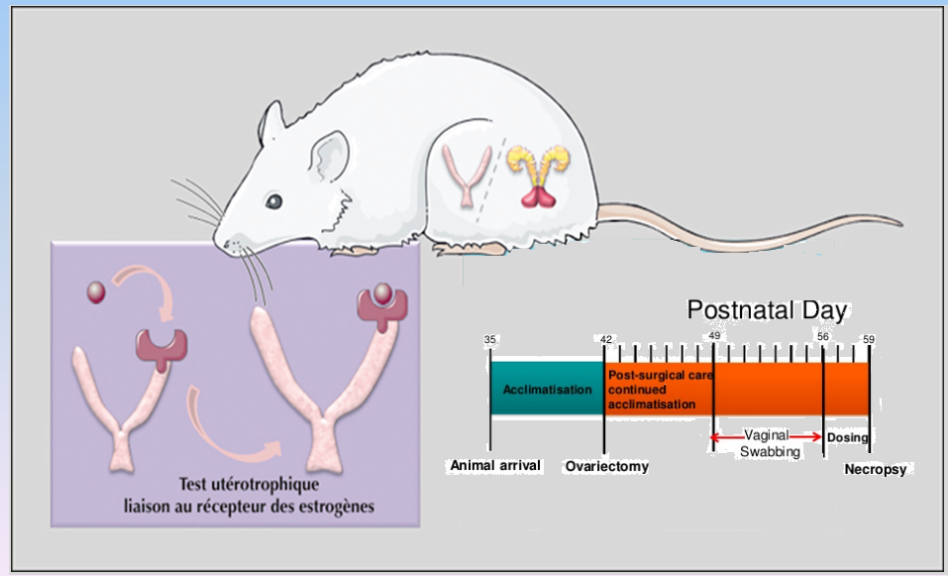
ou multiplication par 10 ou 100 la dose in vitro ou in silico ayant un effet agoniste connu.

Résultats: Mesure du poids et observations de l'utérus

Positif si ⇧ poids

Restrictions:

- Intra cutanée évite le métabolisme hépatique
- Attention aux phyto-oestrogènes des aliments pour les femelles immatures
- L'ovariectomie est un facteur de stress et doit être complète



Niveau 3 Test Hershberger OCDE 441

Principe: Estimer et d'évaluer rapidement les potentialités d'agoniste ou d'antagoniste des androgènes ou d'inhibiteur de 5α-réductase d'un produit chimique par l'induction de variations de poids des organes androgéno-dépendants chez le Rat male pré-pubertaire castré

Doses : gavage ou injections sous cutanées pendant 10 jours consécutifs

Trois doses+ témoin : dose maximale tolérée (MTD) dose maximum utilisable =1000mg/kg/j.

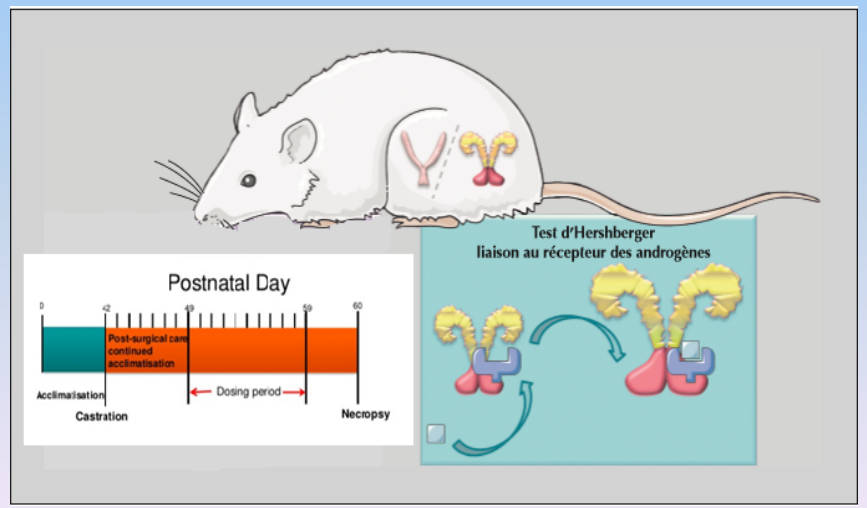
ou multiplication par 10 ou 100 la dose in vitro ou in silico ayant un effet agoniste connu.

Résultats: Mesure du poids et observations 5 organes : la prostate ventrale , les vésicules séminale le muscle releveur de l'anus et bulbo caverneux, les glandes de Cooper et le gland

➔ Positif = ⬆ poids sur 2 organes / 5

Restrictions:

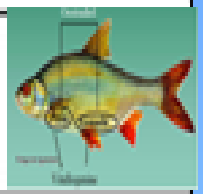
- Intra cutanée évite le métabolisme hépatique
- le poids des organes peut être modifié par d'autres agents

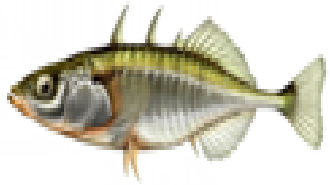


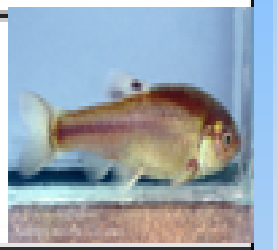
5α-réductase dégrade l'hormone mâle, la testostérone, en dihydrotestostérone (DHT) .

Niveau 3 Etudes OCDE sur Les Poissons

	Adult	Egg/ Embryo	Larva	Juvenile	Adult	Egg/ Embryo	Larva	Juvenile	Adult	Egg/ Embryo	Larva	Juvenile
21-day fish screening assay (OECD TG 230)	↔	*Pimephales promelas*, medaka et le poisson-zèbre ; biomarqueurs : la vitellogénine et caractères sexuels secondaires.										
Androgenized female stickleback screen (OECD GD 148)	↔	épinoche femelle androgénisée Mesure de la Spiggin										
Fish reproductive screening assay (OECD TG 229)	↔	*Pimephales promelas*, medaka et le poisson-zèbre biomarqueurs : la vitellogénine et caractères sexuels secondaires										







Doses: 3 doses + témoin à partir de la CMT (concentration Maximale Tolérée) ou 10 mg/L

Niveau 3 Essai de 21 jours sur les poissons (OCDE 230)

Principe : *dépistage à court terme de l'activité oestrogénique, et androgénique et de l'inhibition de l'aromatase*

L'essai a été validé sur le tête-de-boule (*Pimephales promelas*), le medaka japonais (*Oryzias latipes*) et le poisson-zèbre (*Danio rerio*); cependant le poisson-zèbre ne permet pas de détecter l'activité androgénique.

Doses: 3 doses + témoin à partir de la CMT (concentration Maximale Tolérée)

ou 10 mg/L pendant 21 jours

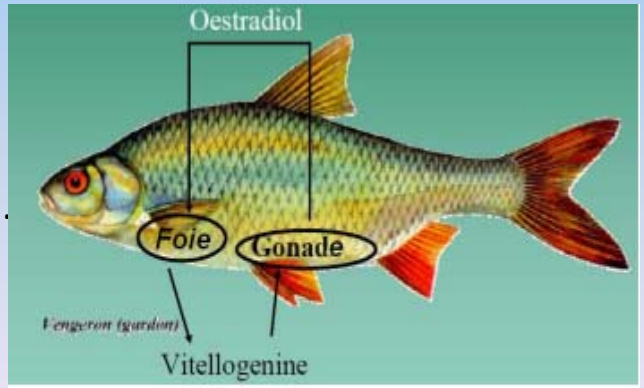
Résultats:

- Les biomarqueurs la vitellogénine et les caractères sexuels secondaires.

*La vitellogénine est dosée chez le tête-de-boule, le medaka japonais et le poisson-zèbre

*les caractères sexuels secondaires sont mesurés

- chez le tête-de-boule femelles (nombre de tubercules nuptiaux situés sur le museau = indicateur d'exposition à des androgènes exogènes).
- chez le medaka femelle, (nombre de tubercules papillaires constitue = indicateur d'exposition à des androgènes exogènes).



http://acces.ens-lyon.fr/evolution/biodiversite/dossiers-thematiques/biosurveillance-et-bioindicateurs/resolveUid/640992500e0778b2055f659d6ddf76c8

Niveau 3 Test de dépistage endocrinien de 21 jours chez la femelle épinoche androgénisée (OCDE 148)

Principe : Détection des substances androgéniques et anti-androgéniques chez la femelle épinoche (sticklebacks) (Gasterosteus aculeatus)

- La Spiggin est présente naturellement dans le foie de la femelle. Elle est produite par le foie du male reproducteur en réponse aux androgènes circulants. Stockée dans la vessie du male elle sert à cimenter les matériaux de construction du nid

Test

- Mesure de la Spiggin chez la femelle androgénisée qui traitée au DHT à 5µg/l (DiHydro-Testostérone)
- Trois doses + témoin pendant 21 jours forte dose à la Dose Maximale Tolérée (moins de 10% de mortalité) ou 10mg/l (flux continu) + DHT control

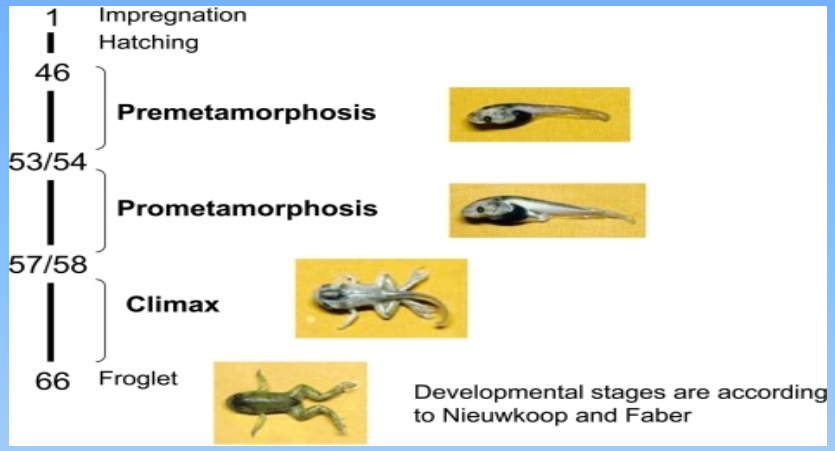
Résultats: Mesure de production de Spiggin hépatique par test ELISA

