



Adebiotech

Perturbateurs endocriniens

Session 1 : Evaluation des PE

- a) Bioanalyse et mesures*
- b) Approches in silico*
- c) Tests in vitro*
- d) Tests in vivo*

O. Foulon, Pharm D, PhD.



Comment présenter les tests in vivo?

❖ Plusieurs domaines

- Produit chimique
- Candidat médicament (activité, sécurité)
- DM, additif alimentaire, produit vétérinaire, biocides, ...

❖ Principe des 3 R

- Remplacement : in vitro, in silico, ...
- Réduction : optimisation
- Raffinement :
 - imagerie, télémétrie
 - règles éthiques et de bien être

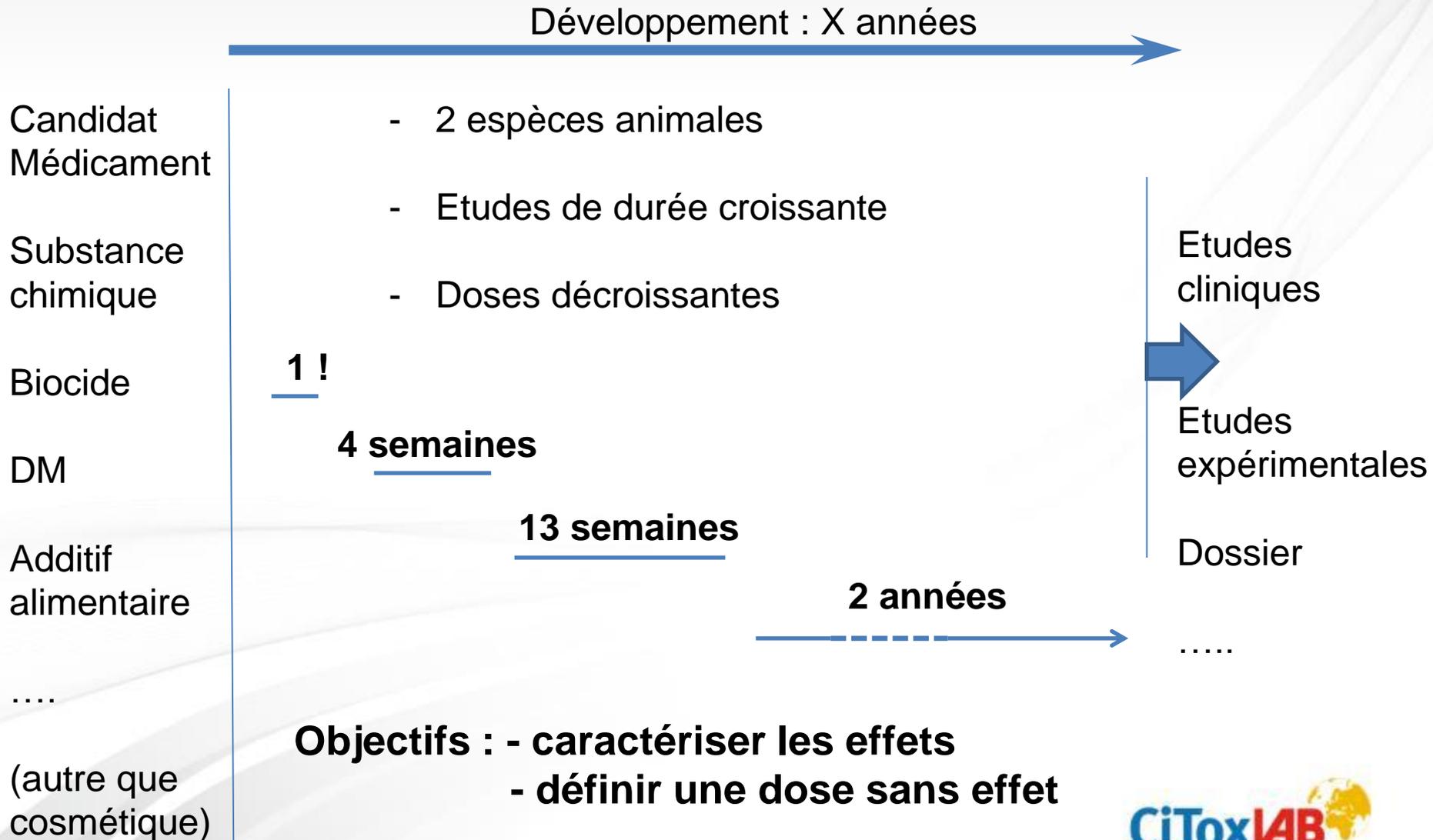
❖ Objectifs de ces tests

- Les réaliser dans des conditions réglementées
- D'identifier des effets « toxiques » d'une substance
- A certaines doses

Nb : tests d'exposition



Les tests de Toxicité Générale





Les tests de Toxicité de la reproduction

Produit chimique

Candidat médicament

OCDE

EMEA

421

Seg I

Fertilité

422

Développement
In utero

Seg II

414

Développement
post natal

415

Seg III

416

Croissance

443



Comment classer les tests in vivo

- ✓ Tests **validés** pour détecter les effets sur le système endocrinien
- ✓ Tests pour détecter les effets sur le système endocrinien
 - ✓ non complètement validés
 - ✓ non conçus principalement à cet effet
- ✓ Tests sans ligne directrice ou avec une ligne directrice mais sans objectif affiché de détecter les effets sur le système endocrinien

Code 1 à 5

3 : Données mécanistiques

4 : Effets néfastes

5 : 4 Intégrés dans le cycle de vie

- ✓ Pour chaque catégorie : 2 types de tests
