

RENCONTRE SCIENTIFIQUE

Perturbateurs endocriniens : les nouveaux défis de la recherche

Jeudi 13 juin 2024

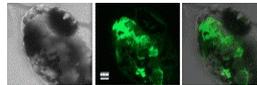
Maison de la RATP - Paris 12

Développement et adoption de la ligne directrice OCDE 250 (test EASZY) : lien entre recherche et expertise en appui aux politiques publiques.

François BRION, INERIS

EASZY: un test issu de la recherche sur les PE sur les enzymes de la stéroïdogénèse chez le poisson zèbre

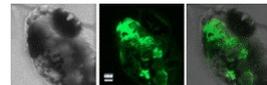
- Travaux initiés dans le contexte de projets de recherche du PNRPE et de l'ANR ([anr[®]NEED, PROOFS](#)) ayant permis l'acquisition de méthodologies et de connaissances originales = socles indispensables à l'émergence du test EASZY
- Expression, localisation du gène de l'aromatase cérébrale (cyp19a1b) dans le cerveau (Menuet et al., 2005; [Vosges et al., 2010](#)), régulation par les œstrogènes (Menuet et al., 2005)
- Sensibilité du gène cyp19a1b aux (xéno)-œstrogènes au cours du développement embryonnaire (Hinfray et al., 2006, [Vosges et al., 2010](#), [Vosges et al., 2012](#))
- Développement et caractérisation d'une lignée de poisson zèbre transgénique exprimant un gène rapporteur fluorescent sous le contrôle du gène cyp19a1b-GFP ([Tong et al., 2009](#))
- Mise en évidence de la perturbation de l'expression du gène de l'aromatase cérébrale chez les embryons de poissons zèbres transgéniques par de nombreux contaminants environnementaux (e.g., [Brion et al., 2012](#), [Cano-Nicolau et al., 2016](#), [Le Fol et al., 2017](#))



RENCONTRE
SCIENTIFIQUE

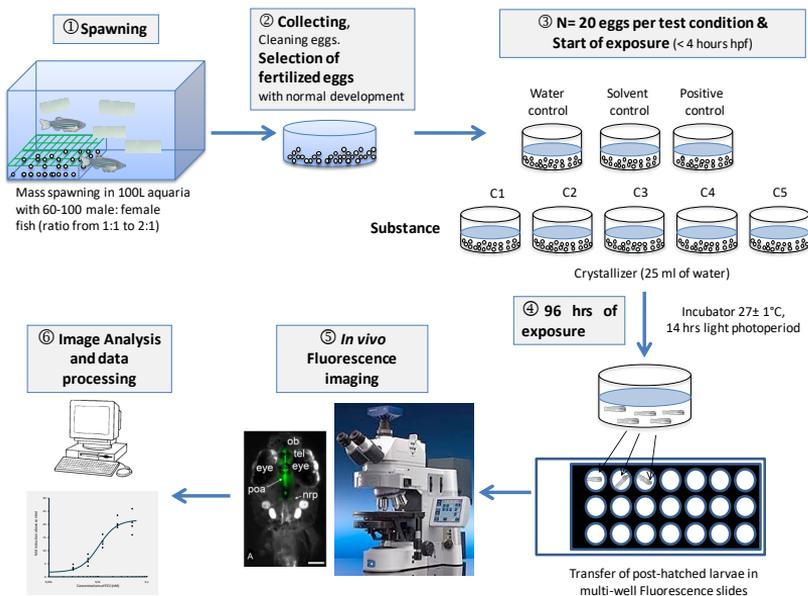
Jeudi 13 juin 2024 ● Maison de la RATP - Paris 12





Qu'est-ce que le test EASZY?