= Activité anti-androgénique ⇩ ou ⇧ = Activité androgénique

Niveau 3 Etudes OCDE sur les batraciens Xenopus laevis

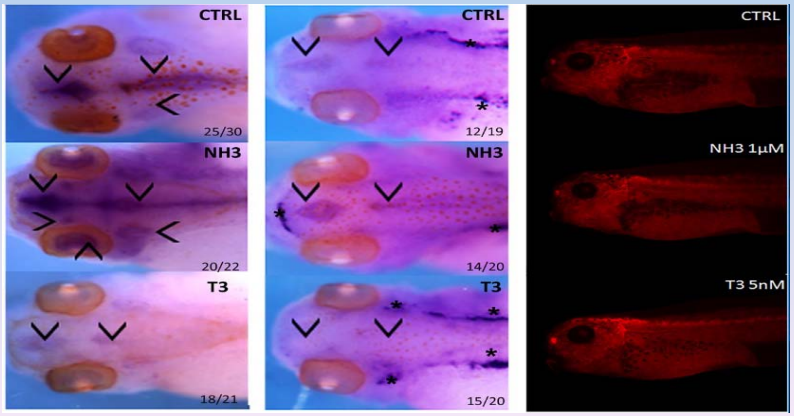
- **Amphibian Metamorphosis Assay OCDE 231**

Doses: 3 doses + témoin à partir de la CMT (concentration Maximale Tolérée) ou 100 mg/L

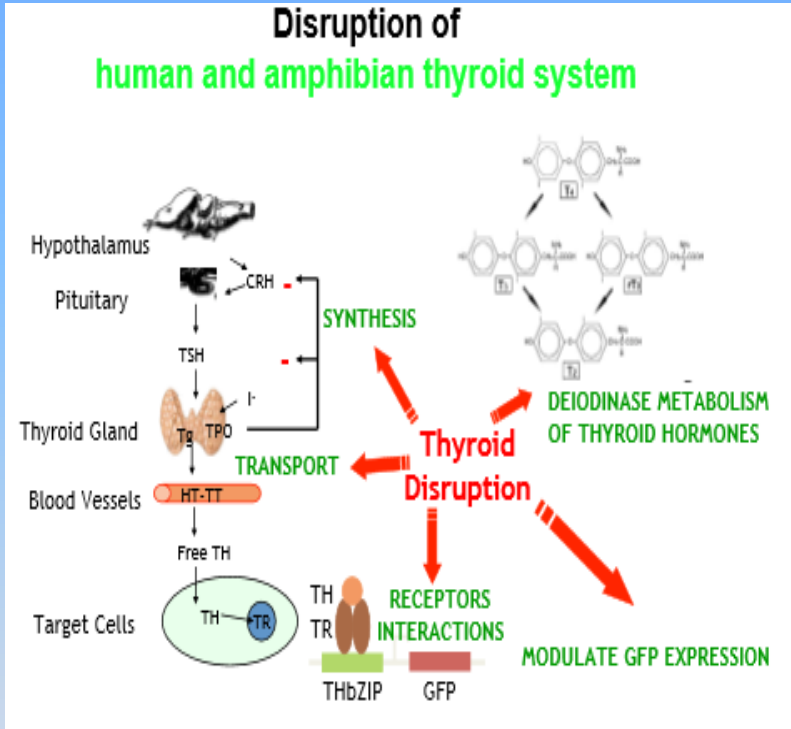


- **Xenopus Embryonic Thyroid Signalling Assay**

Non (encore) validé

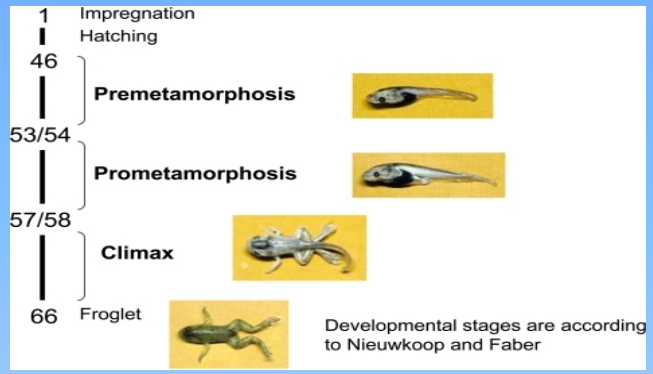


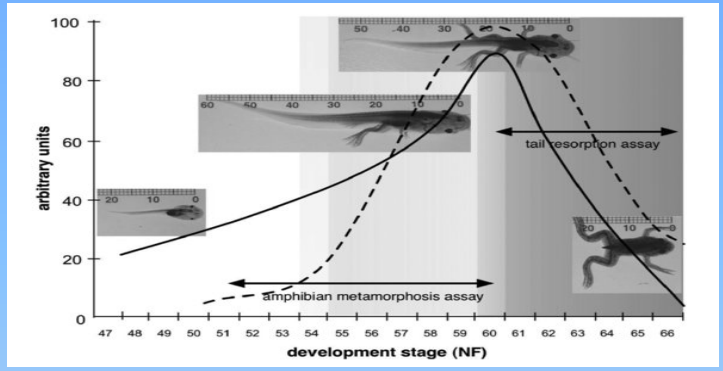
Etude de l'axe HHT (Hypothalamus-Hypophyse-Thyroïde)



Niveau 3 Amphibian Metamorphosis Assay (OECD 231)

Principe: Test de défrichage sur le têtard de Xenopus laevis pour identifier les substances qui pourraient interférer avec la fonction de l'axe HHT (Hypothalamo-Hypophyso-Thyroidien)

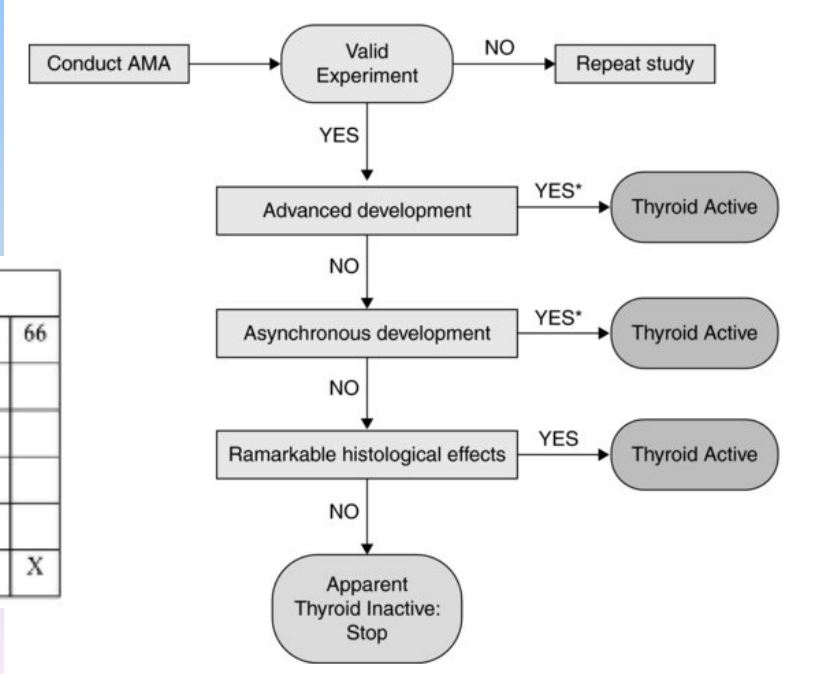




Doses: 3 doses + témoin à partir de la CMT (concentration Maximale Tolérée) ou 100 mg/L

- Etude entre jours 51 et 66

Critères morphologiques apparents	Stade de développement															
	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66
Pattes postérieures	X	X	X	X	X	X	X									
Pattes antérieures						X	X	X	X	X						
Structure crâniofaciale										X	X	X	X			
Morphologie du nerf olfactif											X	X	X			
Longueur de la queue													X	X	X	X



Niveau 4 Stratégie de tests OCDE (2012)

Level 4		
In vivo assays providing data on adverse effects on endocrine relevant endpoints [2]	• Repeated dose 28-day study (OECD TG 407) • Repeated dose 90-day study (OECD TG 408) • 1-generation reproduction toxicity study (OECD TG 415) • Male pubertal assay (see GD 150, Chapter C4.3)[3] • Female pubertal assay (see GD 150, Chapter C4.4)[3] • Intact adult male endocrine screening assay (see GD 150, Chapter Annex 2.5) • Prenatal developmental toxicity study (OECD TG 414) • Chronic toxicity and carcinogenicity studies (OECD TG 451-3) • Reproductive screening test (OECD TG 421 if enhanced) • Combined 28-day/reproductive screening assay (OECD TG 422 if enhanced) • Developmental neurotoxicity (OECD TG 426)	• Fish sexual development test (OECD TG 234) • Fish Reproduction Partial Lifecycle Test (when/If TG is Available) • Larval Amphibian Growth & Development Assay (when TG is available) • Avian Reproduction Assay (OECD TG 206) • Mollusc Partial Lifecycle Assays (when TG is available)[4] • Chironomid Toxicity Test (TG 218-219)[4] • Daphnia Reproduction Test (with male induction) (OECD TG 211)[4] • Earthworm Reproduction Test (OECD TG 222)[4] • Enchytraeid Reproduction Test (OECD TG 220)[4] • Sediment Water Lumbriculus Toxicity Test Using Spiked Sediment (OECD TG 225)[4] • Predatory mite reproduction test in soil (OECD TG 226)[4] • Collembolan Reproduction Test in Soil (TG OECD 232)[4]