 - ✓ Ceux conduits chez des mammifères
 - ✓ Ceux conduits chez des espèces « sauvages » (aquatiques)



Les tests in vivo

Validés pour détecter les effets sur le syst. end.

	Mammifères	Espèces représentant faune
3	OCDE 440 (UT assay) OCDE 441 (Hershberger assay)	OCDE 231 (amphibien) OCDE 229 (STR fish) OCDE 230 (21 D fish) OCDE 140 (stickleback)
4	US EPA 890 1500 (PP male assay) US EPA 890 1450 (PP female assay) OCDE 407 (28 D) OCDE 415 (one generation)	OCDE 234 (dev fish) OCDE 206 (avian repro)
5	OCDE 416 (Two generations) OCDE 443 (Extended one generation)	US EPA 850 1500 (fish Lifecycle)



Les tests in vivo

Pas encore validés ou non spécifiquement prévus pour détecter les effets sur le syst. end.

	Mammifères	Espèces représentant faune
4	Adult male assay OCDE 408 (90 D) OCDE 451-3 (Chronic Carc) OCDE 421 (repro screening) OCDE 422 (repro screening)	Larval amphibian growth and development (draft OCDE)
5		Medaka multi- generation (draft OCDE) Avian two-generation test (draft OCDE)



Les tests in vivo

Sans objectif primaire de détecter les effets ...

	Mammifères	Espèces représentant faune
3	Non receptor mediated hormon function (no GD)	Xenopus embryo thyroid signalling assay (No GD)
4	OCDE 414 (Prenatal Dev) OCDE 426 (Dev Neurotox)	Fish reproduction Mollusc OCDE 208-219 (Chironomid) OCDE 211 (Daphnia) OCDE 222 (Earthworm) OCDE 220 (Enchytraeid) OCDE 225 (Lumbriculus) OCDE 226 (Mite) OCDE 232 (Collembolan)
5		OCDE 233 (Chironomid) Mysid , Daphnia, Mollusc, copepod, ...



Les tests in vivo

Validés pour détecter les effets sur le syst. end.