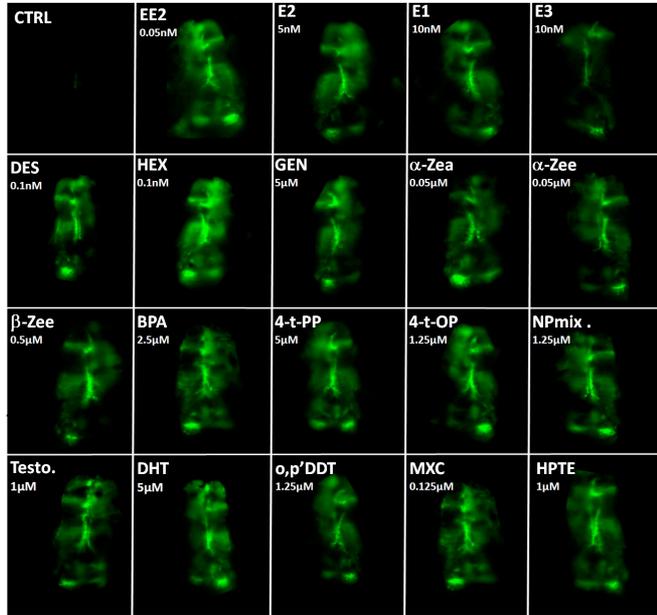
- EASZY= Detection of Endocrine Active Substances, acting through estrogen receptors, using transgenic *tg(cyp19a1b:GFP)* Zebrafish embrYos



- Un test *in vivo* non invasif basé sur le mécanisme d'action des substances qui répond au besoin de développements de méthodes alternatives
- Réalisé sur des embryons de poisson zèbre transgéniques *tg(cyp19a1b:GFP)* depuis la fécondation jusqu'à 4 jours post-fécondation (test non soumis à l'expérimentation animale selon la Directive 2010/63/EU)
- Un test rapide (4 jours) utilisant de faibles volumes d'eau, i.e. adapté au criblage des substances
- Un test sensible, robuste, spécifique et quantitatif
- Seul test informant des effets endocriniens des substances dans le cerveau chez les vertébrés

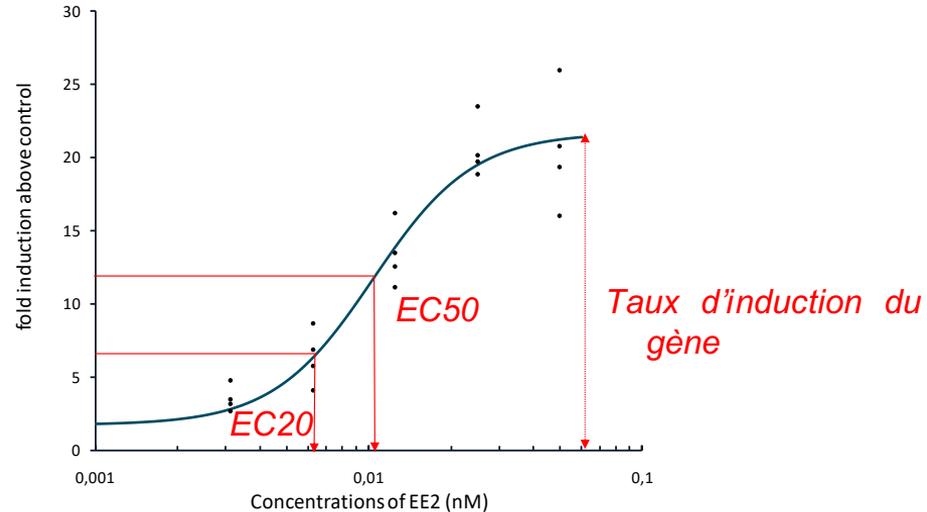
EASZY : quantification de l'activité oestrogénique des substances

- Imagerie in vivo du gène *cyp19a1b* dans le cerveau par des substances oestrogéniques



Brion et al., Plos One 2012 (ANR NEED)

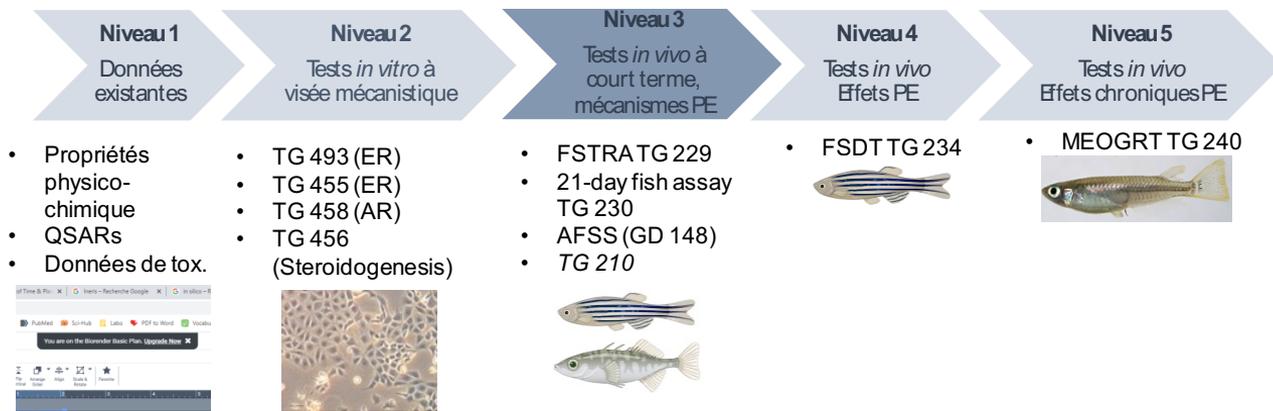
- Quantification de l'activité oestrogénique



