



Perturbateurs Endocriniens

Enjeux industriels, de santé et d'environnement

8 juillet 2014

Parc Technologique Biocitech, Romainville



Colloque Adebitech



Perturbateurs Endocriniens

*Enjeux industriels, de santé et
d'environnement*

8 juillet 2014
Parc Biocitech
93230 Romainville



<http://adebiotech.org/pert/>

Colloque Adebiotech

**Perturbateurs Endocriniens : Enjeux industriels,
de santé et d'environnement**

8 juillet 2014

Parc Technologique Biocitech, Romainville

Table des matières

Préface	6
Programme détaillé	8
9h30 Session 1 : Evaluation des perturbateurs endocriniens (PE)	8
15h00 Session 2 : Stratégie nationale sur les perturbateurs endocriniens	9
16h00 Session 3 : Point de vue des filières industrielles	9
17h45 Session 4 : Quelles propositions pour fédérer les acteurs et construire le futur ? ...	10
Résumés des Conférences et Communications Orales.....	11
<i>BRUNO TISSERAND – VEOLIA</i>	<i>11</i>
<i>SELIM AIT-AISSA - INERIS.....</i>	<i>12</i>
<i>RAPHAËL SERREAU - RESEAU MEDIC-AL, HOPITAL NECKER PARIS.....</i>	<i>12</i>
<i>BRUNO CORMAN - PROFILOMIC</i>	<i>13</i>
<i>AMELIE GUILLON - SUEZ ENVIRONNEMENT.....</i>	<i>14</i>
<i>SYLVAIN ENGUEHARD - NOVAKITS</i>	<i>14</i>
<i>JAMES DEVILLERS - CTIS</i>	<i>15</i>
<i>PATRICK BALAGUER - INSERM</i>	<i>16</i>
<i>GUILLAUME MARTIN - KALLISTEM</i>	<i>16</i>
<i>MARKUS KAMBER - XENOMETRIX AG</i>	<i>17</i>
<i>SORIA ELADAK - INSERM U 967/CEA/UNIVERSITE PARIS DIDEROT.....</i>	<i>18</i>
<i>MARIEM LAAMARI - LIENSS UNIVERSITE DE LA ROCHELLE.....</i>	<i>19</i>
<i>OLIVIER FOULON - CITOXLAB.....</i>	<i>20</i>
<i>FRANÇOIS BRION - INERIS</i>	<i>20</i>
<i>ANTHONY SÉBILLOT - WATCHFROG.....</i>	<i>21</i>
<i>JEAN-BAPTISTE FINI - UMR 7221 CNRS.....</i>	<i>22</i>
<i>STEFFEN SCHNEIDER - BASF</i>	<i>22</i>
<i>GILBERT BARBIER - SENATEUR.....</i>	<i>23</i>
<i>JORDANE WODLI - DGPR/MEDDE</i>	<i>24</i>
<i>PHILIPPE HUBERT – INERIS.....</i>	<i>25</i>
<i>PATRICK LEVY - MEDEF.....</i>	<i>26</i>
<i>ANNE GOURMELON - OCDE</i>	<i>27</i>
<i>SEBASTIEN LOUIS-ROSE – AFNOR.....</i>	<i>28</i>
<i>MARION GUST - MEDDE</i>	<i>28</i>
<i>CORINNE BENOLIEL - SCIENTIS.....</i>	<i>29</i>
<i>BRUNO TISSERAND – VEOLIA (VOIR PAGE 11).....</i>	<i>30</i>
<i>PATRICK LEVY - UIC.....</i>	<i>30</i>
<i>MICHEL LOUBRY - PLASTICSEUROPE</i>	<i>33</i>
<i>DENIS REQUIER - POLEPHARMA.....</i>	<i>34</i>
<i>MICHEL URTIZBEREA - IUPP</i>	<i>34</i>
<i>ADAMA TRAORE - LVMH</i>	<i>36</i>
<i>BEATRICE DE REYNAL - CLUB PAI-FOOD INGREDIENTS</i>	<i>37</i>

Résumés des posters..... 38

<i>Bruno CORMAN – Profilomic (voir page 13)</i>	38
<i>Mathilde MUNIER - Inserm1083 - Cnrs6214</i>	38
<i>Kaynoush NARAGHI - POLYINTELL</i>	39
<i>Amélie GUILLON - Suez Environnement (voir page 14)</i>	39
<i>Véronique LE TILLY - LIMATB-EG2B Université de Bretagne-Sud</i>	40
<i>Sylvain ENGUEHARD - NOVAKITS (voir page 14)</i>	40
<i>Raphaël SERREAU - Hôpital Necker Paris (voir page 12)</i>	41
<i>Delphine PILLON - INRA</i>	41
<i>Tiphany GRISIN - UMR 967 labo LDG</i>	42
<i>Tzutzuy RAMIREZ - BASF SE Experimental Toxicology and Ecology</i>	42
<i>Guillaume MARTIN - Kallistem (voir page 16)</i>	43
<i>Markus KAMBER - Xenometrix AG (voir page 17)</i>	43
<i>Mariem LAAMARI - LIENSS- Université de La Rochelle (voir page 19)</i>	43
<i>Anthony MARCONI - VigiCell</i>	44
<i>Mohamed SKIBA - Université de Rouen</i>	45
<i>Nicolas CABATON - INRA TOXALIM</i>	45
<i>Ludovic PEYRE - INRA-TOXALIM</i>	46
<i>Patrick FÉNICHEL - INSERM/Université</i>	47
<i>Constantin DALLOT - Université de Nice - Sophia Antipolis</i>	48
<i>Soria ELADAK - INSERM U 967/CEA/Univ. Paris Diderot (voir page 18)</i>	49
<i>Marielle GUIBBOLINI - Université de Nice-Sophia Antipolis</i>	49
<i>Christine RISSO-DE-FAVERNEY - Université de Nice-Sophia Antipolis</i>	49
<i>Sylvie BABAJKO - INSERM</i>	50
<i>David DU PASQUIER - WatchFrog</i>	51
<i>Anthony SÉBILLOT – WatchFrog (voir page 21)</i>	51
<i>Mohamed BENAHMED - Inserm</i>	51
<i>Jean-Baptiste FINI - UMR 7221 CNRS (voir page 22)</i>	52
<i>Steffen SCHNEIDER – BASF</i>	52

Parcours des intervenants et des membres des comités..... 54

<i>Selim AÏT-AÏSSA, INERIS</i>	54
<i>Patrick BALAGUER, DR2 INSERM, IRCM INSERM U896 Montpellier</i>	54
<i>Gilbert BARBIER, SÉNAT</i>	54
<i>Robert BAROUKI, Inserm</i>	55
<i>Corinne BENOLIEL, Scientis</i>	55
<i>François BRION, INERIS</i>	55
<i>Bruno CORMAN, Profilomic</i>	56
<i>Olivier DELMAS, INERIS</i>	56
<i>Béatrice DE REYNAL, Club PAI-Food Ingredients</i>	56
<i>James DEVILLERS, CTIS</i>	56
<i>Soria ELADAK, INSERM/CEA/Univ. Paris Diderot</i>	57
<i>Sylvain ENGUEHARD, NOVAKITS</i>	57
<i>Jean-Baptiste FINI, CNRS</i>	57
<i>Olivier FOULON, CitoxLab</i>	58
<i>Anne GOURMELON, OCDE/OECD</i>	58
<i>Amélie GUILLON, Suez Environnement</i>	58
<i>Marion GUST, MEDDE</i>	58
<i>Philippe HUBERT, INERIS</i>	59
<i>Markus KAMBER, Xenometrix AG</i>	59
<i>Mariem LAAMARI, LIENSS- Univ.de La Rochelle</i>	60
<i>Danielle LANDO, Adebiotech</i>	60

<i>Grégory LEMKINE, WatchFrog</i>	60
<i>Patrick LEVY, UIC</i>	60
<i>Michel LOUBRY, PlasticsEurope</i>	61
<i>Sébastien LOUIS-ROSE, AFNOR</i>	61
<i>Francelyne MARANO, Université Paris Diderot / FRANCOPA</i>	61
<i>Guillaume MARTIN, Kallistem</i>	61
<i>Jean-Roch MEUNIER, Medicen Paris Region</i>	62
<i>Jean PACHOT, Oroxcell</i>	62
<i>Marc PALLARDY, Université Paris Sud, SPTC</i>	62
<i>Denis REQUIER, Polepharma</i>	63
<i>Steffen SCHNEIDER, BASF</i>	63
<i>Anthony SÉBILLOT, WatchFrog</i>	63
<i>Raphaël SERREAU, Hôpital Necker Paris</i>	63
<i>Bruno TISSERAND, Veolia</i>	64
<i>Adama TRAORE, LVMH</i>	64
<i>Michel URTIZBEREA, BASF</i>	65
<i>Jordane WODLY DGPR/MEDDE</i>	65
<i>Aurelio ZERIAL, Institut Gustave Roussy</i>	65
Sponsor	67



Préface

ADEBIOTECH est heureuse de vous accueillir au colloque qu'elle organise avec l'**INERIS**

Perturbateurs Endocriniens, Enjeux industriels, de santé et d'environnement,

Il est maintenant admis que les perturbateurs endocriniens (PE) sont associés à l'accroissement des maladies chroniques (cancers hormono-dépendants, diabète, atteinte à la fertilité et à l'appareil de reproduction, troubles neurologiques,...).