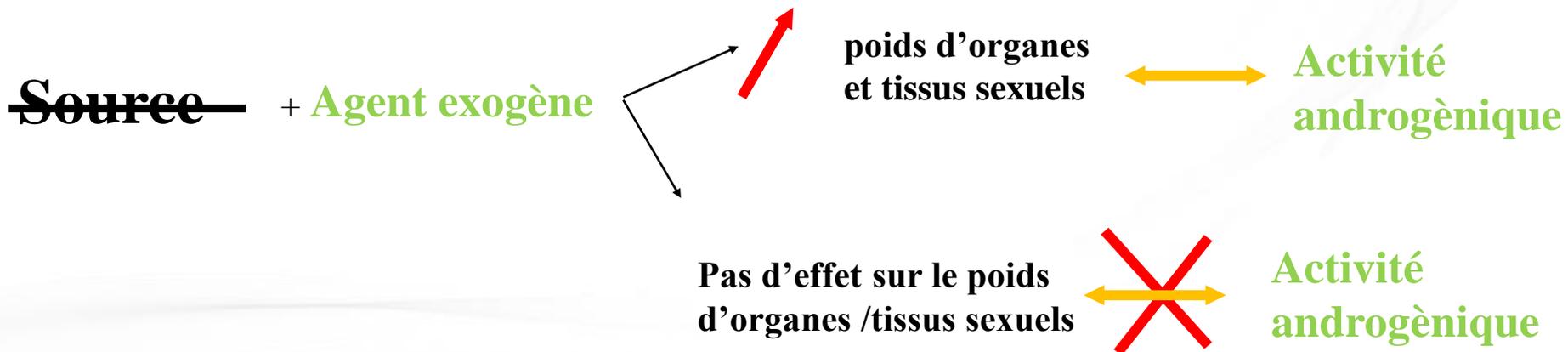
Mammifères	Espèces représentant faune
OCDE 440 (UT assay) OCDE 441 (Hershberger assay)	OCDE 231 (amphibien) OCDE 229 (CT R poisson) OCDE 230 (21 D poisson) OCDE 140 (épinouche)
US EPA 890 1500 (PP male assay) US EPA 890 1450 (PP female assay) OCDE 407 (28 D)	OCDE 234 (Sdev poisson) OCDE 206 (repro oiseaux)
OCDE 415 (one generation) OCDE 416 (Two generations) OCDE 443 (Extented one generation)	US EPA 850 1500 (poisson Lifecycle)



Test de Hershberger : principe

Rappel:

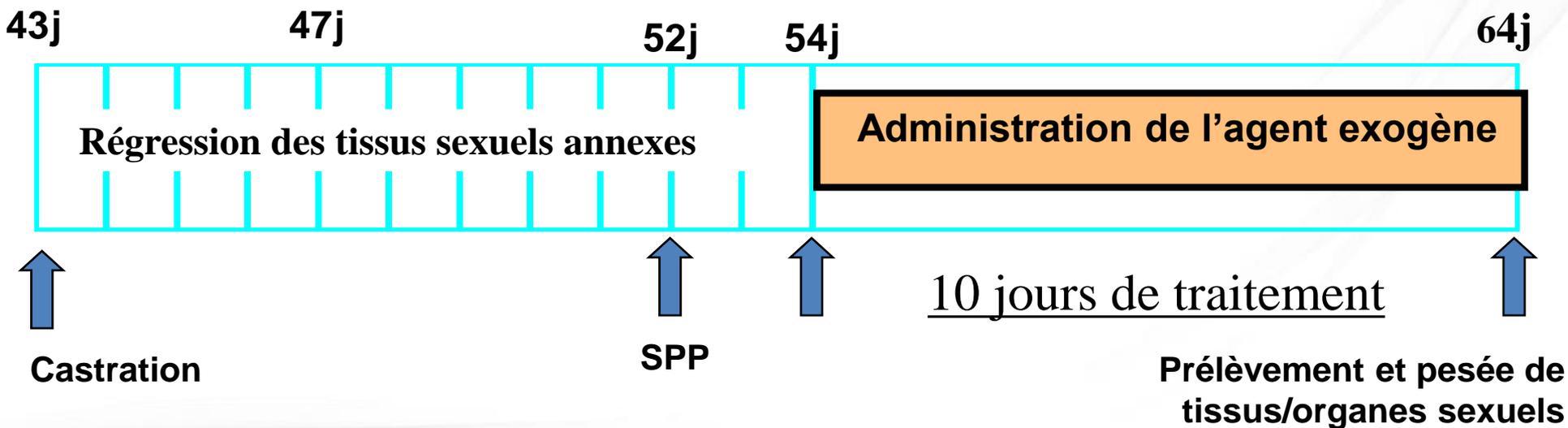
Androgènes endogènes \longrightarrow Organes /tissus du système reproducteur mâle