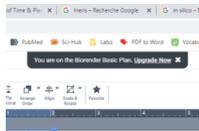
EC50 de l'EE2 = 10 pM (2,5 ng/L)

Validation du test à l'OCDE et adoption de la ligne directrice à l'OCDE

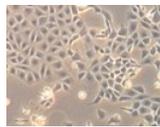
Cadre conceptuel pour les PE: 5 niveaux de tests fournissant chacun des informations pour l'évaluation des dangers et des risques PE des substances chimiques



- Propriétés physico-chimique
- QSARs
- Données de tox.



- TG 493 (ER)
- TG 455 (ER)
- TG 458 (AR)
- TG 456 (Steroidogenesis)



- FSTRAT TG 229
- 21-day fish assay TG 230
- AFSS (GD 148)
- TG 210



- FSDT TG 234

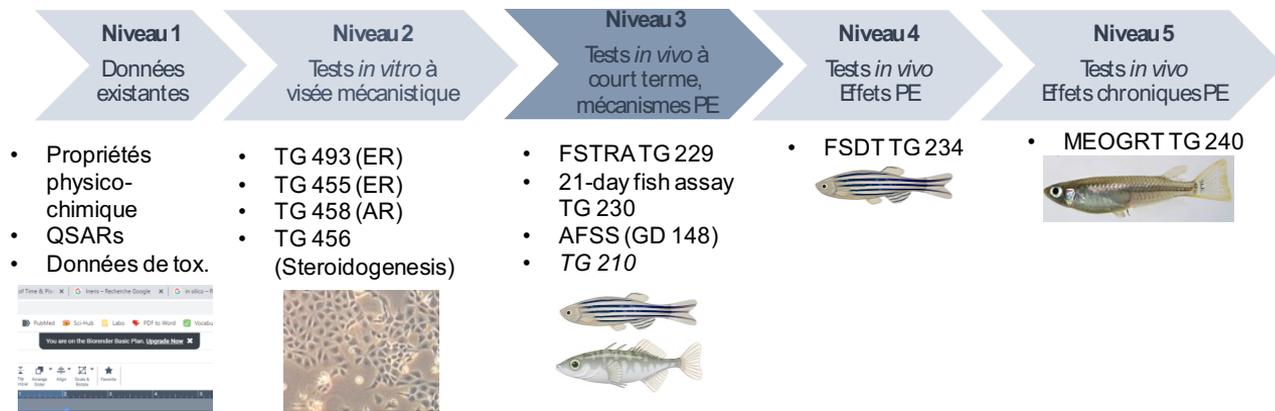


- MEOGRT TG 240



Validation du test à l'OCDE et adoption de la ligne directrice à l'OCDE

Cadre conceptuel pour les PE: 5 niveaux de tests fournissant chacun des informations pour l'évaluation des dangers et des risques PE des substances chimiques



- Développer des **tests de criblage *in vivo* rapides, sensibles, peu coûteux**
- Tenir compte de considérations éthiques: **méthodes alternatives à l'expérimentation animale**

Un processus avec des étapes clés...

1. **Soumission d'une SPSF** (Standard Project Submission Form) et discussions pour une **inscription du projet au programme de travail des lignes directrices** (WNT)
2. **Validation de la méthode** (VMG-ECO; Document Guide 34)
 - **Phase 1:** Démonstration de la transférabilité de la méthode, de sa répétabilité et de sa reproductibilité entre différents laboratoires (4 laboratoires publics européens – France, Angleterre, Allemagne et 1 laboratoire privé)
 - **Phase 2:** Pertinence et fiabilité de la méthode à identifier des molécules actives et inactives (test en aveugle)
3. Rédaction du **projet de ligne directrice** (but de la méthode, protocole d'essai, critères de validité et d'acceptabilité de l'essai, interprétation des données), phase de commentaires publics & **soumission de la ligne directrice pour adoption** (WNT)

Un processus avec des étapes clés...qui s'opèrent sur plusieurs années!