Les perturbateurs endocriniens sont omniprésents dans l'environnement et ont des impacts sur la faune en particulier dans les milieux aquatiques (féminisation des poissons).

Comment y faire face ? La France, novatrice en santé environnement, est dotée depuis le 29 avril 2014 d'une Stratégie Nationale sur les Perturbateurs Endocriniens (SNPE)*, pour les détecter, prédire et mesurer leurs effets, réduire ou éviter les expositions notamment vers les populations sensibles. La réglementation se précise au niveau européen avec la parution le 17 juin 2014 de la feuille de route de la commission européenne sur les PE**.

Pour la première fois, ce colloque rassemble les laboratoires publics et privés actifs dans l'évaluation et la surveillance des PE d'une part, et les industriels confrontés à la gestion de ces risques d'autre part. Une activité économique nouvelle émerge autour des innovations dans les tests de bioanalyse, de mesure physico-chimique, *in silico*, *in vitro* ou *in vivo*.

Le comité d'organisation vous propose une première session scientifique, pour permettre à chacun de mesurer la qualité de la recherche et de présenter les tests de demain. Nous remercions tout particulièrement Madame le Pr Francelyne Marano, présidente de cette session, qui nous a beaucoup aidés.

Le comité scientifique a sélectionné 29 communications. Dans son choix, il a eu à cœur d'équilibrer chaque sous-session par des communications orales d'équipes académiques et industrielles, portant sur les différents systèmes hormonaux. Les sessions « Posters

/ affiches », qui se déroulent pendant les pauses, doivent tout autant retenir l'attention des congressistes.

La deuxième session a pour but de donner un éclairage sur la mise en œuvre de la SNPE. De quelle recherche et de quels tests a-t-elle besoin ? Comment s'assurer de la pertinence et de la qualité des tests proposés ou à développer ? Comment les faire reconnaître, avec quelles exigences, quels appuis techniques, financiers ? Comment fédérer les acteurs pour répondre aux objectifs ?

Les industriels confrontés aux exigences de santé, de protection de l'environnement et de réglementation sont invités à prendre la parole au cours de la troisième session. Ils présentent les questionnements propres à leur filière sur les PE, leur stratégie pour y répondre, leurs besoins en tests et leurs attentes.

Sur la base de questions soumises et des propositions recueillies auprès de vous avant et pendant cette journée, chacun est invité à participer au débat, tant de la tribune que de la salle. L'ensemble du colloque est enregistré, afin de rédiger des actes. Tout ne pourra bien sûr pas être dit, tellement le sujet est vaste, mais cette initiative servira de support pour continuer.

Nous souhaitons que ce premier colloque fondateur permette des échanges fructueux et favorise des collaborations entre tous ceux qui sont impliqués dans cette thématique.

C'est un défi qu'il faut réussir.

Nous remercions tous ceux qui nous ont aidés à monter ce colloque, le personnel d'Adebiotech, Biocitech, les membres du comité d'organisation et du comité scientifique, le Ministère de l'Ecologie, du Développement Durable et de l'Energie, et le Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, pour leur parrainage, la société BASF, les intervenants et l'ensemble des participants.

Nous vous souhaitons un excellent colloque.

Danielle Lando
Vice-présidente ADEBIOTECH

Olivier Delmas
Direction scientifique INERIS

* http://www.developpement-durable.gouv.fr/IMG/pdf/2014-04-29_Strategie_Nationale_Perturbateurs_Endocriniens.pdf

** http://ec.europa.eu/smart-regulation/impact/planned_ia/docs/2014_env_009_endocrine_disruptors_en.pdf

Programme détaillé

Avec la participation du Sénateur *Gilbert BARBIER*

8h00 Accueil café

8h45 **Bienvenue, Danielle LANDO**, Vice-présidente, Adebitech

8h50 **Objectifs, Jean PACHOT**, Président et Directeur Scientifique, Oroxcell

9h00 **Conférence introductive, Robert BAROUKI**, Directeur de l'unité pluri-équipes, INSERM - Univ. Paris 5

9h30 **Session 1 : Evaluation des perturbateurs endocriniens (PE)**

Présidente de la Session : *Francelyne MARANO*, Professeur, Univ. Paris Diderot et Présidente de FRANCOPA

a) Bioanalyse et mesures physico-chimiques

9h30 **Etat des lieux, Bruno TISSERAND**, Directeur du programme de recherche Eaux usées, Veolia

9h45 Outils bioanalytiques et démarches EDA, **Selim AÏT-AÏSSA**, INERIS

10h00 **Raphaël SERREAU** - Réseau Médic-AI, Hôpital Necker Paris

Polluants dans le lait maternel

10h10 **Bruno CORMAN** - Profilomic

L'eau du robinet contient-elle des perturbateurs endocriniens ?

10h20 **Amélie GUILLON** - Suez Environnement

Analyse et évolution d'une diversité d'hormones dans des filières de traitement d'eau

10h30 **Sylvain ENGUEHARD** - NOVAKITS

Test ELISA de quantification des perturbateurs endocriniens dans les eaux

b) Approches in silico

10h40 **Etat des lieux, James DEVILLERS**, Directeur du CTIS

10h55-11h25 *Pause café / Posters*

c) Tests in vitro

11h25 **Etat des lieux, Patrick BALAGUER**, Directeur de Recherche, INSERM

11h40 **Guillaume MARTIN** - Kallistem

A sensitive in-vitro bio-assay to assess the potential toxicity of waters on spermatogenesis

11h50 **Markus KAMBER** - Xenometrix AG

Testing of estrogenic and androgenic reference compounds using 2 versions of the yeast-based YES and YAS assay

12h00 **Soria ELADAK** - INSERM U 967/CEA/Univ. Paris Diderot

Effets du Bisphénol A et de ses substituts sur le développement du testicule foetal

12h10 **Mariem LAAMARI** - LIENSS- Univ. de La Rochelle

Approches moléculaires des effets de toxines marines et de micropolluants sur modèles cellulaires

d) Tests *in vivo*

12h20 Etat des lieux, Olivier FOULON, Directeur des Opérations et Directeur Général Délégué, CitoxLab

12h35 François BRION - INERIS

A novel transgenic cy19a1b-GFP in vivo zebrafish embryo assay (EASZY assay) to assess the estrogenic potency of chemicals and complex environmental mixtures

12h45 Anthony SÉBILLOT - Watchfrog

Détection rapide en fluorescence des (anti-)androgènes avec une lignée medaka spiggin-gfp

12h55 Jean-Baptiste FINI - UMR 7221 CNRS

Thyroid disruption and brain development: the *Xenopus* embryo model

13h05 Steffen SCHNEIDER - BASF

Testing mixtures of endocrine disruptors in vivo at human-relevant exposure levels

13h15-14h45 Buffet / Posters

14h45 Gilbert BARBIER, Sénateur, Coordinateur du rapport sur les perturbateurs endocriniens
Perturbateurs endocriniens, le temps de la précaution

15h00 Session 2 : Stratégie nationale sur les perturbateurs endocriniens

Président de la Session : Jordane WODLI, Chargé de mission perturbateurs endocriniens du Bureau des Substances et Préparations Chimiques, DGPR/MEDDE

Jordane WODLI

Stratégie nationale sur les perturbateurs endocriniens : à l'heure de la mise en œuvre

Philippe HUBERT, Directeur des risques chroniques, INERIS

Etat des lieux de la plateforme nationale de prévalidation des PE

Patrick LEVY au nom du MEDEF

Présentation de la collaboration publique/privée

Anne GOURMELON, Responsable Sécurité des substances chimiques, OCDE

Etat d'avancement des travaux sur les tests perturbateurs endocriniens à l'OCDE et perspectives d'évolutions

Sébastien LOUIS-ROSE, Chef de projet Normalisation, AFNOR

La normalisation des tests sur des perturbateurs endocriniens

Marion GUST, Chargée de mission du programme national de recherche sur les perturbateurs endocriniens, MEDDE

Quelle recherche pour les perturbateurs endocriniens?