Tests *in vivo* sur plusieurs perturbateurs endocriniens, Mécanismes et effets

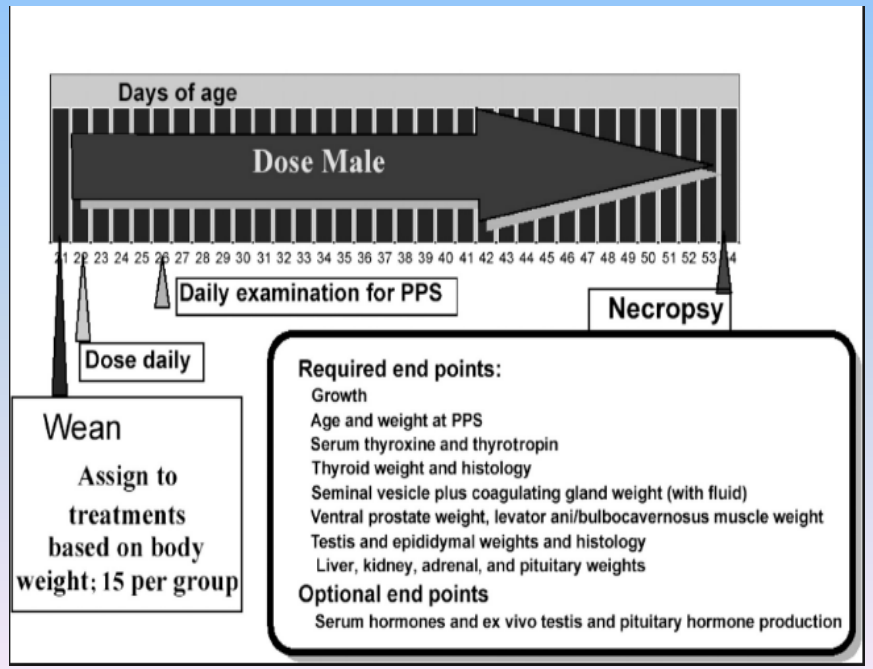
NIVEAU 4 Male and Female Pubertal Assay's OCDE 150

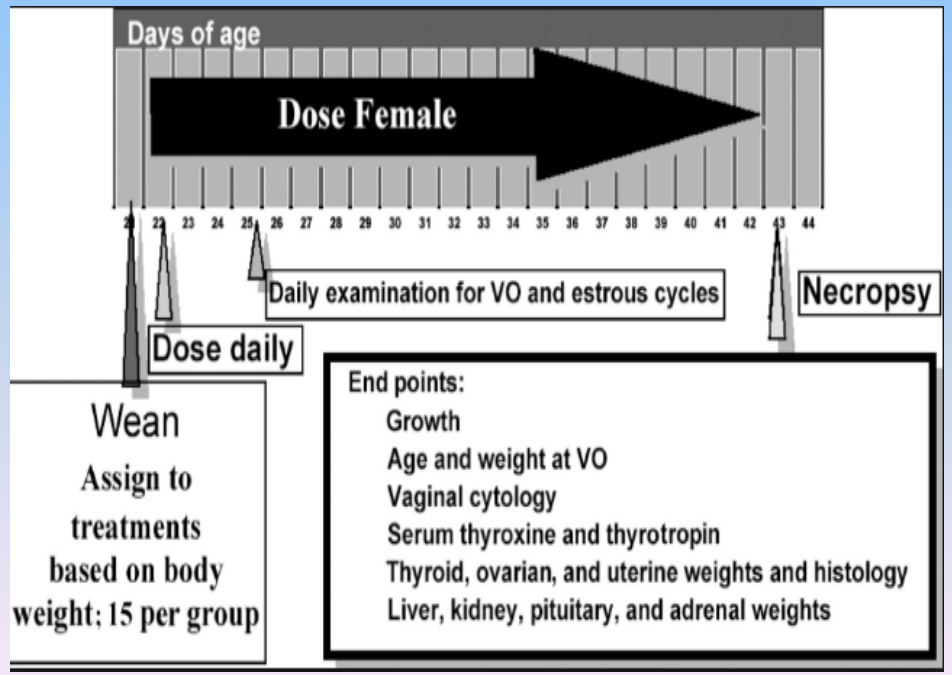
Principe: détection des inhibiteurs thyroïdiens et d'agents dopaminergiques pendant la période pré pubertaire

Doses: Rats prépubaires âgés de 23 jours gavés pendant 30 jours

Résultats :

- Vérification séparation du prépuce et de l'ouverture du vagin
- Cycle de l' Oestrus
- Poids et modifications histologiques des vésicules séminales, de la prostate ventrale et dorso-latérale, épididymes, ovaires, testicules, thyroïde, hypophyse et surrénales.
- Mesure de la testostérone, hormones thyroïdiennes (T4 et TSH)





NIVEAU 4 Essai de dépistage de la toxicité pour la reproduction et le développement OCDE 421 et Etude combinée de toxicité à doses répétées et de dépistage de la toxicité pour la reproduction et le développement OCDE 422 :

Principe : Etudes des effets d'un produit chimique d'essai sur le fonctionnement de la reproduction chez le mâle et la femelle.

Doses: 3 doses + témoin par gavage oral + témoin , Rat , 10 animaux / sexe:

- mâles traités pendant 4 semaines avant l'accouplement
- femelles traitées tout au long de l'étude (approximativement 63 jours).
- accouplements « un mâle pour une femelle »

Résultats : observations cliniques,

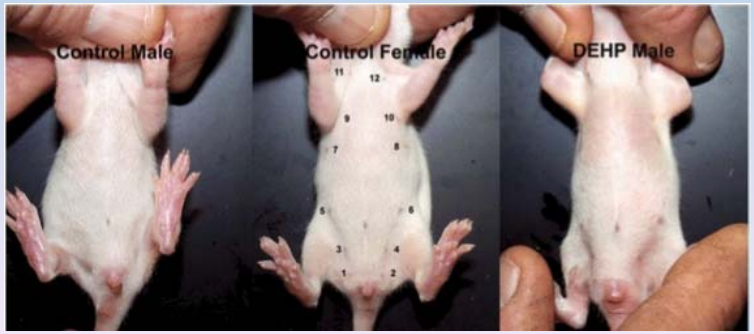
-poids corporel et la consommation de nourriture/eau, surveillance du cycle œstral,

- mesure/observation des caractéristiques de la descendance,
- examen hématologique et de biochimie clinique, taux sérique d'hormones thyroïdiennes
- autopsie générale et l'histopathologie (dont testicules et l'épididyme)

-Les résultats évalués en termes d'effets observés, autopsie et résultats microscopiques.

L'évaluation = rapport dose de la substance d'essai /présence ou l'absence d'observations.

Ostby & Gray. Current Protocols in Toxicology, 2004.
Anogenital distance in neonatal male and female SD rats.



Spécificité détection des PE: mesure de la distance anogénitale et l'examen de la persistance du mamelon chez les petits, ainsi qu'un examen thyroïdien (mise à jour 2015)

Niveau 4 Essai à court terme de reproduction des poissons (OCDE 229)

Principe: Fécondité & Reproduction du poisson sur poissons tête-de-boule

- Certaines observations sont validées pour le medaka japonais (Oryzias latipes) ou le poisson-zèbre (Danio rerio)

Groupes de mâles sexuellement matures et de femelles reproductrices) exposés à une substance pendant une durée limitée de leur cycle biologique (21 jours).

Doses: 3 doses + témoin à partir de la CMT (concentration Maximale Tolé ou 10 mg/L

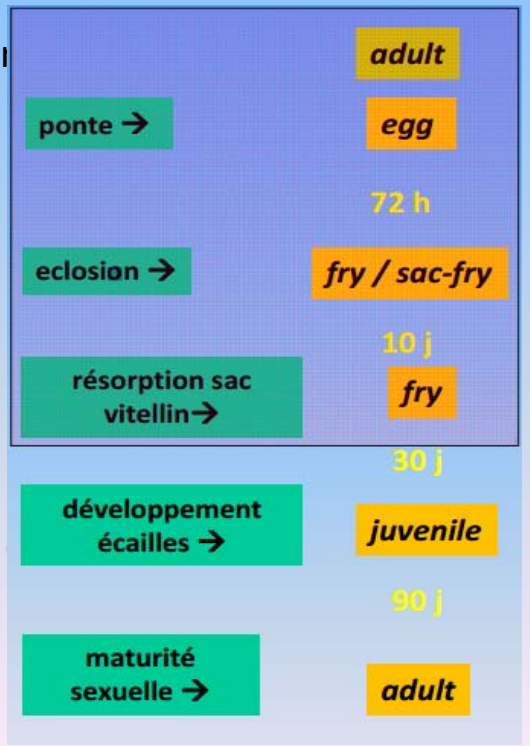
Résultats:

* Le taux de fécondité est évalué quotidiennement

* Deux biomarqueurs sont mesurés chez les mâles et les femelles:

- la vitellogénine (medaka et danio)
  Positif si vitellogénine ⬆ chez les males ou ⬇ chez le femelles
- Et les caractères sexuels secondaires (danio).

* L'histopathologie gonadique peut être utilisée pour évaluer l'adaptation des animaux testés et pour confirmer les éléments de preuve apportés par les autres biomarqueurs.



NIVEAU 4 STRATÉGIE DE TESTS OCDE (2012)

OCDE 206 Oiseaux, essai de reproduction
3 dose + témoin dose maximum 1000 ppm dans l'aliment
Observations : mortalité des adultes, la production d'oeufs,
les œufs fêlés, l'épaisseur de la coquille, la viabilité,
l'éclosabilité et les effets sur de jeunes oiseaux pendant l'étude.