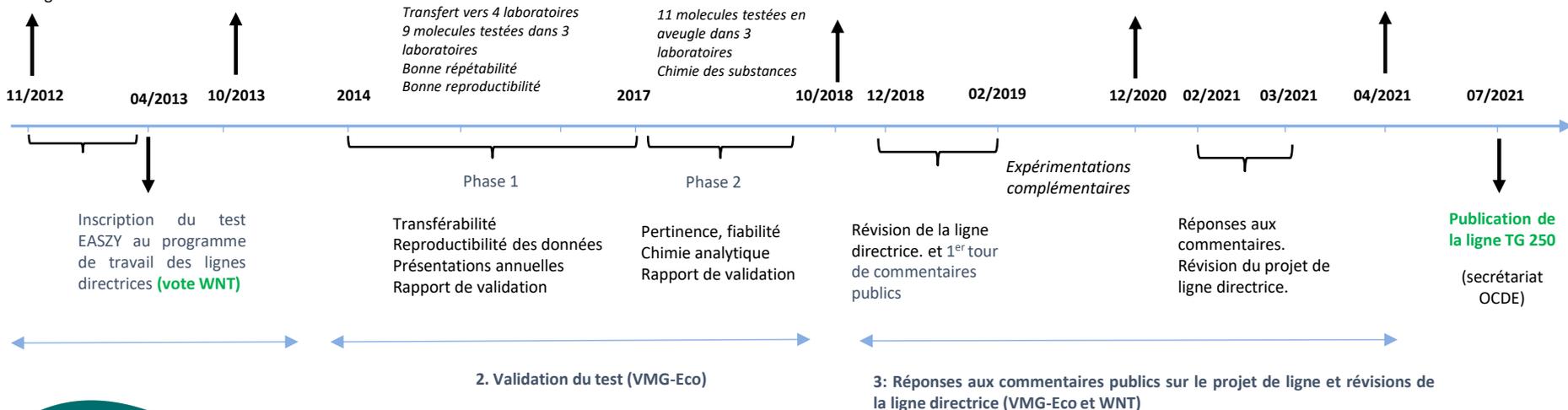
VMG-ECO
Soumission d'une
SPSF (Standard
Project Submission
Form) au programme
des lignes directrices

Présentation du
programme de
validation du test à
VMG-Eco

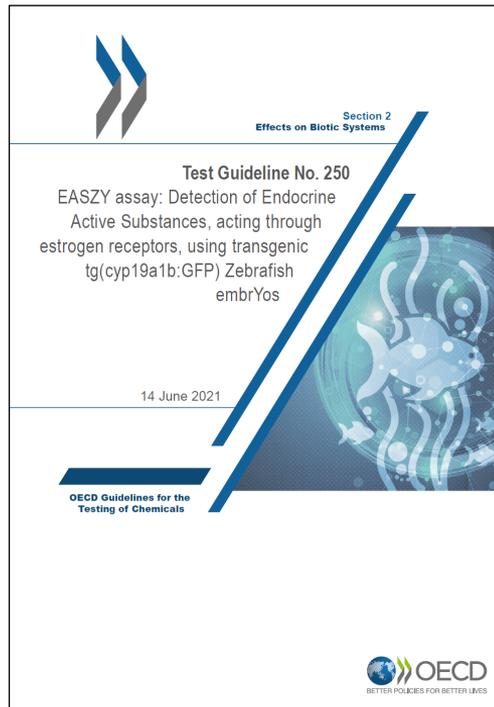
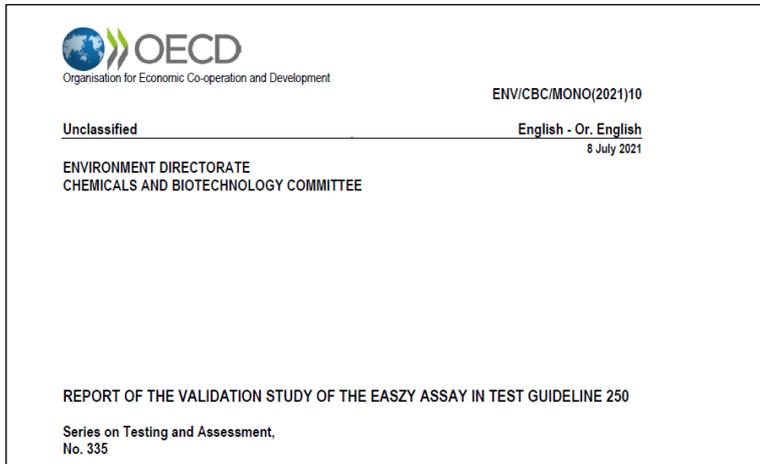
Rédaction d'un projet
de ligne directrice et
tour de commentaires
au sein de VMG-ECO