16h00 Session 3 : Point de vue des filières industrielles

16h00 Corinne BENOLIEL, Directrice Scientifique, SCIENTIS

Comment évaluer la sécurité d'un produit destiné aux femmes enceintes ? Expérience d'une évaluatrice de la sécurité des produits cosmétiques

16h15 Table ronde

Modérateurs : Olivier DELMAS, INERIS, Danielle LANDO, Adebitech

Veolia, **Bruno TISSERAND**

UIC, **Patrick LEVY**, Médecin conseil de l'UIC et rapporteur de la Commission Santé/Environnement

PlasticsEurope, **Michel LOUBRY**, Directeur

Polepharma, **Denis REQUIER**, Vice-Président

UIPP, **Michel URTIZBEREA**, Toxicologue responsable de l'homologation BASF

LVMH, **Adama TRAORE**, Toxicologue

Comment innover tout en étant privé d'un certain nombre de tests réglementaires validés et non encore remplacés

Club PAI-Food ingredients, **Béatrice de REYNAL**, Nutritionniste

17h15-17h45 Pause café / Posters

17h45 Session 4 : Quelles propositions pour fédérer les acteurs et construire le futur ?

Débat avec l'ensemble des participants sur la base de propositions recueillies*

Philippe HUBERT, Directeur des risques chroniques, INERIS

Jean PACHOT, Président et Directeur Scientifique, Oroxcell

Olivier FOULON, Directeur de la Toxicologie et des Opérations et Directeur Général Délégué, Ci-toxLab

Gregory LEMKINE, Co-fondateur et Président Directeur Général, Watchfrog

***Proposition 1 Disposer d'un outil d'information partagée, sur**

L'offre en tests existants ou en développement,

Les besoins en tests, dans ou hors cadre réglementaire

L'utilisation réelle et quantifiée des tests

***Proposition 2 Réaliser une étude d'analyse stratégique et de marché portant notamment sur les points suivants :**

Les évolutions réglementaires,

Les prix et la solvabilité du marché,

Les compétences et les besoins en formation des utilisateurs,

Une enquête sur les attentes des utilisateurs ou prescripteurs (agences sanitaires, les industriels, la distribution, les gestionnaires de milieux,...)

Une veille à l'échelle européenne et internationale

***Proposition 3 Accompagner la démarche de validation des tests dans le cadre du dispositif envisagé par la SNPE**

En assurant une veille des tests en développement et portés par des laboratoires ou leur structure de valorisation (cf. proposition 1)

En réunissant des experts pour sélectionner les tests à valider

En identifiant des laboratoires publics ou privés pour effectuer des essais circulaires

En mobilisant des financements publics et privés pour financer ces essais

En accompagnant les démarches de normalisation ou de reconnaissance internationale

***Proposition 4 Identifier les porteurs de ces propositions**

18h30 Conclusion

18h45 Cocktail

Comment améliorer la maîtrise des risques de diffusion des perturbateurs endocriniens ?

Bruno TISSERAND – *Veolia*

La surexploitation et la pollution des milieux naturels réduit la capacité des écosystèmes à produire et à régénérer les ressources essentielles à la vie et aux Hommes. De par ses activités et ses implantations, Veolia est un des acteurs impactant le maintien des écosystèmes aquatiques mais qui, ayant rapidement pris conscience de cela, œuvre chaque jour pour limiter ses impacts tout en protégeant et restaurant les milieux naturels afin de ressourcer le monde.

Protéger et restaurer les milieux naturels passe par une meilleure caractérisation des impacts environnementaux des activités économiques, et en particulier du traitement d'eau. En effet, les changements de pratiques sociétales, marqués notamment par l'utilisation croissante de substances pharmaceutiques, de produits d'hygiène et de soins, de pesticides... contribuent fortement à la dissémination de micropolluants. On entend par micropolluant, toute substance (minérale, biologique ou organique) qui, à des concentrations infimes dans l'eau, le sol ou l'air, peut avoir une action toxique ou écotoxique pour tout ou partie des organismes ou de l'écosystème. Fort de ce constat, un plan national d'action contre la pollution des milieux aquatiques par les micropolluants a été lancé en 2010 par le biais de la Directive Cadre sur l'Eau (DCE) afin de restaurer le bon état chimique (et écologique) des masses d'eau sur le territoire. Ce plan passe notamment par un programme de surveillance conséquent avec le suivi de plus d'une centaine de substances (RSDE) dans les milieux et les rejets dans le but de réduire les émissions de polluants à la source. Mais ceci sous-entend d'être en mesure de détecter des quantités très faibles (sensibilité des méthodes analytiques à adapter) de centaines de molécules (listes en perpétuelle incrémentation).

Pour faire évoluer ce paradigme, Veolia a choisi, en parallèle de la DCE, de s'intéresser aux effets les plus significatifs dus à la présence de micropolluants dans l'environnement, seuls ou en mélange, dans le but d'obtenir une « cartographie » des risques potentiels et non pas seulement de la présence des substances. Au jour d'aujourd'hui, la perturbation endocrinienne (effet induit sur les organes ou sur les fonctions de reproduction dans un organisme intact, chez ses descendants ou au sein d'une population, ANSES & OMS) est un des effets significativement mis en évidence les plus préoccupants. Pour autant, les outils disponibles pour caractériser ces effets sont peu nombreux, réservés à des laboratoires spécialisés et sans grille d'interprétation du résultat pour un spécialiste du traitement d'eau. En bref, on s'aperçoit d'un manque incontestable d'outils opérationnels pour la mise en évidence de ce type d'effets. Or tenter de faire changer les mentalités au niveau des instances réglementaires passe obligatoirement par la démonstration que le suivi de ces effets serait plus pertinent pour les opérationnels que la détection de molécules connues à un instant t.

Dans ce contexte, Veolia s'est associé avec Watchfrog pour tenter ensemble de combler ce manque en mettant à disposition des industriels (producteurs de micropolluants) et des collectivités (prise en compte des rejets des particuliers et des industriels) un outil de maîtrise des risques de diffusion de produits dangereux pour l'environnement. Le challenge est d'autant plus important que l'objectif est, à terme, de déployer une technologie directement sur site, afin que l'opérationnel lui-même soit en mesure de réaliser son analyse « en temps réel ».

Outils bioanalytiques et démarche EDA pour la caractérisation de perturbateurs endocriniens dans les systèmes aquatiques

Selim AIT-AISSA - INERIS

Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS), Unité Ecotoxicologie *in vitro* et *in vivo*, Verneuil en Halatte, France
Email : selim.ait-aissa@ineris.fr

Les perturbateurs endocriniens (PE) présents dans les milieux aquatiques représentent une très grande diversité de substances, tant du point des structures chimiques que de leurs modes d'actions biologiques. Cette diversité de molécules pose un réel défi en termes d'identification des causes de perturbations et de priorisation des molécules à surveiller. Dans ce contexte, de nouvelles stratégies dites bio-analytiques, combinant outils biologiques (bioessais *in vitro* et *in vivo*) et outils physico-chimiques (échantillonnage, fractionnement, analyses chimiques ciblées et non ciblées), sont développées. De par leur sensibilité, spécificité et praticité, ces approches trouvent maintenant leur application pour l'évaluation de la qualité chimique des milieux.

L'objet de cette présentation est de présenter le principe de ces approches et leurs applications pour la détection de polluants organiques présents à l'état de trace dans le milieu aquatique. Nous focaliserons notre propos sur l'utilisation des tests cellulaires *in vitro* pour caractériser l'activité PE de substances chimiques et leur détection au sein d'échantillons complexes, comme des effluents de stations d'épuration ou des sédiments et des eaux de rivière. Dans un second temps, nous présenterons l'apport de ces tests au sein d'une démarche de type EDA (Effect-directed Analysis) visant à fractionner le mélange pour isoler les molécules effectivement responsables des effets observés et ainsi faciliter leur identification chimique. Des résultats issus d'études de cas sur des sites différemment impactés illustreront l'utilité de la démarche pour la caractérisation et l'identification de (nouvelles) molécules PE dans le milieu.

Polluants dans le lait maternel

Raphaël SERREAU - Réseau Médic-AI, Hôpital Necker Paris

Poster 7-A : Dr Raphaël Serreau MD, PhD; Brune de Villepin Sage-Femme, Virginie Rigourd MD, PhD Réseau Médic-AI Hôpital Necker, AP-HP, Paris

Du fait de la sensibilité particulière des jeunes aux substances chimiques, la première Etude de l'Alimentation Totale infantile (EAT infantile) a été initiée en 2010 par l'Agence Nationale de Sécurité des Aliments (ANSES) afin d'évaluer l'exposition des enfants de moins de 3 ans à divers contaminants, additifs et des minéraux. Cependant, l'EAT infantile n'a pas inclus d'enfants allaités alors qu'environ 62,6% des enfants français le sont à la maternité. Les données nationales sur cette thématique sont très rares : depuis 12 ans, seules 3 études ont évalué la contamination du lait maternel à certaines substances dont les organochlorés, les polychlorobiphényles (PCB), dioxines et furanes et les retardateurs de flammes bromés, et une seule a inclus 240 échantillons (étude nationale INVS 1999). Ces contaminants doivent être à nouveau mesurés. Les récentes études internationales ont mis en évidence des concentrations dans le lait maternel pouvant conduire à un risque sanitaire réel pour les nourrissons allaités. Des données récentes sur ces contaminants sont nécessaires sur l'ensemble du territoire français afin d'évaluer ce risque.