OCDE 211 Daphnia magna, essai de reproduction
Observations**:** la mortalité des parents, nombre de descendants,

OCDE 220 Survie et fécondité chez L'Enchytrée dans le sol
Dose maximum de 1000 mg/kg
Observations: la survie des animaux testés,
nombre de descendants, changements morphologiques

OCDE 232 Collembole Reproduction dans le sol
Doses: 8 concentrations
Observations**:** la mortalité des parents, nombre de descendants

Niveau 4 Essai de Reproduction chez L'Enchytrée OCDE 220

Principe : Evaluer les effets des produits chimiques sur la reproduction d'un ver enchytrée, Enchytraeus albidus, dans le sol.
.

Doses: 10 vers par dose + témoin. 6 semaines
gamme de concentrations de la substance d'essai mélangée à un sol artificiel. Dose maximum de 1000 mg/kg

Résultats.

- nombre total de vers juvéniles produits par animal parent
- la survie des animaux parents.
- changements morphologiques des adultes,

Le taux de reproduction des animaux exposés / animaux témoins

➔ concentration sans effet observé (CSEO) et/ou la CEx,.

Niveau 5 Stratégie de tests OCDE (2012)

Level 5 *In vivo* assays providing more comprehensive data on adverse effects on endocrine relevant endpoints over more extensive parts of the life cycle of the organism [2]	• Extended one-generation reproductive toxicity study (OECD TG 443)[5] • 2-Generation reproduction toxicity study (OECD TG 416 most recent update)	• FLCTT (Fish LifeCycle Toxicity Test) (when TG is available) • Medaka Multigeneration Test (MMGT) (when TG is available) • Avian 2 generation reproductive toxicity assay (when TG is available) • Mysid Life Cycle Toxicity Test (when TG is available)[4] • Copepod Reproduction and Development Test (when TG is available)[4] • Sediment Water Chironomid Life Cycle Toxicity Test (OECD TG 233)[4] • Mollusc Full Lifecycle Assays (when TG is available)[4] • Daphnia Multigeneration Assay (if TG is available)[4]

Tests *in vivo* renseignant sur les effets endocriniens et les autres mécanismes

NIVEAU 5 Etude de Toxicité pour La Reproduction sur Deux Générations OCDE 416

Principe: Détection des effets nuisibles sur la reproduction, la parturition, la lactation, le développement postnatal comprenant la croissance et le développement sexuel.

Doses : Trois doses + témoin par voie orale (alimentation, eau potable ou gavage) dose max de 1000 mg/kg poids corporel/j. mâles et femelles rat (de 5-6 semaines) donnant 20 femelles gravides à terme ou presque.

- Exposition de la génération parentale P1 durant la croissance, l'accouplement, la gravidité , la lactation jusqu'au sevrage de la progéniture F1 .
- Exposition la génération F1 pendant leur croissance jusqu'à l'âge adulte, l'accouplement la gravidité, la lactation jusqu'au sevrage de la progéniture F2 .
- Exposition de la deuxième génération F2 jusqu'au sevrage.

Résultats: mesures (poids, paramètres du sperme, du cycle ovarien et de la progéniture), observations cliniques quotidiennes, autopsie générale et l'histopathologie des organes

Détermination d'un NOEL

Restriction : Etude non spécifique pour la détection des PE, mais indications sur les cibles des PE

	Dosing			
	Premating	Mating	Post-mating	
P males	10 weeks	2 weeks	6 weeks	
P females	10 weeks	2 weeks	pregnancy	lactation

			Premating	Mating	Post-mating		
F1 males	in utero	pre-weaning	10 weeks	2 weeks	6 weeks		
F1 females	in utero	pre-weaning	10 weeks	2 weeks	pregnancy	lactation	

F1 males	in utero	pre-weaning	post-weaning
F1 females	in utero	pre-weaning	post-weaning

NIVEAU 5 Etude étendue de toxicité pour la reproduction sur une génération chez medaka (MEOGRT) OCDE 240

Principe: Evaluation des dangers et des risques pour l'environnement liés aux produits chimiques, en particulier les produits suspectés d'être des perturbateurs endocriniens (PE).

Doses:

L'exposition dans le test MEOGRT est poursuivie jusqu'à l'éclosion (jusqu'à deux semaines post-fécondation, spf) dans la seconde génération (F2).

Résultats:

-mise en évidence les effets indésirables potentiels en termes de population, (survie, le développement macroscopique, la croissance et la reproduction)

- disposer d'informations mécanistiques et de pouvoir établir des liens entre les résultats d'autres types d'études de terrain ou de laboratoire

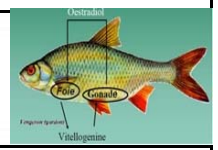
- établir *a posteriori* une activité potentielle de perturbation du système endocrinien (activité androgénique ou ostrogénique détectée dans d'autres tests et essais, par exemple),

- mesures de l'ARNm de la *vitellogénine (vtg)* (ou la protéine vitellogénine, VTG)

- observations des caractères sexuels secondaires (CSS) phénotypiques liés au sexe génétique,

- évaluation histopathologique.

Résumé des Etudes OCDE sur Les Poissons

Niveaux		Adult	Egg/ Embryo	Larva	Juvenile	Adult	Egg/ Embryo	Larva	Juvenile	Adult	Egg/ Embryo	Larva	Juvenile	
3	21-day fish screening assay (OECD TG 230)	↔				*Pimephales promelas*, medaka et le poisson-zèbre ; biomarqueurs : la vitellogénine et caractères sexuels secondaires.								
	Androgenized female stickleback screen (OECD GD 148)	↔				épinoche femelle androgénisée Mesure de la Spiggin								
	Fish reproductive screening assay (OECD TG 229)	↔				*Pimephales promelas*, medaka et le poisson-zèbre biomarqueurs : la vitellogénine et caractères sexuels secondaires								
4	Fish sexual development test (OECD TG 234)		↔			medaka et le poisson-zèbre, épinoche ; biomarqueurs : fécondité, larves, malformations, vitellogénine et caractères sexuels secondaires								
	Fish full life cycle test		↔				↔							
5	Fish two-generation test	↔												
	Fish multigeneration test	↔												

Niveau 5 Stratégie de tests OCDE (2012)

OCDE 233 : Essai de toxicité sur le cycle de vie des chironomes dans un système eau-sédiment chargé ou eau chargée-sédiment

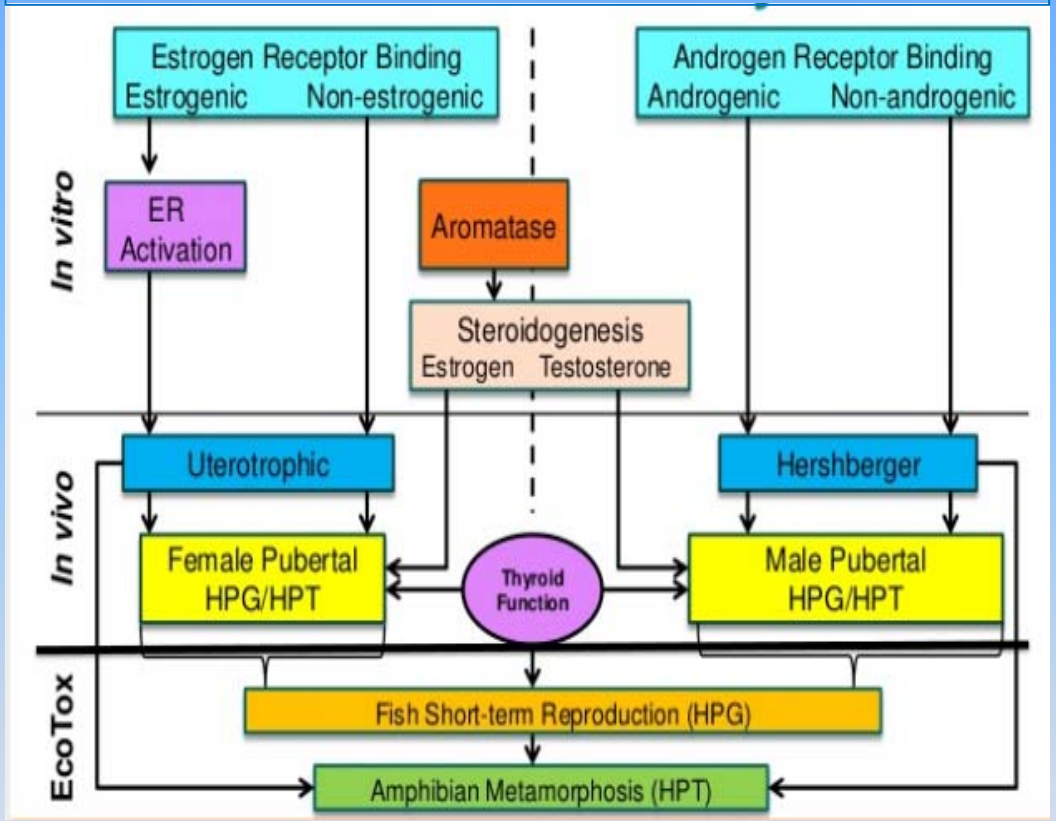
Observation viabilité et fécondité des générations 1 et 2

En cours

Project	Lead Country
Fish Life-Cycle Test/Medaka Multi-Generation Test	USA/JPN/DEU
Fish Reproduction/Partial Lifecycle Test	USA
Larval Amphibian Growth and Development Assay	USA/JPN
Xenopus Embryonnic Thyroid Assay	FRA
Zebrafisg Embryo Assay for the detection of endocrine active substances acting through the estrogen receptor	FRA
Mysid Life Cycle Toxicity Test	USA
Copepod Reproduction and Development Test	SWE
Mollusc Reproductive Toxicity Tests – Development and Validation of Test Guidelines	DEU/GBR/FRA/DNK
Avian 2-Generation Reproductive Toxicity Assay	USA
Human Recombinant Oestrogen Receptor Alpha Binding Assay	USA/EC/DEU/JPN
STTA Assay for the Detection of Androgenic and Anti-Androgenic Activity	JPN
STTA Assay for the detection of Anti-Oestrogenic activity of chemicals	JPN
Performance-Based Test Guideline for the Androgen Receptor Transactivation Assay	EC
Transcriptional Assay for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Compounds using MELN Cells	EC
Thyroid Scoping Document	OECD Secr.
Update of TG 421 and TG 422 with ED-relevant endpoints	DK

EPA Endocrine Disruptor Screening Program

Niveau 1 US EPA (2010) Défrichage et Identification des substances interagissant avec le système endocrinien



Source Marty Ms, carney EW and Rowlands JC Toxicol Sci 120(S1) 2011

Table 3. Endocrine disruptor tiered testing approach (U.S. EPA 2010a).