Réponses aux commentaires et
révision de la ligne directrice.
Soumission du projet de ligne
directrice pour un 2^{ème} tour de
commentaires publics

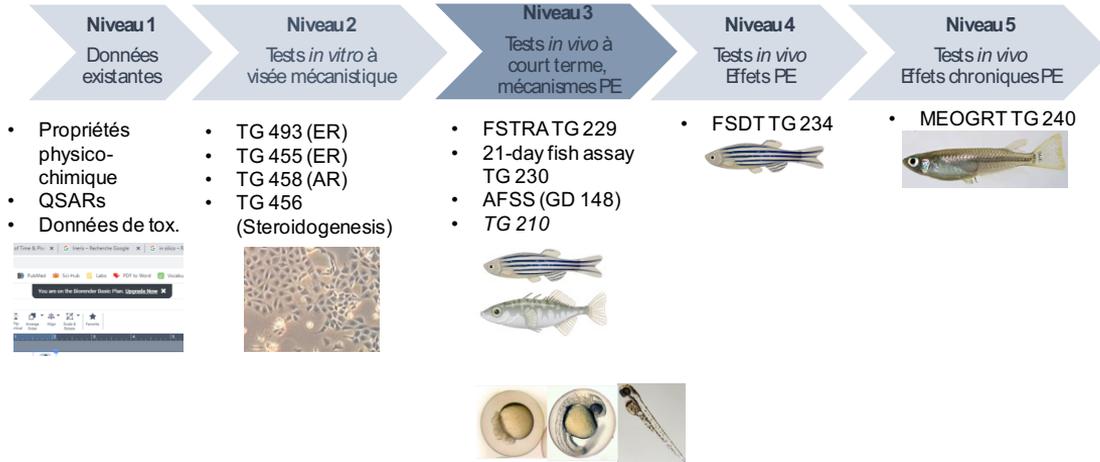
soumission de la ligne
directrice à l'approbation
des coordinateurs
nationaux. **Adoption de la
ligne (décision WNT)**



Publication du rapport de validation et de la ligne directrice N°250



Place du test dans le cadre conceptuel pour les PE de l'OCDE



OECD Series on Testing and Assessment



Revised Guidance Document 150 on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption



LD N° 250 = 1^{er} essai sur embryon de poisson pour les PE (activité oestrogénique); test de niveau 3 (danger)

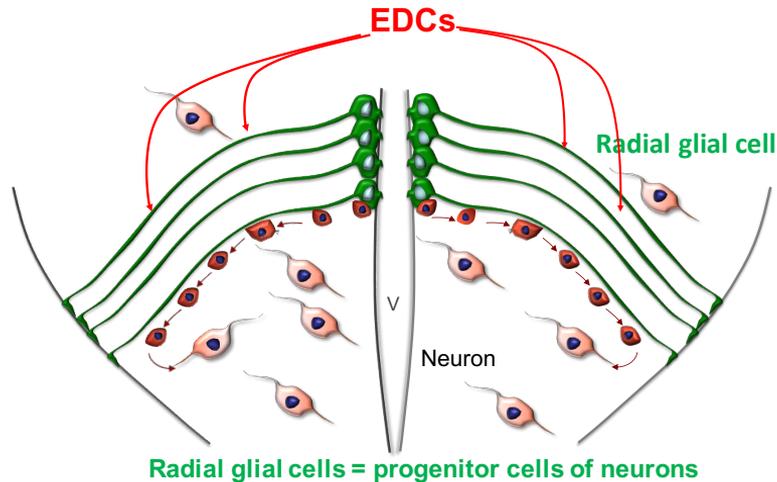
Document Guide révisé 150 ; Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption

LD N° 250: un essai pour l'expertise et la recherche

- Un essai reconnu internationalement (acceptation mutuelle des données issues du test EASZY) qui vient en appui aux politiques publiques et aux réglementations pour les substances dans les pays membres de l'OCDE

LD N° 250: un essai pour l'expertise et la recherche

- Un essai reconnu internationalement (acceptation mutuelle des données issues du test EASZY) qui vient en appui aux politiques publiques et aux réglementations pour les substances dans les pays membres de l'OCDE
- EASZY: seul essai permettant d'évaluer les réponses endocrines des substances dans le cerveau dans un modèle de vertébré aquatique. Quelle(s) conséquences (eco)toxicologiques d'une perturbation de l'aromatase B? Peut-on évaluer le risque des PE à l'aide du test EASZY?



anr[®]

PROOFS

(Vaillant et al., 2020)

FEATS

REPUBLIQUE
FRANÇAISE
Liberté
Égalité
Fraternité

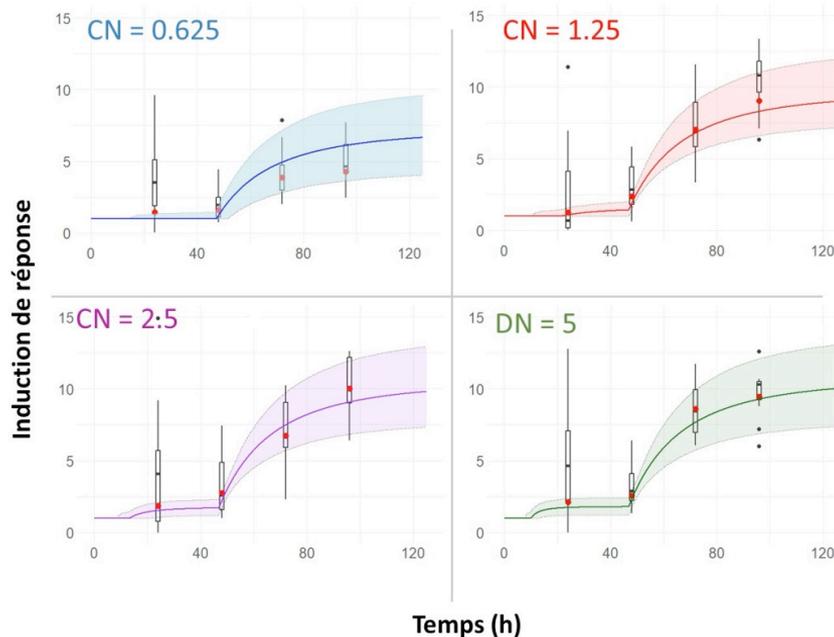
anr[®] FRANCE
2030

anses

Quelques résultats marquants

1. Développer des modèles permettant de mieux caractériser l'exposition des embryons et les effets sur l'aromatase B : Modèle PBPK pour les PE agissant sur l'aromatase B chez les embryons (Billat et al., 2022, 2023) et modèle PBPK-TD (Beaudouin et al., in prep)

Prédictions versus observations de la dynamique d'inductions de l'aromatase B au cours du développement embryonnaire en fonction du temps et des concentrations en BPA (mg/L)