En conclusion, l'étude de l'exposition des populations via la matrice lait maternel semble donc indispensable pour mieux caractériser l'exposition des populations, pendant des périodes de la vie particulièrement sensibles. Le faible nombre de données françaises et les variations importantes des

teneurs pouvant exister au sein d'une même population soulignent l'importance de mettre en place une étude sur la contamination du lait maternel à ces différentes substances en analysant des échantillons de lait récoltés au sein d'une population de femmes ayant des profils différents et vivant au sein de plusieurs régions de France. De telles données sont indispensables pour mieux connaître le risque encouru par la population française à ces différentes substances. Dans le contexte actuel de promotion de l'allaitement maternel, il paraît également important d'identifier ce risque afin qu'il puisse être pris en compte et intégré dans une démarche risqué/bénéfice de l'allaitement.

Les résultats de cette étude, nommée Contalait se fera en comparaison avec les résultats de l'étude EAT menée par l'ANSES sur les aliments de l'enfant 0-3 ans dont les préparations infantiles avec le lait artificiel.

Méthodologies : bioanalyses et mesures physico-chimiques,

Systèmes testés : Lait maternel

Degré de maturité du test : en cours de développement

L'eau du robinet contient-elle des perturbateurs endocriniens ?

Bruno CORMAN - *Profilomic*

*Poster 1-A : Jérôme Cotton, Fanny Leroux, Simon Broudin, Bruno Corman, Céline Ducruix
Profilomic, 31 rue d'Aguesseau, 92100 Boulogne-Billancourt*

Pour qu'une eau soit considérée comme potable, il faut qu'elle réponde à un certain nombre de contraintes réglementaires. L'analyse des polluants émergents, en particulier ceux considérés comme étant des perturbateurs endocriniens, fait partie de ce cahier des charges. La règle générale veut que leur concentration individuelle ne dépasse pas 0,1µg/L et que la somme de leurs concentrations soit inférieure à 0,5µl/L. La pertinence de cette évaluation dépend bien entendu de la liste des molécules analysées. Or on sait que cette liste est loin d'être exhaustive et que les métabolites de certains perturbateurs endocriniens, souvent aussi toxiques que leurs molécules mères, sont rarement recherchés. Pour avoir une vision aussi large que possible de la qualité de l'eau de boisson, nous avons ainsi adapté les approches de métabolomique développées dans le domaine de la santé aux analyses de polluants émergents dans l'eau. Ces approches impliquent soit un criblage ciblé large spectre de molécules par comparaison avec une base de données spectrales, soit une recherche de molécules inattendues sans a priori à partir de leur masse moléculaire. Nous avons pour cela tiré parti de l'arrivée sur le marché de spectromètres de masse à ultrahaute résolution donnant accès à la masse exacte des molécules avec une précision à la 4ème décimale. La très grande sensibilité de ces appareils permet la détection de polluants présents même à de très faibles concentrations. Après avoir développé une base de données spectrales de 850 molécules, pour moitié résidus médicamenteux et pour moitié pesticides, ainsi qu'une méthode couplant la chromatographie liquide à la spectrométrie de masse, nous avons analysé des eaux du robinet collectées à différents points de la région parisienne. Un nombre important de polluants émergents et de leurs métabolites a été retrouvé dans ces échantillons d'eau, avec une assez grande variabilité selon les villes. Si les concentrations individuelles de ces substances étaient toujours inférieures au seuil réglementaire de 0,1 µg/L, leur nombre et leur variété pose question quant aux éventuels effets cocktails et à la synergie entre leurs activités biologiques respectives.

Ce travail a été en partie financé par le programme d'Innovation Stratégique Industrielle (ISI) "Agrifood" GPS de Bpi/Osé.

Méthodologies : bioanalyses et mesures physico-chimiques,

Systèmes testés : analyse globale

Degré de maturité du test : en cours de développement

Analyse et évolution d'une diversité d'hormones dans des filières de traitement d'eau

Amélie GUILLON - Suez Environnement

Poster 4-A : Amélie Guillon, Naïke Noyon, Mar Esperanza, Auguste Bruchet

Parmi les perturbateurs endocriniens, les hormones sont des composés dont les effets sur l'Homme, et les êtres vivants en général, sont aujourd'hui clairement avérés. Bien que les concentrations soient faibles dans le compartiment aquatique, de l'ordre du pg/L au ng/L, des cas de féminisation, d'hermaphrodisation ou de baisse de la fertilité chez des organismes aquatiques ont été rapportés. Qu'elles soient d'origine naturelle ou de synthèse, les hormones se retrouvent dans les eaux de surface, suite à leur rejet direct dans l'environnement (agriculture, aquaculture...) ou à la sortie de stations d'épuration en milieu urbain et rural. Le comportement des hormones estrogènes dans les filières de traitement et leur présence dans l'environnement sont assez bien documentés dans la littérature. En revanche, les progestagènes ou androgènes, qui présentent aussi des impacts avérés sur la santé et l'environnement, ne sont quant à eux que très faiblement documentés.

L'objectif de ce travail a été, dans un premier temps, de développer et valider une méthodologie d'extraction/purification et d'analyse d'un large panel hormones (féminines et masculines). Dans un second temps, leur comportement, lors de traitements avancés sur des eaux usées (par ozonation particulièrement), sera étudié. Le développement méthodologique a consisté à tester diverses conditions d'extraction sur phase solide (SPE) avec plusieurs solvants d'élution et phases d'adsorption (C18, HLB, Strata-X). L'analyse est ensuite réalisée par chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse haute résolution (LC-Orbitrap). L'utilisation d'une sonde d'ionisation de type APCI a permis d'optimiser la méthode d'analyse pour les 15 hormones ciblées. Ensuite, cette démarche analytique sera appliquée sur des eaux usées non-traitées et traitées dans diverses conditions d'ozonation afin d'étudier leur comportement-évolution au long de la filière de retraitement.

Méthodologies : bioanalyses et mesures physico-chimiques,

Systèmes testés : eau

Degré de maturité du test : en cours de développement

A sensitive ELISA for detection of the endocrine disruptor bisphenol A in water and milk

Sylvain ENGUEHARD - NOVAKITS

Poster 6-A : S. Enguehard¹, P. Lodewijk², L. Streppel², R. Verheijen²

¹ Novakits, 40 Boulevard Jean Ingres, 44100, Nantes, France

² EuroProxima BV, Beijerinckweg 18, 6827 BN Arnhem, The Netherlands

L'évolution des techniques de couplage pour rendre immunogène des molécules de faible poids moléculaire ont entraîné ces dernières années un essor de l'offre de coffrets de type ELISA pour quantifier les intrants dans l'environnement : Pesticides, résidus chimiques industriels, Hormones, Toxines, Résidus médicamenteux...

Principe : Une compétition entre l'analyte cible et un analogue marqué à une enzyme pour se fixer sur un nombre restreint de sites d'un anticorps spécifique est mis en œuvre dans un test ELISA sous format microplaque standard ou billes magnétiques. La concentration de l'analyte cible est déterminée par rapport à une gamme de standard réalisée avec le composé d'intérêt. Selon le con-

texte, il sera recherché une réactivité sur un seul analyte cible ou une famille de molécules. Les sensibilités varient de l'ordre du dixième de µg à quelques ng/L selon les tests.

Il est ainsi aisé de quantifier en quelques heures (Durée de l'ELISA 2 H en moyenne) sur un format analytique standard, sans investissement conséquent, les molécules d'intérêt environnemental. Les outils sont disponibles pour une prise en main rapide et aisée.

Ces technologies sont d'un grand intérêt pour la mise en place d'un audit environnemental, d'un suivi régulier sur un grand nombre de points pour un résultat rapide et à moindre coût. Les points chauds pourront être retraités par méthode basée sur la chimie séparative si besoin.

Les molécules à effet perturbateur endocrinien sont parmi les celles ciblées par ces technologies :

- Hormones stéroïdiennes naturelles ou synthétiques : LOD du 17 B Estradiol de 3 ppt en test direct
- Testostérone
- Résidus chimiques industriels : Bisphénol A, PBDE
- Biocides : Triclosan, Alkylphenols
- Pesticides : DDT

Ainsi que d'autres ayant des effets notoires sur la santé : PCBs, Benzo(a)pyrene

En complément des éléments de principe et des outils disponibles, il sera présenté les éléments de validation ETV de ces tests, des extraits de publication montrant leur applicabilité, le contexte de mise en œuvre et les résultats obtenus. Leur utilisation pour le suivi des substances prioritaires de la DCE et liste de vigilance seront particulièrement développés. Des traitements d'échantillon sur d'autres matrices telles que les sols, les eaux de rejet de STEP sont proposés.

Nous concluons en présentant les autres familles de molécules sur lesquelles ces technologies sont appliquées : herbicides, insecticides, résidus médicamenteux, toxines algales.