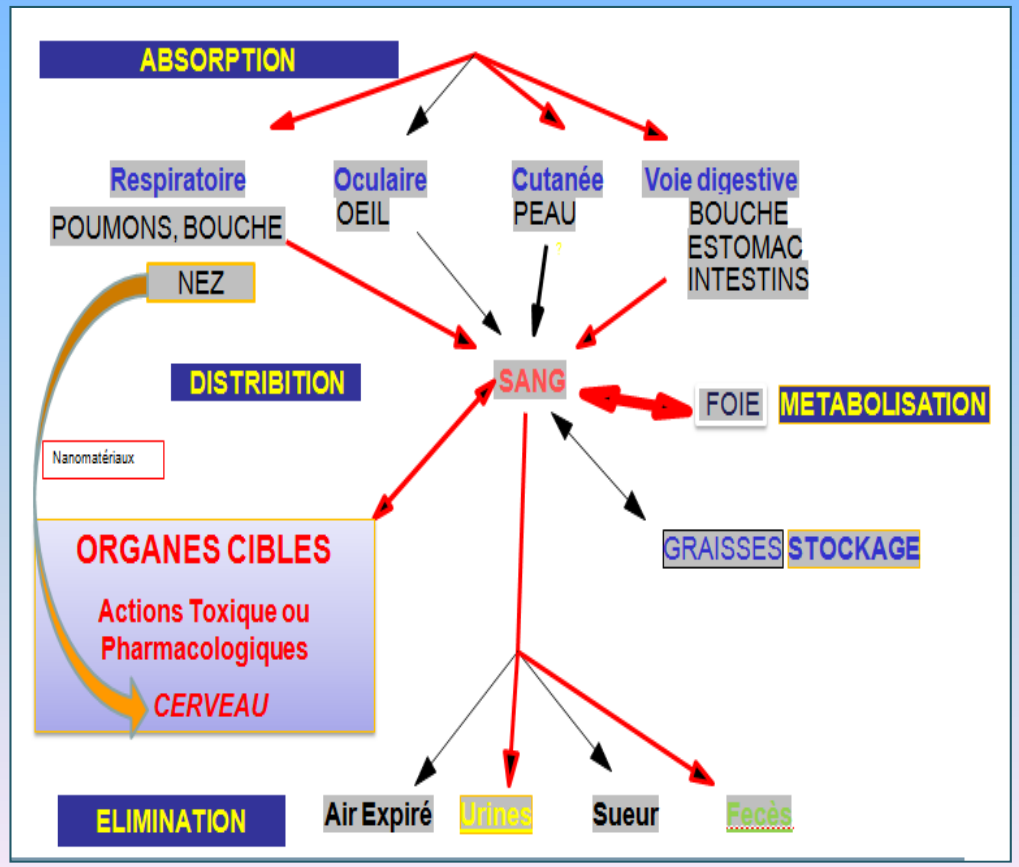
Assay	Species
Tier 1 testing assays	
Amphibian metamorphosis	Frog
Estrogen and androgen receptor binding assays	*In vitro*
Aromatase	*In vitro*
Steroidogenesis	*In vitro*
Fish short-term reproduction screen	Fish
Uterotrophic assay	Rat
Hershberger assay	Rat
Pubertal male assay	Rat
Pubertal female assay	Rat
Tier 2 testing assays	
Amphibian development, reproduction	Frog
Avian two-generation	Japanese quail
Fish life cycle	Fish
Invertebrate life cycle	Mysid shrimp
Mammalian two-generation reproduction	Rat

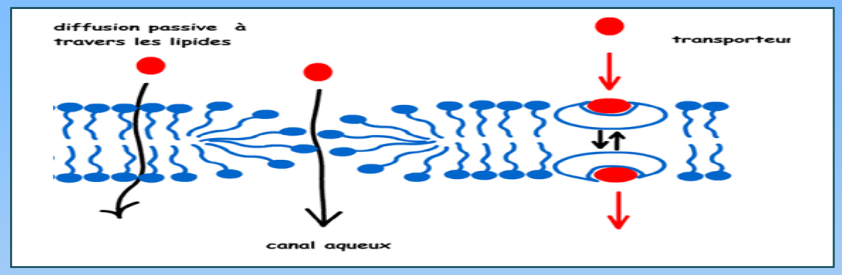
Niveau 2 US EPA (2017) Identification des effets adverses et établissement de relation dose /activité
Définition des risques par combinaison des dangers et des expositions pour management du risque

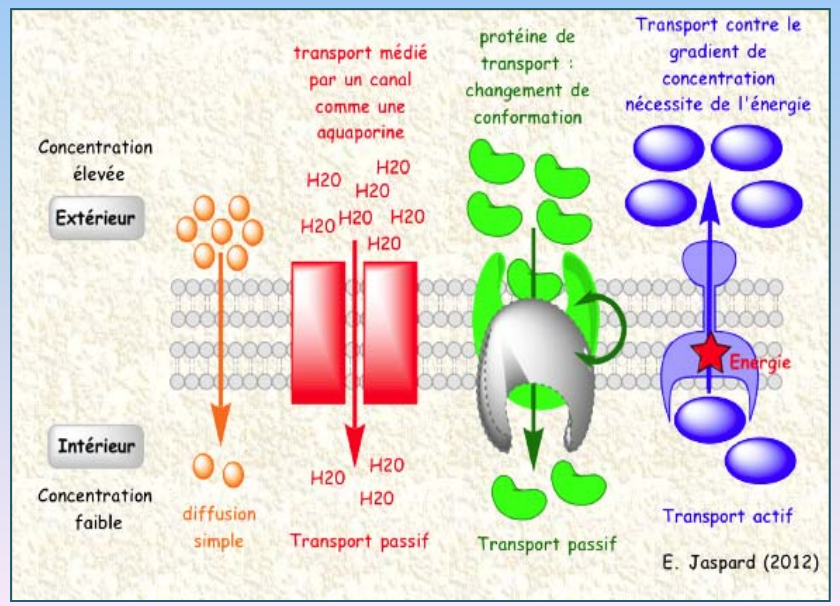
Rappel: Conditions d'actions des substances

<u>Pour agir une substance chimique doit</u>
- pénétrer dans l'organisme
- être biodisponible
- après transformation ou non (ADME)

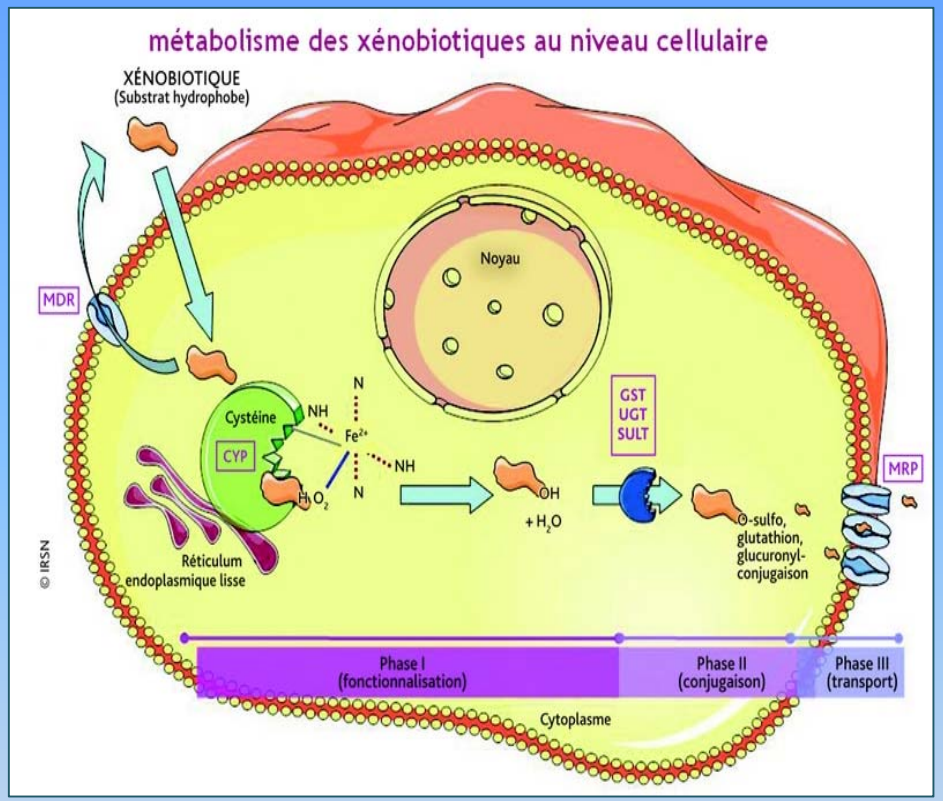
Puis <u>passer à travers la membrane cellulaire.</u>
- petite taille de la molécule,
- faible PM
- liposolubilité