Modèle: Détecter une substance de type androgénique



Test de Hershberger : principe



Earl Gray, Johnathan Furr and Joseph Ostby; EPA

Etude de Toxicité de 28 jours – OCDE 407

-Exposition quotidienne

-Principaux paramètres

-*In vivo* : cycles œstraux

-Biologie clinique avec bilan thyroïdien

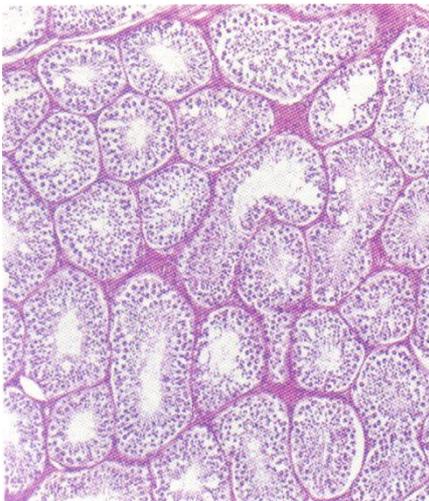
-Histopathologie : 42 organes dont

-mâle : prostate, épидидyme, vésicules séminales et testicules

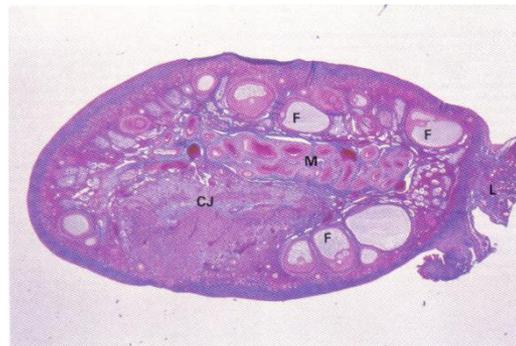
-femelle: glandes mammaires, ovaires, utérus et vagin

-glandes surrénales, hypophyse, thyroïde

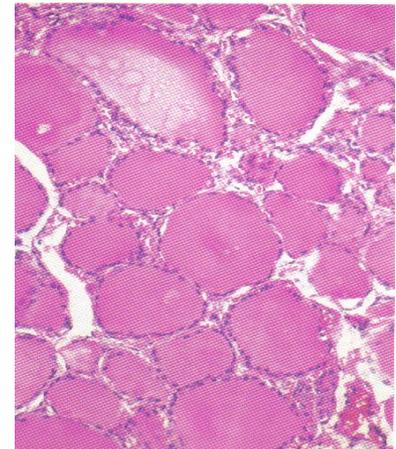
Testicule



Ovaire



Thyroïde





Un exemple de résultat dans une étude de Toxicité réglementaire

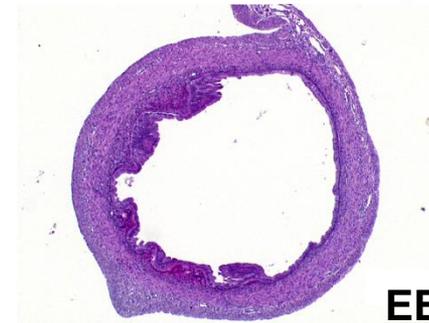
- Examen à l'autopsie
 - Ex. uterus
 - hypertrophie et contenu liquidien)