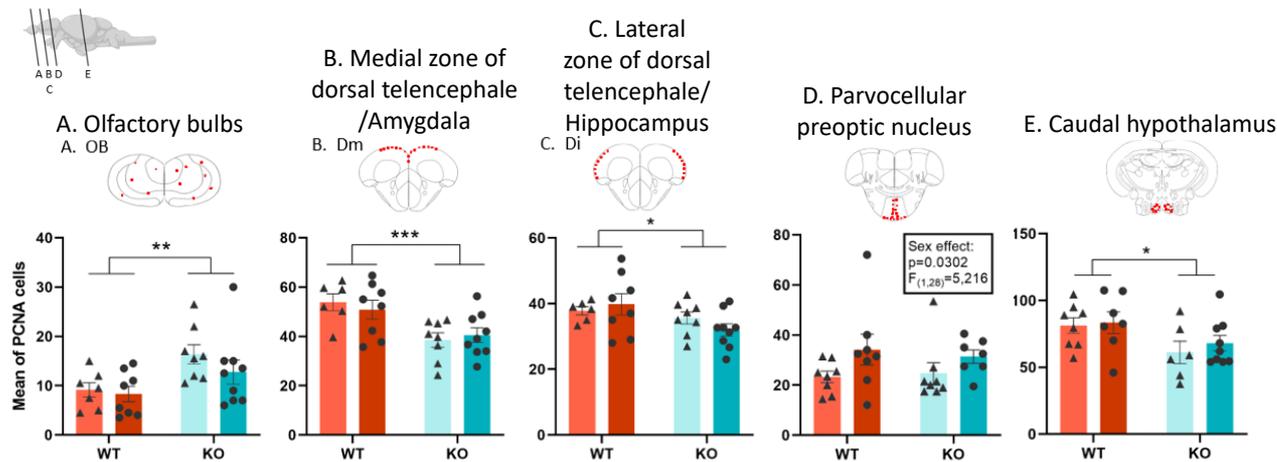


Quelques résultats marquants

1. Développer des modèles permettant de mieux caractériser l'exposition des embryons et les effets sur l'aromatase B :
Modèle PBPK pour les PE agissant sur l'aromatase B chez les embryons (Billat et al., 2022, 2023) et modèle PBPK-TD (Beaudouin et al., in prep)

2. Effets neuro-développementaux

La délétion de l'aromatase B a des effets différents sur la prolifération cellulaire en fonction des régions investiguées



Quelques résultats marquants

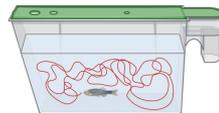
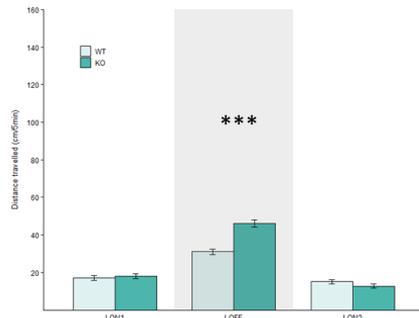
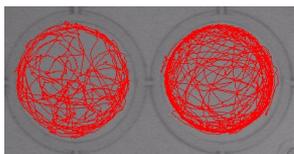
1. Développer des modèles permettant de mieux caractériser l'exposition des embryons et les effets sur l'aromatase B : Modèle PBPK pour les PE agissant sur l'aromatase B chez les embryons (Billat et al., 2022, 2023) et modèle PBPK-TD (Beaudouin et al., in prep)

2. Effets neuro-développementaux

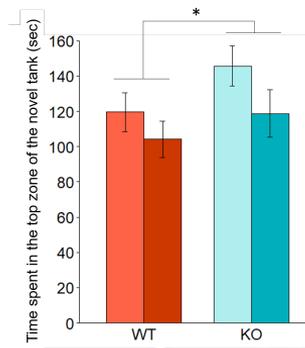
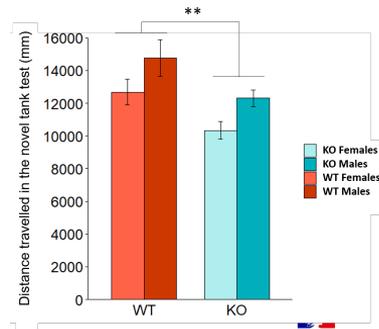
3. **Réponses comportementales chez les embryons et les adultes**: pas de relation entre induction de l'aromatase B par un panel de molécules actives (Christophe et al., 2023) et les réponses comportementales des embryons (Blanc-Legendre et al., 2023) ; Modifications comportementales en l'absence d'aromatase B fonctionnelle