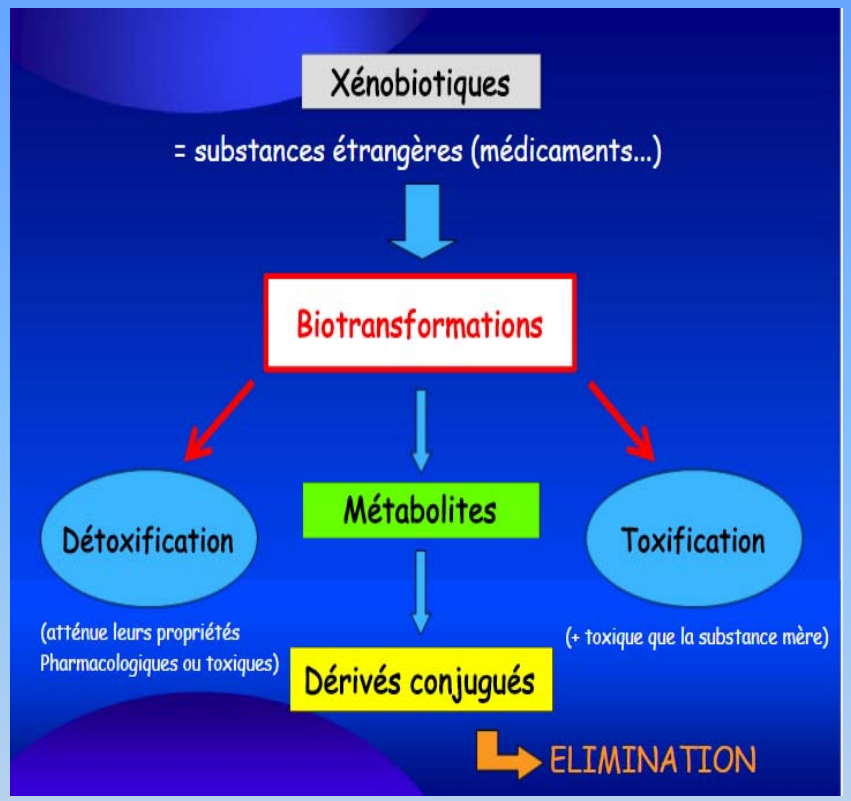






Rappel: Métabolisation des xénobiotiques





Fonctionnalisation – Conjugaison (Glucoronidation) – Transport – Excrétion

1) Les enzymes de la phase I (essentiellement des cytochromes P450), dites de fonctionnalisation, catalysent essentiellement les réactions d'oxydo-réduction et d'hydrolyse.
2) Les enzymes de la phase II (glutathion-S-transférases ou GST, UDP glucuronosyltransférases ou UGT…), dites de conjugaison, catalysent les réactions de conjugaison.
3) Généralement, après fonctionnalisation, les transporteurs de la phase III (P-glycoproteine ou Pgp, multidrug resistance proteins ou MRP…) transportent au travers des membranes les xénobiotiques, et surtout leurs dérivés, en vue de leur élimination de la cellule

(Source: Rouas 2011)

Rappel: Importance de la Métabolisation et de la Toxicocinétique

Métabolisation des Phtalates: (Frederiksen 2007)

Hydrolyse en monoesters
- monoesters à courtes Chaînes de carbones ➔ excrétés par les urines.
- monoesters à longues Chaînes de carbone ➔ transformés en métabolites secondaires par hydroxylations et oxydations

Conjugaison des métabolites secondaires par glucuronidation
Elimination des monoesters conjugués 15%, à travers les urines (demi-vie = 12h) et le reste dans fèces (bile)

➔ Réabsorption intestinale partielle = Biodisponibilité dans le sérum sanguin

Toxicocinétique du BPA chez l'homme et les autres primates (OMS 2009)

Absorption: rapide par voie orale
Conjugaison: par glucuronidation ou sulfatation dans la paroi intestinale et le foie,
Elimination: supérieure à 80 % en 5 heures.

➔ Les formes conjuguées n'ont pas d'action endocrinienne.

Questions : Sous quelle (s) forme (s) se trouve la substance dans l'organisme ?
Quel est son cycle de vie (ADME) ?
Quelle est sa Biodisponibilité ?

Les faibles doses

« Il existe une controverse scientifique sur les effets à faible dose.

Plusieurs études montrent que la courbe des effets n'est pas monotone.

Certains perturbateurs endocriniens ont ainsi des effets à faible dose qui disparaissent à forte dose. »

Pr Gérard Lasfargues 2012(Anses)

Les effets aux faibles doses sont définis comme étant toutes modifications biologiques apparaissant lors d'exposition humaines typiques, ou à des doses inférieures à celles utilisées habituellement dans les protocoles d'expérimentation (EFSA 2012)

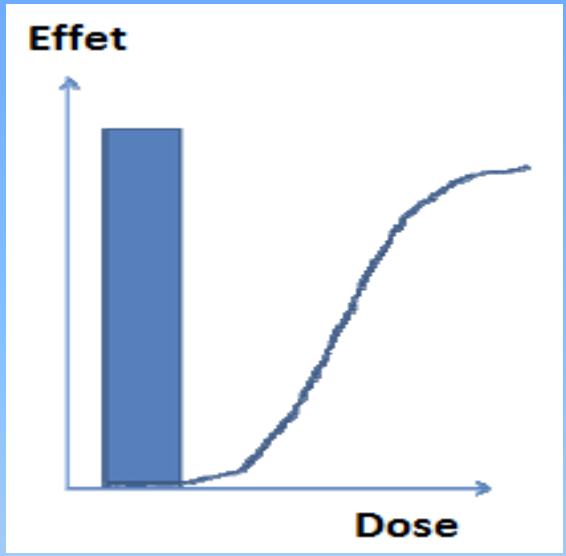
Ce n'est pas la dose qui fait le poison !

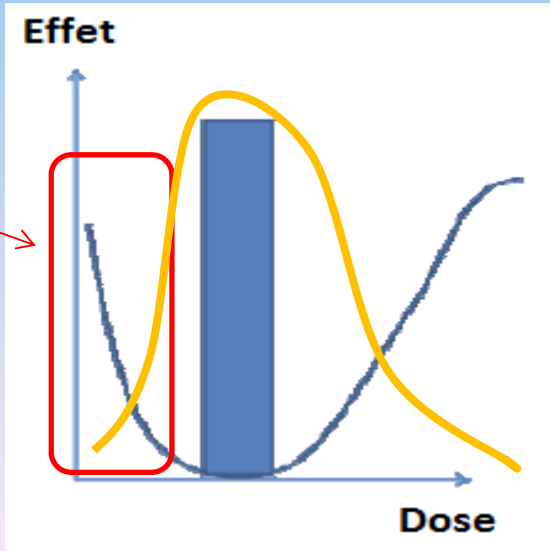
- Classiquement les effets des substances chimiques sont décrits suivant une courbe dose/réponse linéaire (monotone)

- Les perturbateurs endocriniens sont fortement suspectés d'agir sans effet de seuil, donc avec des effets possibles même à faible dose

➔ Les PE pourraient provoquer à de faibles doses des effets plus importants, voire opposés, à ceux observés à fortes doses .

- Les réponses à ces substances suivent des courbes non monotones : en forme de « U » inversé ou non.

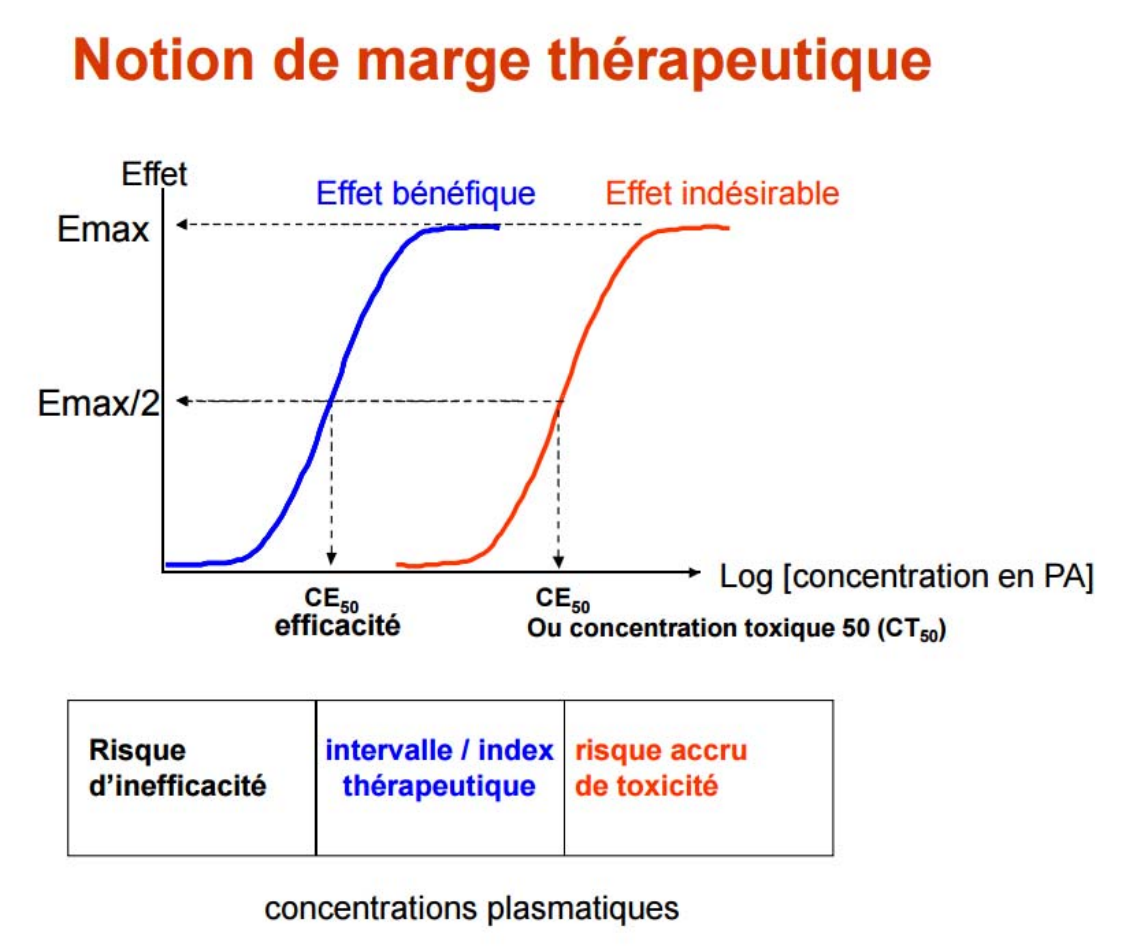




Dose Pharmacologique versus Dose Toxique ?