- Examen microscopique
 - Ex: utérus
 - hypertrophie et hyperplasie



Control



EE (10 µg/kg)

EE (10 µg/kg)



OCDE 416 (multigeneration)

OCDE 443 (extended one generation)

	Croissance										Accouplement			Gestation			Lactation		
Génération P	-10	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Mâles																			
Femelles																			

	Croissance										Accouplement			Gestation			Lactation		
Génération F1	-10	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Mâles																			
Femelles																			



OCDE 416 (multigeneration) OCDE 443 (extended one generation)

	Oestrogenic		Androgenic	
	Agonist	Antagonist	Agonist	Antagonist
Œstrus cyclicity	+ /- P F1	+ /- P F1		
Anogenital distance	+/-	+/-	+/-	+/-
Vaginal opening	-	+ /-		
Preputial separation	+	+ /-	+ /-	+
Organ weight	N=8 P F1	N=8 P F1	N=8 P F1	N=8 P F1
Histology	N=9	N=9	N=9	N=9
Sperm analysis n=3	- P F1	- P F1	+ /- P F1	+ /- P F1
Genital abnormalities	+	+	+	+



OCDE 416 (multigeneration) OCDE 443 (one extended generation)

Endpoints for Thyroid-related activity	Endpoints for seroidogenese related activity	Indicative, not diagnostic
Thyroid weight	Distance Anogenital	Organs weight Histopathology Time to mating Male fertility Female fertility Dystocia Gestation length Number of CL Number of implantations Number of ov foll Post impla loss Litter size Viability and survival Sex ratio Abnormalities Immuno+Neuro endocrine modulation
Liver Weight	Estrus cyclicity	
Histopathology Thyroid	Vaginal opening	
+ T4 TSH	Preputial separation	
	Organs weight N=8 P F1	
	Histology N=9	
	Genital abnormalities	



Les segments I, II et III

		Croissance									Gestation			Lactation											
		10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	1	2	3	1	2	3	1	2	3	4	5	6	7	8
Seg I	Mâle	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■												
	Femelle						■	■	■	■	■														
Seg II	Femelle											■													
Seg III	Femelle											■	■	■	■	■									

Périodes différentes de traitement/d'exposition:

- cibles potentielles
- effets potentiels



Le segment III

		Gestation		Lactation			Croissance								Accouplement			Gestation	
		2	3	1	2	3	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	1	2
Segment III	Femelle																		

Distance ano-génitale
Descente testiculaire
Présence des mamelons
Séparation préputiale
Ouverture vaginale
Malformations externes

Survie post natale
Evolution pondérale

Suivi des cycles oestriques
-durée de cycle,
-durée de phases

Nombre de jours en accouplements,
Taux d'accouplements, de fertilité
et de gestation

Poids d'organes
Histologie des organes reproducteurs, thyroïdienne, de nombreux organes...
Nombre de corps jaunes, (ovaires) implantations utérines, implants, statut de viabilité.



Conclusion d'une étude?

Forte dose
Effetsadverse

?

De l'effet observé dans une étude
à la notion de PE

Particularités des PE

- Pas d' effet seuil
- Pas simple proportionnalité dose/réponse
-

Faible dose
Dose sans effet : NOAEL

/ par ex par un
facteur de 100

Niveau de sécurité pour
l'Homme et La faune

Non testée
seule

?

Testée
en mélange

?



Plus complexe

Il n'y a pas une étude mais plusieurs études

Une batterie de tests

- In vitro
- In vivo
 - > 45 tests
 - nombreux paramètres

Identification

- Action sur le système endocrinien
- Effets adverse (cycle de la vie)

Identification du Danger

Et après ?

Merci pour votre attention

Merci au Dr F Spezia,
Directeur du département de reprotoxicologie