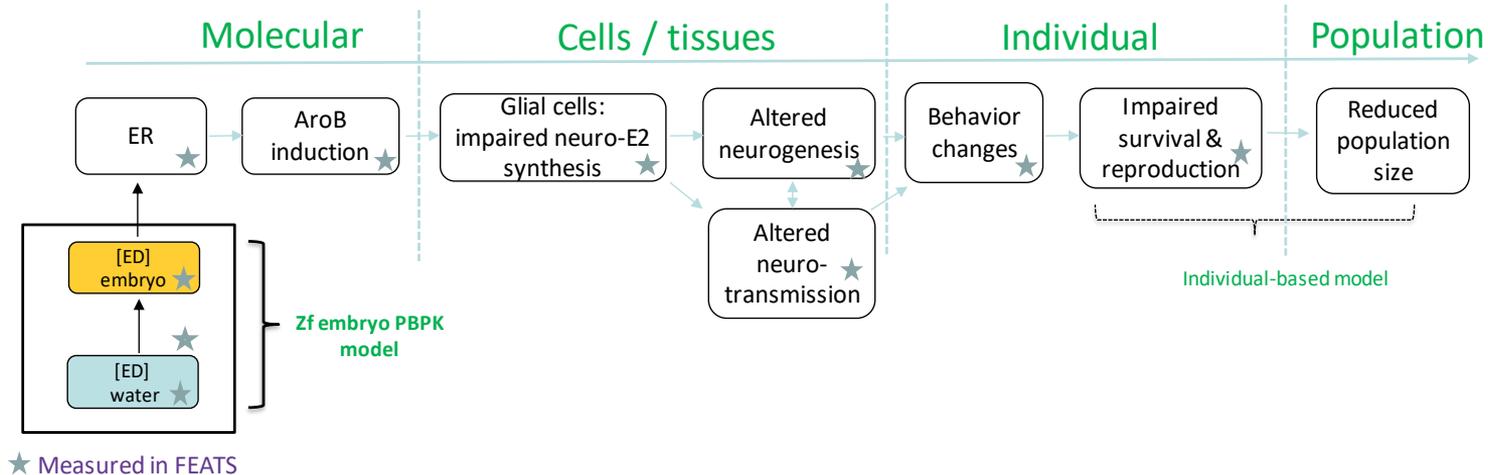
Larves *cyp19a1b*^{-/-}: hyperactivité



Diminution de l'activité et de l'anxiété

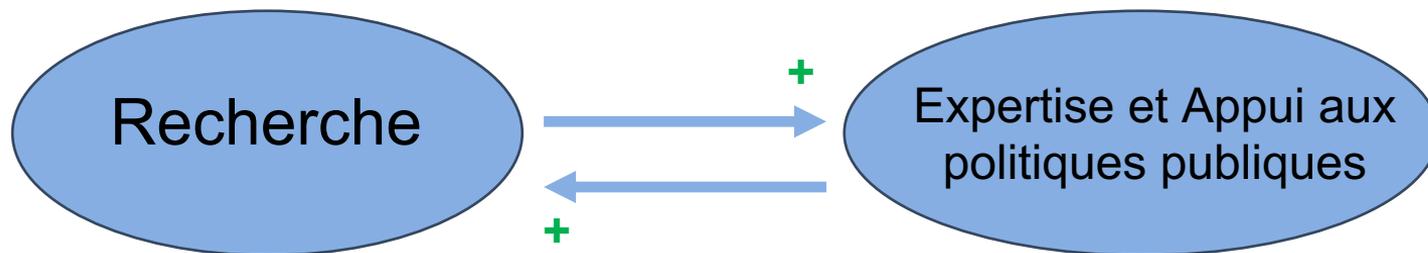


LD N° 250: un test pour évaluer le risque?



anr[®]
FEATS

Conclusions



Remerciements



INERIS

Unité ESMI

- Nathalie Hinfray
- Sélim Aït-Aïssa
- Pascal Pandard
- Benjamin Piccini
- Cyril Turies
- Armelle Christophe (thèse FEATS)
- Mélanie Vosges (thèse NEED)
- Clémentine Garoche (thèse PROOFS)

INRAE



- Xavier Cousin
- Marie-Laure Bégout
- Mélanie Blanc-Legendre, post-doc



- Thierry Charlier
- Elisabeth Pellegrini
- Cassandra Malleret (thèse)



- Olivier KAH

université
de **BORDEAUX**



- Hélène Budzinski
- Karyn Le Menach



- Jean Stephane Joly †
- Pierre Affaticati
- Arnim Jennett
- Jean Pierre Levraud

L'ORÉAL
Recherche & Innovation

- Marc Leonard
- Noémie de Crozé

Unité TEAMS

- Rémy Beaudouin
- Pierre-André Billat

ANR NEED (CES 2008); ANR PROOFS (CESA 2012); ANR FEATS (CE34 2019)



**MINISTÈRE
DE LA TRANSITION
ÉCOLOGIQUE
ET DE LA COHÉSION
DES TERRITOIRES**

*Liberté
Égalité
Fraternité*

**RENCONTRE
SCIENTIFIQUE**

Jeudi 13 juin 2024 ● Maison de la RATP - Paris 12



Merci de votre attention!