Question

Où se situent les faibles doses qui Induisent les effets de perturbateurs endocriniens ?



Source: UE6 Initiation à la connaissance du médicament par le Collège National de Pharmacologie Médicale, Editions Vernazobres-Grego

Les faibles doses

Questions :

- Quelle est la biodisponibilité des substances testées ?
(voie, métabolisme, demi-vie)

- Quelle est la nature des effets prise en compte ?

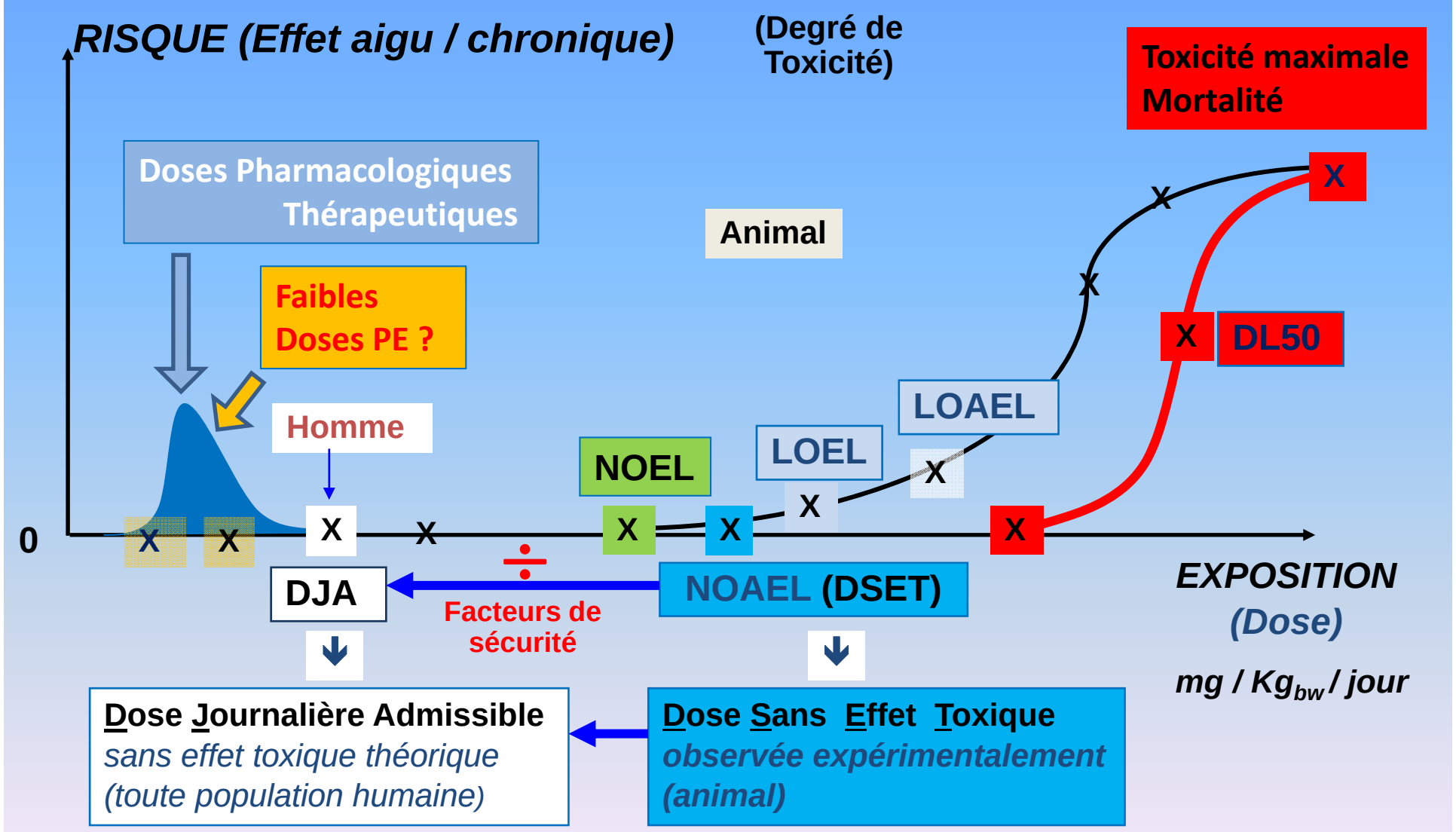
- Est-ce que ces effets sont réversibles ?

- Ces effets sont ils dans la marge homéostatique de l'organisme testé ?

- Est-ce que les effets observés aux faibles doses indiquent un danger ?

- Comment déterminer les faibles doses à partir des études
toxicologiques ou pharmacologiques ?

Relations Doses / Effets



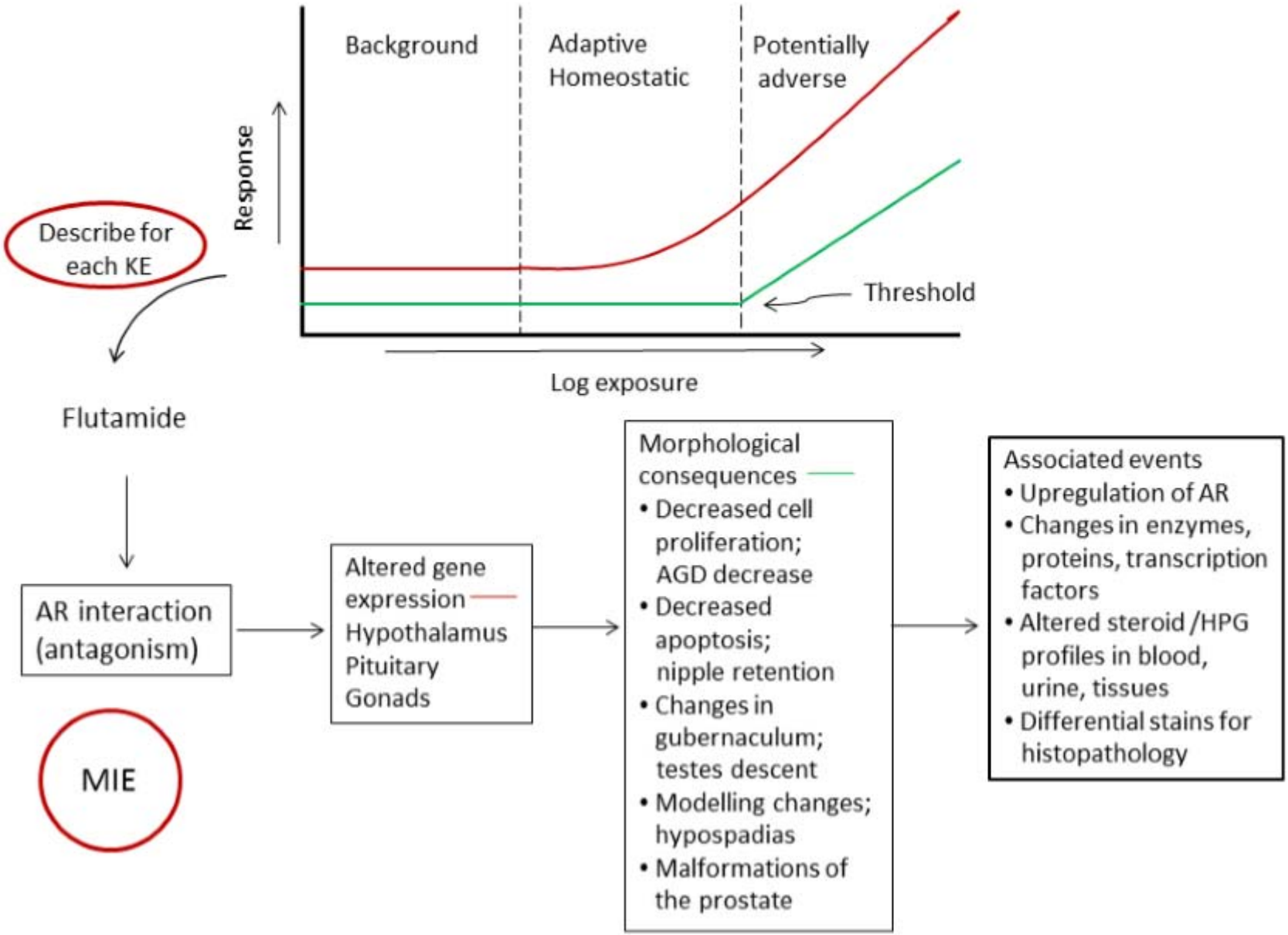
Royal Society of Chemistry : Expert Panel proposal on potential responses and adverse effects at very low dose exposure to endocrine disrupting chemicals (2015)

Objectifs:
Développer une approche expérimentale pour comprendre les interactions entre les événements endocriniens les uns avec les autres et comment ils peuvent induire un effet adverse, et qui permette de définir une relation quantitative dose/réponse pour les effets endocriniens étudiés.

Identifier les "Adverse Outcome Pathways (AOPs)" et leurs stades de développement qui peuvent lier les effets observés avec le Mode of Actions (MoAs) à des niveaux cellulaires de la substance chimique testées conduisant à la toxicité

Sélection de **l'axe pituitaire – gonades** pendant la vie périnatale; parce qu'elle représente la période la plus vulnérable aux perturbations chimiques, pendant une étude courte de développement chez le mâle.