Méthodologies : bioanalyses et mesures physico-chimiques, in vitro

Systèmes testés : oestrogénique, androgénique

Degré de maturité du test : recherche de partenaires pour validation, commercialisé

Approches *in silico*

James DEVILLERS - CTIS

James Devillers, CTIS, 3 chemin de la gravière, 69140 Rillieux La Pape (j.devillers@ctis.fr).

La recherche de liens entre la structure des molécules organiques et leurs activités biologiques a été concomitante au développement de la toxicologie et de la pharmacologie au XIX^{ème} siècle. La formalisation mathématique de ces relations s'est faite au début des années 60 avec la mise en place de la modélisation QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationship).

Intrinsèquement, l'élaboration d'un modèle QSAR nécessite les trois ingrédients suivants :

- une activité bien définie à simuler,
- une description précise des caractéristiques et particularités structurales des substances que l'on désire modéliser,
- et enfin, une méthode statistique permettant de relier les deux composantes précédentes.

Le terme de QSAR ne s'applique qu'aux relations quantitatives sinon on parle de SAR (e.g., classification). Dans tous les cas, la modélisation SAR ou QSAR se fait en deux étapes. Au cours de la première, on cherche à obtenir le modèle à partir d'un échantillon représentatif de substances et à le calibrer. Au cours de la seconde étape, on teste les limites d'applications du modèle en comparant les résultats qu'il produit à des données expérimentales non utilisées pour son élaboration.

Après avoir rappelé les principes de base de ce type de modélisation, différents exemples en relation avec les perturbateurs endocriniens seront présentés afin de souligner les avantages et inconvénients de ces approches. L'intérêt des méthodes apparentées comme le read-across sera également abordé. Enfin, un panorama des autres techniques *in silico* appliquées aux perturbateurs endocriniens sera présenté et commenté.

Lignées cellulaires rapporteurs et récepteur nucléaire recombinant : deux outils complémentaires pour l'étude des perturbateurs endocriniens.

Patrick BALAGUER - INSERM

Patrick Balaguer¹, Marina Grimaldi¹, Abdel Boulahtouf¹, Béatrice Dendélé¹, Vanessa Delfosse², William Bourguet².

¹ IRCM-INSERM U896-UM1-ICM, Montpellier.

² CBS CNRS UMR5048 INSERM U1054, Montpellier.

L'exposition humaine à des perturbateurs endocriniens (PEs) comme le bisphénol A, les phtalates, les composés perfluorés, les produits cosmétiques (parabènes, benophénones), les retardateurs de flamme ou les pesticides est suspectée de perturber la reproduction (infertilité, puberté précoce), le métabolisme (obésité, diabète) et de conduire à des cancers hormonaux (sein, ovaire, prostate). Une grande majorité des actions de ces PEs passe par la liaison et l'activation de récepteurs nucléaires comme les récepteurs des oestrogènes (ER α , ER β), des androgènes (AR), des xénobiotiques (PXR) ou le récepteur activé par les proliférateurs des peroxyosomes γ (PPAR γ). La synthèse d'alternatives non toxiques à ces composés conservant les caractéristiques industrielles mais dénuées de propriétés hormonales est devenue indispensable.

De nombreux laboratoires dont le nôtre ont développé des outils qui permettent de caractériser les activités "récepteurs nucléaires" de molécules chimiques ou de détecter la présence de ligands de récepteurs nucléaires dans des échantillons biologiques ou environnementaux. Ces outils sont généralement soit des lignées cellulaires bioluminescentes qui expriment un récepteur nucléaire et un gène rapporteur correspondant (test d'activation), soit du récepteur nucléaire recombinant et un ligand de ce récepteur marqué radioactivement ou par fluorescence (test de liaison). Au cours de cet exposé, nous présenterons les principaux tests existants et montrerons des exemples de leur utilisation au cours de recherches réalisées dans notre laboratoire.

A sensitive in-vitro bio-assay to assess the potential toxicity of waters on spermatogenesis

Guillaume MARTIN - Kallistem

Poster 11-C : Martin Guillaume¹, Blondet Antonine ¹, Christin Emilie ¹, Perrard Marie-Hélène ², Durand Philippe ¹

¹ Kallistem, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Lyon, France

² Inserm U846 Lyon, France

Male fertility is one of the biggest environmental impacts currently observed in humans (loss of 50% of sperm over the last 50 years). More and more toxicants are present in water (pesticides, heavy metals, residues of drugs...) which may potentiate each other when present as a "cocktail", and may possess endocrine disrupting effects. Hence, we have developed a method to assess their potential impact on male fertility. Using our validated rat seminiferous tubule culture model (Bio-

Alter®), we evaluated the effects on spermatogenesis of two tap waters from different sources and two plastic bottled mineral waters (waters 1, 2, 3 and 4, respectively). Concentrated culture medium was diluted five-fold with the water to be tested giving a final concentration of the tested water of 80% (v/v). The integrity of the blood testis-barrier was assessed by measuring the trans-epithelial electric resistance (TEER). The expression of genes specific of Sertoli cells, or cellular junctions, or of each population of germ cells was studied by reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). Similarly, the expression of androgen receptors and of estrogen receptors 1 and 2 was studied. For tap water (1), the TEER was dramatically modified over the culture period, as compared to the deionised control water, and the decreased TEER on day 20 of culture was associated to modifications in the expression, of some genes specific of tight or gap junctions. Much smaller changes were observed for waters 2, 3 and 4. No change in the expression of 2 genes specific of the Sertoli cells was observed for any of the waters tested. The expressions of 3 genes specific of spermatogonia, such as those of pachytene spermatocytes and of round spermatids, were not modified by the waters 2, 3 and 4. By contrast, for tap water (1) the expressions of 2 genes specific of pachytene spermatocytes and 3 genes specific of round spermatids (which are the direct precursors of sperm) were, respectively slightly and dramatically reduced. The expression of androgen and of both estrogen receptors was decreased by waters 1 and 3 indicating an endocrine disrupting effect. Hence, by combining TEER measurement and specific gene expression, we have developed a relevant and reliable test able to evaluate the potential toxicity of different types of waters on male fertility and to assess some aspect of their mechanism of action.

Méthodologies : in vitro

Systèmes testés : oestrogénique, androgénique

Degré de maturité du test : commercialisé

Testing of estrogenic and androgenic reference compounds using 2 versions of the yeast-based YES and YAS assay

Markus KAMBER - Xenometrix AG

Poster 12-C : Markus Kamber, Xenometrix AG, Gewerbestr. 25, CH-4123 Allschwil, Switzerland

The performance of 2 commercially available kits for the detection of estrogenic and androgenic compounds was evaluated. The kits (“XenoScreen” and “XenoScreen XL”) are based on yeast cells transfected with the human estrogen and androgen receptors, respectively (YES and YAS, Routledge and Sumpter, 1996). The tests are performed in microtiter plates and are able to detect both activating (agonist) and inhibiting (antagonist) activities. Hormonal activities of test substances are detected using a lacZ reporter gene construct (β -galactosidase) and the highly sensitive substrate CPRG leading to a color change in the medium from yellow to purple. The XenoScreen kit is based on the original protocol and uses an incubation time of 48 hrs, whereas the XenoScreen XL kit is based on a modified 18-hr exposure protocol using the enzyme lyticase to facilitate the release of the β -galactosidase from the yeast cells.

Several chemicals with known estrogenic and androgenic activities ranging from strong to weak as well as negative control compounds were evaluated, including 14 chemicals recommended in the OECD 455 guideline “Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists” for the testing of laboratory proficiency. Both kit versions were able to correctly identify these chemicals.

The results demonstrate the usefulness of the 2 YES/YAS kits to correctly identify compounds with known estrogenic and androgenic agonist and antagonist activities.

Méthodologies : in vitro,

Systèmes testés : oestrogénique, androgénique

Degré de maturité du test : commercialisé

Effets du Bisphénol A et de ses substituts sur le développement du testicule foetal

Soria ELADAK - INSERM U 967/CEA/Université Paris Diderot

Poster 20-C : .Eladak, T.Grisin, D.Moison, M.J.Guerquin, A.Benachi, G.Livera, V.Rouiller-Fabre, R.Habert

Au cours des dernières décennies, les inquiétudes vis-à-vis des changements survenus dans l'environnement et de leurs conséquences possibles sur la fonction de reproduction humaine se sont amplifiées. Les anomalies de la fonction de reproduction masculine seraient principalement dues aux effets délétères de certains polluants pendant la vie foétale, période critique de mise en place des fonctions testiculaires. Les plastifiants et en particulier le bisphénol A (BPA), ont été incriminés. En utilisant le modèle de culture organotypique, développé au laboratoire, il a été montré que le BPA diminue la production de testostérone du testicule foetal, production qui est requise pour masculiniser le fœtus. Cet effet a été observé à des doses plus faibles dans les testicules humains en comparaison au rat ou à la souris. Les gonades humaines (1er trimestre de grossesse) sont obtenues grâce à une collaboration établie depuis plusieurs années avec le Service de Gynécologie-Obstétrique de l'Hôpital Antoine Béchère.