Substance chimique modèle Perturbatrice Endocrinienne: **Flutamide**
- anti-androgène pur non stéroïdien, bloquant les récepteurs androgéniques prostatiques.
- dépourvu d'action sur les hormones gonadotropes et corticosurrénaliennes.
- biodisponibilité est bien connue
-facilement détectable et quantifiable
- modifications postnatales sur la distance anogénitale (AGD) et sur les mamelons chez le rat


Background
Adaptive Homeostatic
Potentially adverse
Response
Threshold
Log exposure
Describe for each KE
Flutamide
AR interaction (antagonism)
MIE
Altered gene expression
Hypothalamus
Pituitary
Gonads
Morphological consequences
• Decreased cell proliferation; AGD decrease
• Decreased apoptosis; nipple retention
• Changes in gubernaculum; testes descent
• Modelling changes; hypospadias
• Malformations of the prostate
Associated events
• Upregulation of AR
• Changes in enzymes, proteins, transcription factors
• Altered steroid /HPG profiles in blood, urine, tissues
• Differential stains for histopathology

R SC Expert Panel proposal on potential responses and adverse effects at very low dose exposure to endocrine disrupting chemicals (Protocole suite)

-Rats femelles Sprague Dawley âgées de 9-10 semaines fécondées / groupe

Doses par gavage : 0, 0.00625, 0.0625, 0.625, 6.25, 12.5, 25 and 50 mg/kg/jour de flutamide dans 1ml /kg d'huile de tournesol. Pendant les jours de gestation 15 à 18.

Observation: poids corporel , comportement , signes de toxicité pendant la gestation et la lactation

Résultats: comptage des portées et standardisation à 4 males + 4 femelles qui seront allaitées.

Examens des males : à jour 1 et 2: distance anogénitale (incluses les femelles) **, à jour 13**: nombre de tétons, **à jour 16** : descente des testicules, **à jour 25** : poids corporel; taille du sexe, présence d'hypospadias

Autopsie: analyse des hormones sériques (lutéine, folliculine , testostérone).

Mesures: longueur du pénis et du gubernaculum (cordon musculaire qui relie le testicule en position intra-abdominale à la paroi abdominale de la région génitale). Taille des vases déférents. Poids de la prostate, . Pesée et apparence et de la positon des testicules .

Histopathologie: Testicules, vésicules séminales et épididymes

Analyse des genes Insl3 or Scarb1, impliqués dans le cryptorchidisme, ainsi que d'autres biomarqueurs sensibles aux antiandrogènes

Toxicocinétique du Flutamide dans les mères et les fœtus.

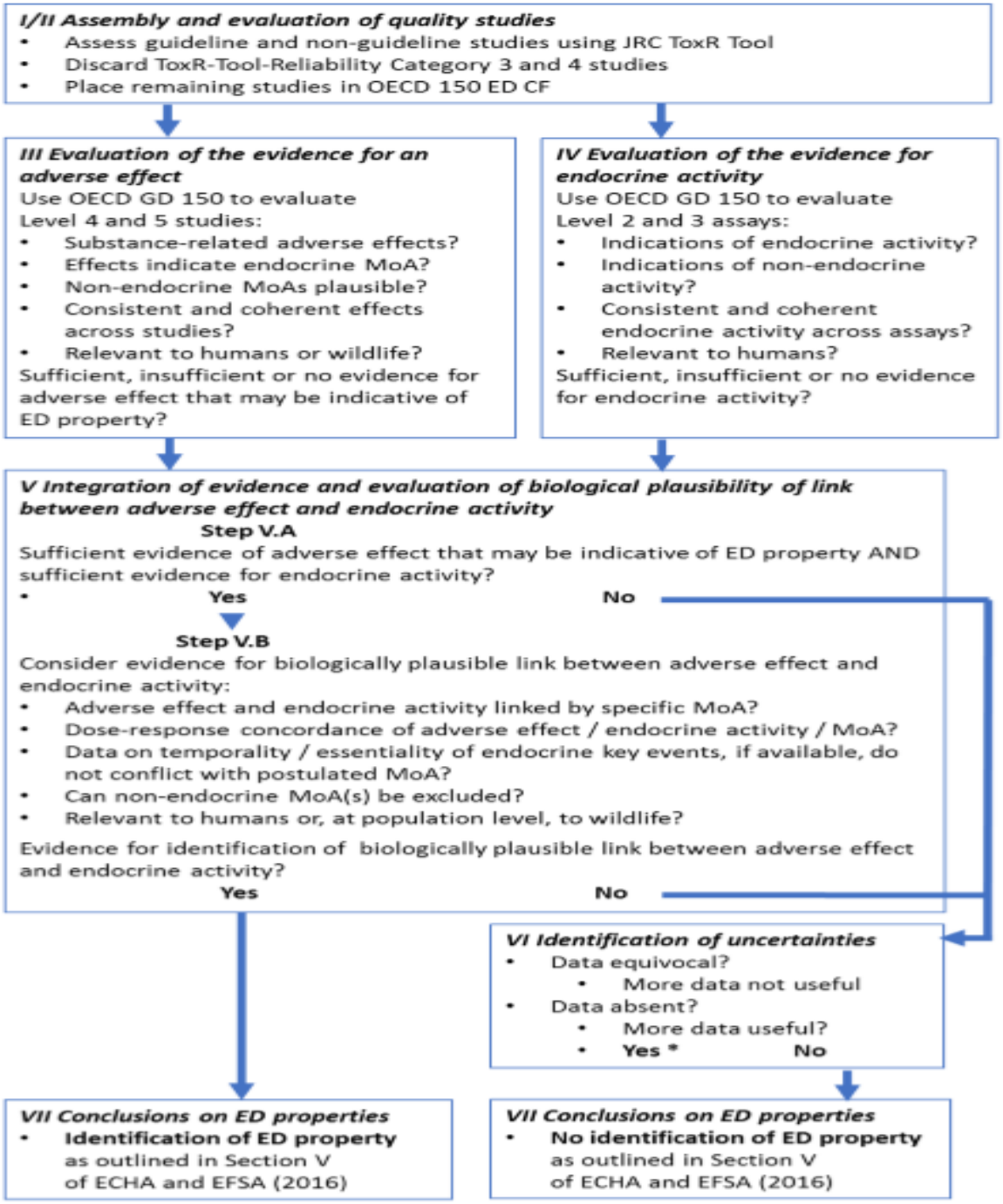
Mesure de l'excrétion du Flutamide de son métabolite (2-hydroxyflutamide) entre quelques heures et 3 jours après le gavage .

Comparaison entre la courbe dose /réponse des études in vitro sur les testicules fœtaux ou la lignée H295R et celle de l'étude.

The ECETOC Seven Steps for the Identification of Endocrine Disrupting Properties (ECETOC 7SI-ED)

ECETOC TR No. 130
March 2017

Simplified flow chart of the ECETOC 7SI-ED that follows the outline presented in Section V of ECHA and EFSA (2016)



Conclusion

- Les tests validés OCDE explorent les effets reprotoxiques des substances ainsi que certaines cibles des PE

- Les doses utilisées sont souvent déterminées par rapport
  - à la Dose Maximale Tolérée
  - ou un multiple de 10 à 100 de l'effet PE observé in vitro

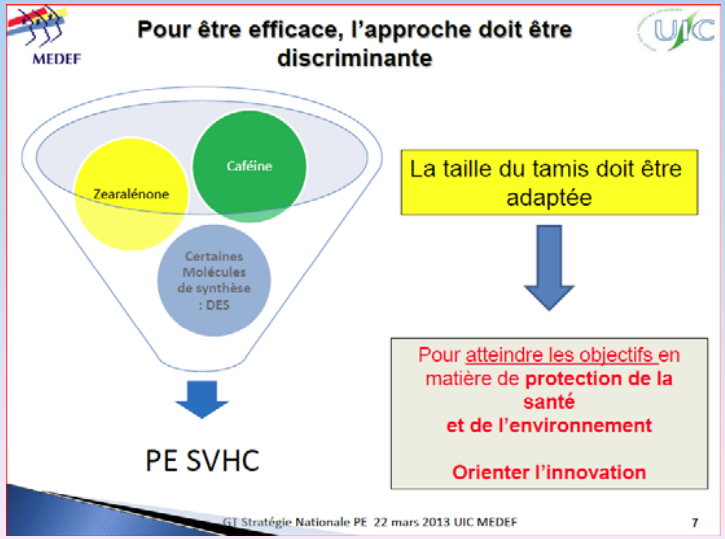
➔Comment définir les Faibles Doses ?
➔Utilisation de tests mécanistiques / pharmacologiques?
➔ Comment déterminer les « fenêtres d'exposition » optimales ?

Les tests OCDE sont nécessaires au niveau réglementaire dans REACh

Sont ils adaptés à la problématique des PE ?
(doses, voies d'exposition, fenêtre d'exposition espèces, paramètres observés)

Sont-ils suffisants ? Non

➔ Doit-on recourir à des tests non validés et accepter la notion de plausibilité ?



Efficacité des tests

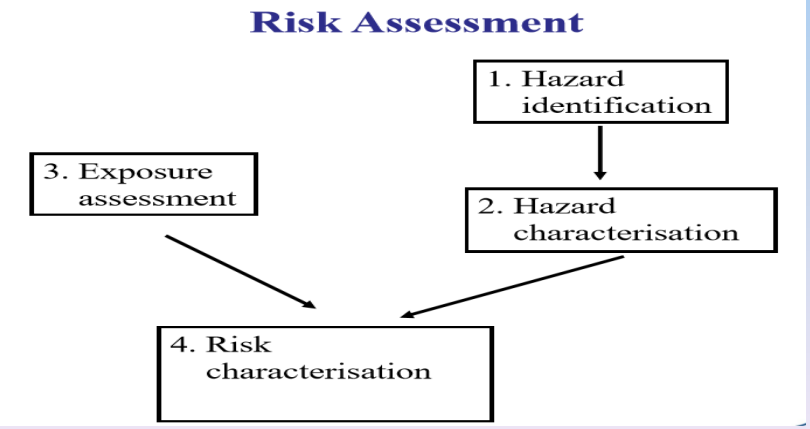
Peut on utiliser les faibles doses dans l'évaluation des risques ?

Peut-on utiliser la **notion de puissance** pour discriminer les substances ?

Quelle population cherche t'on à protéger ?

(enfants, femmes enceintes, malades, vieillards) ?

Peut-on substituer la notion de danger à celle de risque comme base des réglementations ?



Merci pour votre Attention