Notre travail vise à étudier les effets de substituts du BPA sur le testicule foetal humain et murin. En effet, depuis le 1er janvier 2013, la mise sur le marché de tout conditionnement comportant du bisphénol A destiné à entrer en contact direct avec des denrées alimentaires pour les nourrissons et enfants en bas âge est interdite. Cette interdiction doit s'étendre à l'ensemble des conditionnements à usage alimentaire au 1er janvier 2015. Cependant l'innocuité des substances appelées à remplacer le BPA n'a jamais été étudiée sur le testicule foetal. Parmi la famille des bisphénols, le BPS, BPF, et le BADGE ont été proposés comme potentiels substituts. Pour l'ensemble de ces composés il n'existe pas d'étude qui ait mesuré leurs effets sur les gonades fœtales. Du fait de leur proximité de structure ou de leur potentiel œstrogénique, certains de ces composés pourraient avoir des effets semblables à ceux du BPA. Il est donc important de comparer dans les meilleurs délais l'effet de ceux-ci à ceux connus du BPA, en particulier dans les gonades humaines.

Nos résultats semblent indiquer que le BPS et le BPF, induisent comme le BPA une diminution de la sécrétion de testostérone par le testicule foetal de souris. Ces substituts semblent provoquer des effets similaires chez l'humain. Ainsi certains substituts proposés pour remplacer le BPA seraient aussi toxiques.

Méthodologies : in vitro

Systèmes testés : stéroïdogénèse

Degré de maturité du test : publié

Approches moléculaires des effets de toxines marines et de micropolluants sur des modèles cellulaires

Mariam LAAMARI - LIENSS Université de La Rochelle

Poster 13-C

L'apparition de l'obésité et du cancer du sein est influencée par l'exposition aux perturbateurs endocriniens présents dans l'environnement. Ces perturbateurs interfèrent avec le fonctionnement hormonal de l'organisme causant des modifications dans le comportement cellulaire. Ils peuvent agir chacun seul ou sous forme de cocktail.

Dans ce contexte, nous avons choisi trois substances dans notre recherche: le bisphénol A (perturbateur endocrinien), le glyphosate (désherbant) et l'acide okadaïque (toxine marine) : des micropolluants identifiés comme substances génotoxiques et promotrices du cancer.

L'objectif de cette recherche est de caractériser en premier lieu l'impact de ces substances seules ou sous forme d'un cocktail sur les cellules du cancer du sein (ER+ et ER-) et sur les cellules graisseuses: les préadipocytes humains à différents stades de maturation (préadipocytes, adipocytes différenciés et adipocytes matures).

L'exposition de ces cellules à ces polluants permet de déterminer les concentrations présentant un effet sur la viabilité cellulaire après 24h et de 72h de traitement, de comparer l'effet d'un cocktail par rapport à un traitement avec une seule substance et de caractériser le comportement de chaque lignée cellulaire vis-à-vis de ces substances.

En deuxième lieu, et dans le cadre de mieux caractériser le lien entre l'obésité et le cancer du sein, des expériences de traitement des cellules cancéreuses par le sécrétome des préadipocytes et des adipocytes seront réalisées ainsi que des expériences de co-culture entre les deux lignées cellulaires.

Cela permettra d'étudier les voies de communication entre cellule cancéreuse /cellule grasseuse comme étant une cellule abondante dans le microenvironnement tumorale. Les cellules en co-culture seront traitées par les micropolluants seuls ou sous forme de cocktail afin de caractériser l'impact de ces derniers ou de leurs métabolites sur ce type d'interaction cellulaire.

Ces différentes expériences seront couplées à une approche protéomique permettant de cibler les protéines d'intérêts dans les cellules traitées (extraction des protéines, séparation par électrophorèse 2D, analyse d'image) identifiées suite à une analyse spectrométrique. Cette approche sera donc utile pour établir une analyse comparative de l'expression des protéines suite aux différents traitements et d'identifier les bio-marqueurs liés à la présence de ces substances.

Méthodologies : in vitro

Systèmes testés : œstrogénique

Degré de maturité du test : concept.

Tests in vivo – Introduction

Olivier FOULON - CiToxLAB

Dans le cadre de l'évaluation de sécurité préclinique pour un candidat médicament ou des divers dossiers d'enregistrement pour les entités chimiques (au sens de REACH), chaque substance est évaluée au travers de différentes tests de sélection (screening) ou obligatoires (réglementaires).

Un arsenal de tests existe : il comprend ceux réalisés sur les mammifères ou sur des espèces sauvages (essentiellement aquatiques). Ces tests couvrent les domaines de la toxicologie générale, de la toxicologie de la reproduction et de l'éco-toxicologie. On distinguera ceux qui sont scientifiquement validés pour révéler des effets de type endocrinien de ceux qui donnent des signes d'alerte ne suffisant pas pour conclure sur un effet de type endocrinien indésirable.

Dans chacun de ces tests, de très nombreux paramètres sont enregistrés et peuvent révéler des effets néfastes. Ces paramètres sont relatifs à des dosages d'hormones ou de divers médiateurs, à des marqueurs de développement sexuel et de fertilité, à des analyses comportementales, à des analyses histopathologiques, à la recherche de malformations embryo-fœtales,

Ces tests sont autant d'opportunités pour ajouter des paramètres complémentaires afin d'éviter des études complémentaires si un choix judicieux est fait par l'ajout de données d'exposition, de génomique, de cross-reactivity ou de toute autre évaluation pertinente.

Les conditions de réalisation de ces études sont essentielles pour en garantir la qualité et assurer l'exploitation des résultats dans le respect des règles éthiques. En effet, ces résultats sont essentiels pour caractériser un danger et ils vont s'additionner à d'autres informations pour élucider soit une propriété intrinsèque, un mécanisme d'action ou des données d'exposition humaine pour apprécier le risque pour l'Homme ou pour notre environnement.

A novel transgenic cyp19a1b-GFP *in vivo* zebrafish embryo assay (EASZY assay) to assess the estrogenic potency of chemicals and complex environmental mixtures

François BRION - INERIS

One major challenge to ecotoxicology is to develop species-specific biological tools that allow rapid and cost-efficient assessment of EDCs for environmental hazard and risk assessment but also for monitoring the contamination of aquatic systems by EDCs. In this context, the use of zebrafish (*Danio rerio*) embryo assay appears as usefulness and relevant. We recently developed a mechanism-based *in vivo* zebrafish assay called EASZY that allows the detection of Endocrine Active Substance, acting through zebrafish estrogen receptors, using transgenic cyp19a1b-GFP Zebrafish embryos. The Cyp19a1b gene is a strictly ER-regulated gene that codes for the brain aromatase which is mainly expressed in radial glial cells of the brain of fish. In the present work the relevance of the EASZY assay for assessing the estrogenic potency of substance was evaluated by testing more than 50 different compounds belonging to various chemical classes. We found that in EASZY GFP is induced in a ER-specific manner by (i) compounds that bind directly to estrogen receptors as agonists (ii) compounds that require metabolic activation into estrogenic metabolites (iii) aromatizable androgens as well as some non aromatizable androgens. By studying combined effects of estrogenic chemicals, we showed that mixtures of estrogenic compounds generally acted in an additive manner on the expression of GFP expression, their combined effects being predicted by the CA model although antagonism was observed in a specific case. Finally, POCIS-based bio-monitoring using EASZY allowed screening the estrogenic activity of various surface waters from French rivers resulting in the detection of es-

trogenic activities at some sites. Overall, our studies show that EASZY assay clearly emerges as a simple, fast and reliable *in vivo* assay for screening the capacity of chemical, alone or in combination, as well as complex environmental mixtures. The sensitivity of EASZY assay to activate ER-signalling by chemicals and complex mixtures at very early critical developmental stages makes it an outstanding screening *in vivo* tool for hazard assessment of chemicals and EDCs detection in aquatic environment.

Méthodologies : in vivo

Systèmes testés : oestrogénique, stéroïdogénèse

Degré de maturité du test : publié

Détection rapide en fluorescence des (anti-)androgènes avec une lignée medaka spiggin-gfp

Anthony SÉBILLOT - WatchFrog

Poster 24-D : Anthony Sébillot, Paulina Damdimopoulou, Yukiko Ogino, Petra Spirhanzlova, Shinichi Miyagawa, David Du Pasquier, Nora Mouatassim, Taisen Iguchi, Gregory F. Lemkine, Barbara A. Demeneix and Andrew J. Tindall.

La dérégulation de l'axe androgénique par les perturbateurs endocriniens est susceptible de contribuer à l'émergence de phénomènes physiopathologiques de large ampleur tels que l'infertilité masculine. Le développement de tests biologiques rapides et simples à mettre en œuvre est indispensable pour caractériser les effets (anti-) androgéniques de molécules ou de mélanges.

La protéine Spiggin présente chez l'épinoche à trois épines (*Gasterosteus aculeatus*) est utilisée comme biomarqueur dans des tests *in vivo* et *in vitro* pour la détection des androgènes et anti-androgènes exogènes. Le projet de ligne directrice « Androgenised Female Stickleback Screen » (AFSS) établi par L'Organisation de Coopération et de Développement Economiques (OCDE) en 2009 repose sur la détection des perturbateurs (anti-)androgéniques en utilisant un test de 21 jours sur poissons adultes.

Ici, nous décrivons un test de détection de perturbateurs (anti-)androgéniques chez le modèle medaka (*Oryzias latipes*) pouvant servir d'alternative éthique au test *in vivo*. Les alevins portent la séquence promoteur du gène spiggin 1 issue de l'épinoche associée à la séquence codant une protéine fluorescente verte GFP (spg1-gfp).

Nous montrons que spg1-gfp est exprimé exclusivement dans les reins de façon mimétique à l'expression observée chez l'épinoche. La fluorescence émise suite à l'exposition aux androgènes testés tels le 17 α -méthyltestostérone (17MT) et le (5 α ,17 β)-17-hydroxy-androstane-3-one (DHT) peut-être quantifiée dans les poissons à des stades précoces.

Les oestrogènes, les minéralocorticoïdes, glucocorticoïdes ou les progestatifs n'induisent pas de fluorescence, témoignant ainsi de la spécificité de la réponse observée.

Nous avons développé un protocole de détection des anti-androgènes. Le signal fluorescent induit par le 17MT est significativement inhibé en co-traitement avec la molécule anti-cancéreuse non stéroïdienne : le flutamide. Des biocides anti-androgènes tels que le fénitrothion, le linuron et la vinclozoline ont également permis de valider le protocole.

Le medaka spg1-gfp peut être utilisé comme test physiologique spécifique pour l'analyse sensible des activités (anti-)androgéniques de substances chimiques ou sur des échantillons environnementaux.

Méthodologies : in vivo

Systèmes testés : androgénique

Degré de maturité du test : en cours de développement

Thyroid disruption and brain development: the xenopus embryo model

Jean-Baptiste FINI - UMR 7221 CNRS

Poster 27-D : Jean-Baptiste Fini, Sébastien Le Mével, Bilal Mughal, Barbara Demeneix

Background

Exposure to xenobiotics can affect endocrine function, particularly the thyroid axis. Thyroid hormones (THs) are essential for brain development, with acute lack in newborn humans causing cretinism. THs are needed for neurogenesis during embryonic life, before the thyroid gland formation, and play multiple roles in early brain development. Thus, exposure to thyroid disruptors during embryonic life is potentially harmful to the developing brain.

Objective

Our working hypothesis is that thyroid disruptors at concentrations relevant for human exposure may affect thyroid signaling and subsequently brain development.

Method

Using a test being validated by the OECD, XETA (Xenopus transcriptional assay) we tested the activity of different suspected thyroid disruptors alone at concentrations relevant to human exposure: Bisphenol-A, benzophenone-3, DEHP, Dibutylphthalate, BDE 209, 2-Naphtol, methylmercury, lead, triclosan, 4-4' DDE, hexachlorobenzene, PFOS and PFOA. The test principle is quantification of GFP in reporter embryos bearing a Thyroid Response Element-GFP construct.

To study impact on brain development we used wildtype embryos exposed (3 days from fertilization on) to thyroid disruptors and known thyroid hormone agonists and inhibitors. RNA isolated from brains was used to follow expression of genes implicated in TH signaling and neuron or oligodendrocyte maturation.

Results

Few compounds used alone affect TH signalling except the phthalate DEHP and the surfactant PFOS (10-7M). However, actual exposure is not limited to single molecules. Thus, we are currently investigating effects of mixtures of these compounds.

In brain tissues, several transcripts of genes implicated in TH signaling such as deiodinases or TH receptors are affected by an embryonic exposure to TH disruptors. Further work is needed to study long term effects on brain phenotype after embryonic exposure.

Méthodologies : in vivo

Systèmes testés : thyroïdien

Degré de maturité du test : publié, commercialisé

Testing mixtures of endocrine disruptors *in vivo* at human-relevant exposure levels

Steffen SCHNEIDER - BASF

¹Fussell, Karma C., ¹Steffen Schneider, ¹Stephanie Melching-Kollmuss, ¹Sibylle Groeters, ¹Volker Strauss, ²Benazir Siddeek, ²Mohamed Benahmed, ¹Markus Frericks, ¹Bennard van Ravenzwaay

¹Experimental Toxicology and Ecology, BASF SE, 67056 Ludwigshafen, Germany

²Inserm U895, équipe 5, Bâtiment Universitaire Archimed, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M), Centre Hospitalier l'Archet 2, 06204 Nice CEDEX 3, France

Endocrine disruption has become an important topic of public concern. Despite an increasing amount of attention, little is understood about whether environmentally relevant doses of endocrine disrupting chemicals (EDCs) affect homeostasis. Furthermore, knowledge gaps often exist in the studies used to assess EDCs. To address these concerns we performed pre-/post-natal reproductive toxicity studies to measure the developmental toxicity of low single- and mixture-doses of three anti-androgens. Doses were selected to mimic a low observed adverse effect level (LOAEL), the no observed adverse effect level (NOAEL) for endocrine effects, and the acceptable daily intake (ADI) for each compound, which were then additionally combined together into three mixtures of the LOAELs, NOAELs, and ADIs. The endocrine consequences of a larger effect dose of flutamide were also evaluated as a positive control.

While female offspring developed normally, the male offspring demonstrated anti-androgenic effects at the single and mixed LOAEL doses only. A significant decrease in anogenital distance on PND 1 and an increase in the number of nipples/areolas on PND 12 were noted in these animals. The latter effect was partially transient, as all had regressed by PND 20, except at the positive control dose. The male offspring in these dose groups which were reared to young adulthood displayed additional anti-androgen effects including delayed sexual maturation and reduced sex organ sizes and weights; offspring from the positive control dose also had an increased incidence of developmental sexual defects. No adverse effects were noted at either the NOAEL or ADI dose levels. Assessment of molecular endpoints including the transcriptome, miRNome and metabolome (with hormone levels) is ongoing.

Méthodologies : in vivo

Systèmes testés : androgénique

Degré de maturité du test :

Perturbateurs endocriniens, le temps de la précaution

Gilbert BARBIER - *Sénateur*

La publication de *Silent Spring* par Rachel Carson en 1962 avait créé un véritable bouleversement en mettant en cause le D.D.T. Depuis, beaucoup de travaux ont été entrepris mettant cette question des perturbateurs endocriniens dans l'actualité de leurs impacts environnementaux sur la santé publique. Considérons que le problème est particulièrement complexe, dans la mesure où si, sur l'animal sauvage ou de laboratoire le rôle des P.E. est bien documenté et identifié, la transposabilité à l'homme des études faites sur les rongeurs et les poissons se heurte à un manque évident de données épidémiologiques.

Au niveau national et au niveau européen des mesures d'interdiction et de restriction d'usage ont d'ores et déjà été prises. Bien sûr d'autres sont certainement à envisager au fur et à mesure que les travaux permettront de confirmer la nocivité réelle de certaines substances. Le dispositif européen le plus important est sans doute « REACH » pour les produits chimiques qui doivent progressivement faire l'objet d'une analyse et d'une déclaration préalable à la commercialisation. Rappelons que les P.E. sont classés dans les substances C.M.R.

L'étude des P.E. a fait considérablement évoluer la toxicologie. Sachant que nous ne possédons certainement pas encore toutes les interactions des produits entre eux. C'est probablement dans ce domaine que d'importants travaux de recherche sont à conduire. Pour les P.E. la réponse n'est pas toujours linéaire. Il convient aussi de prendre en compte le moment d'exposition. La période intra-utérine et la petite enfance sont à n'en pas douter les moments particulièrement sensibles de réceptivité.

C'est pour cela que des propositions d'interdiction de certains produits me semblent tout à fait justifiées.

Prévenir et informer la population de la composition des produits devient un impératif auquel doit faire face les responsables politiques en s'appuyant sur des données scientifiques. C'est une nouvelle ère, un nouveau défi est lancé au monde de l'industrie, qui je n'en doute pas saura le relever.

Stratégie nationale sur les perturbateurs endocriniens : à l'heure de la mise en œuvre

Jordane WODLI - DGPR/MEDDE

Suite à une intense phase de concertation tout au long de l'année 2013, avec l'association des parties prenantes au sein d'un groupe de travail puis une large consultation du public sur Internet, la ministre de l'écologie, du développement durable et de l'énergie a présenté au Conseil national de la transition écologique, le 29 avril dernier, la stratégie nationale sur les perturbateurs endocriniens.

Cette stratégie a pour objectifs de prévenir les risques liés aux perturbateurs endocriniens et de limiter l'exposition, en particulier celle des populations sensibles, femmes enceintes et jeunes enfants. Cette démarche doit de plus permettre à la France d'être motrice dans la préparation de la stratégie de la Commission européenne sur les perturbateurs endocriniens.

Cette stratégie structurera l'action et les positions du Gouvernement au cours des prochaines années et mobilisera tous les leviers d'action disponibles : recherche scientifique, valorisation et surveillance, expertise sur les substances, réglementation et substitution des substances, formation et information. Certaines actions sont opérationnelles dès à présent, d'autres devront être poursuivies dans des cadres plus transversaux comme le plan santé environnement ou le plan santé travail.

La stratégie doit aussi être un moteur pour l'innovation : l'industrie a un rôle majeur à jouer dans la recherche, l'information et la mise en œuvre de solutions de substitution viables.

Les différents axes de la stratégie pourront être présentés, avant d'être approfondis par les intervenants suivants.

1. Recherche, valorisation, surveillance

Le gouvernement souhaite inscrire la thématique des perturbateurs endocriniens comme un axe essentiel de la recherche en santé environnementale, au sein de la stratégie nationale de la recherche comme du Programme National de Recherche sur les Perturbateurs Endocriniens (PNRPE). Ces travaux seront poursuivis en lien étroit avec les enquêtes d'imprégnation des populations, les cohortes de surveillance sanitaire et environnementale et des programmes de surveillance épidémiologique

Il est de plus nécessaire d'accélérer les tests de substances. Afin d'accélérer la validation de ces méthodes, le MEDDE a donc lancé une étude de faisabilité et d'intérêt **d'une plateforme public-privé d'évaluation et de validation des méthodes de test**. Si cette étude est concluante, le gouvernement guidera les porteurs publics et privés pour structurer le dispositif, sa gouvernance et son financement.

2. Expertise sur les substances

Le Gouvernement amplifie la démarche d'évaluation des dangers et risques de substances susceptibles d'être perturbateurs endocriniens ou utilisées par des populations sensibles, via un programme d'expertise confié à l'Anses et l'ANSM. **Dès 2014, le Gouvernement confie aux agences d'évaluation l'expertise d'au moins 8 substances par an.**

3. Réglementation et substitution des perturbateurs endocriniens

En fonction des conclusions des expertises, les substances concernées devront faire l'objet de mesures réglementaires adaptées, portées en priorité au niveau européen. La France s'impliquera dans l'adaptation de la réglementation européenne aux spécificités des perturbateurs endocriniens.

La France demande une définition européenne cohérente avec les spécificités toxicologiques et écotoxicologiques des perturbateurs endocriniens, fondée sur les propriétés intrinsèques de danger, sans prise en compte de la « potency », et établissant 3 catégories (« avéré », « présumé », « suspecté ») en fonction du degré de certitude sur ces propriétés. La définition doit être adaptée aux modes d'actions des perturbateurs endocriniens (action à très faible dose, fenêtre d'exposition, etc.). La France appellera à **la pleine mise en œuvre des clauses d'exclusion des perturbateurs endocriniens dans les règlements phytopharmaceutiques et biocides**, et à l'adoption de mesures progressives adaptées en fonction des preuves disponibles pour les « présumés » ou « suspectés ».

La France fera de plus l'usage du pouvoir d'initiative prévu par les règlements européens pour proposer les mesures qui apparaîtront nécessaires.

En complément des mesures réglementaires, la France accompagnera par ses dispositifs de soutien à l'innovation les industriels dans leurs démarches de substitution de substances dangereuses.

4. Formation et information

Cette stratégie vise à développer l'information et la sensibilisation des professionnels et du grand public à la question des perturbateurs endocriniens, pour permettre à chacun d'orienter ses choix et de limiter son exposition. Les travaux doivent être poursuivis et élargis dans le plan national santé environnement et le plan santé travail.

Etat des lieux de la plateforme nationale de prévalidation des PE

Philippe HUBERT – INERIS

Pour l'élaboration de la Stratégie Nationale Perturbateurs Endocriniens, il a été envisagé un partenariat public privé pour organiser une validation des essais et méthodes par modélisation utilisables pour caractériser des propriétés de perturbation endocrinienne.

De fait il y a un manque d'essais disponibles, notamment certains effets (ex : effets thyroïdiens, stéroïdogénèse). Des outils sont à concevoir, d'autres à mettre au point, mais trop peu sont validés.

En dépit du consensus sur l'approche partenariale, et le l'idée d'une « prévalidation », précédant (si nécessaire) et accélérant une validation par des instances internationales, les parties prenantes gardent des questions fortes en termes de gouvernance, de transparence, d'efficacité et de viabilité économique. De là une demande d'une étude de la faisabilité, à laquelle L'INERIS et ses partenaires travaillent.

Des éléments sont déjà spécifiés. La plateforme n'inclut pas le développement amont (action recherche) et la plate forme ne doit pas effectuer une classification (action ANSES et ANSM).

Trois fonctions principales sont donc identifiées.

- Identifier des méthodes candidates « pertinentes » pour entrer dans le processus.
- Réaliser et faire réaliser les essais circulaires appropriés.
- Statuer sur le succès du processus pour une méthode et dans ce cas en faciliter la diffusion.

Les équipements sont ceux des essais *in vivo* et *in vitro*, ainsi que ceux des analyses chimiques, et des travaux numériques. Ces derniers porteront les méthodes biomathématiques de la toxicologie, mais aussi le gestion d'une masse de données croissantes (imagerie à haute résolution, analyse à haut débit). Une organisation centralisée est indispensable, mais tous les équipements ne seront pas forcément localisés dans un même lieu pour profiter des infrastructures existantes. Un

réseau de laboratoires qualifiés (par exemple BPL) et rétribués au moins partiellement lors d'essais circulaires sera nécessaire.

D'autres éléments retiennent l'attention. Des travaux sont souhaitables en amont (veille active sur l'état de l'art ; essais de « preuve du concept »), et en aval (appui aux développeurs).

L'analyse se centre aujourd'hui des points critiques comme la preuve de l'intérêt économique. La monétarisation est difficile car le financement à 100% d'une validation par un développeur ne peut être la règle dans la chaîne de valeur actuelle. Ce sont plutôt les acteurs en fin de la chaîne qui bénéficient de la disponibilité de méthodes : agences classant les substances, autorités qualifiant un milieu, « utilisateurs aval » qui ont besoin d'une sécurisation de l'innovation pour produire ou utiliser des substances nouvelles.

Un autre bénéfice est de porter l'activité du secteur des essais et méthodes : PME innovantes qui développent et appliquent des tests ; Start Up découlant de l'innovation dans les organismes publics de recherche ; prestataires.

La gouvernance doit préciser les instances de décision, la confidentialité des données, et la gestion des intérêts. On distingue trois rôles : organisation matérielle et logistique ; décision scientifique (éligibilité d'une méthode à valider ; caractère probant des tests) ; pilotage économique. Les comparaisons internationales sont utiles. Ainsi l'Allemagne possède un institut capable de développer des méthodes et de programmer des validations (y.c. d'autrui), mais un système de financement séparé.

Un financement de type fondation d'intérêt public serait une solution intéressante, en complément d'une participation des proposant de méthodes, pourvu que les parties prenantes y adhèrent, avec sans doute pilotage scientifique distinct pour légitimer les décisions (cf éligibilité des méthodes).

L'ancrage dans l'action européenne et internationale est en cours d'investigation. Les premiers contacts (OCDE, CEN, ECVAM) ont été positifs, ces instances voyant dans l'initiative française un moyen d'accélérer et d'alléger les processus internationaux.

Des estimations de coût sont demandées sous deux hypothèses : utiliser les équipements existants des systèmes publics et privés français, financer les laboratoires qui participeraient à des essais, au moins partiellement. Sans surprise, l'aspect déterminant pour le coût de fonctionnement sera le nombre de méthodes candidates plausibles à une validation, c'est-à-dire assez matures pour entrer dans le processus et apportant de réelles informations supplémentaires par rapport à l'existant.

Présentation de la collaboration publique/privée

Patrick LEVY - MEDEF

Dans le cadre du groupe travail chargé d'élaborer le projet de Stratégie Nationale sur les Perturbateurs Endocriniens, les pouvoirs publics ont demandé à l'INERIS, au MEDEF et à l'UIC de réfléchir à une collaboration public-privé sous la forme d'une plateforme de prévalidation d'essais contribuant à identifier les PE avérés.

A ce jour, l'ensemble des parties prenantes reconnaît l'intérêt de la stratégie d'essai proposée par l'OCDE. Cependant, celle-ci reste lacunaire sur certains points et à valider sur un nombre plus important de substances ; de plus la valeur prédictive des essais de screening reste à évaluer.

En d'autres termes, celle-ci demeure encore un cadre « conceptuel » difficile à mettre en œuvre pour les entreprises qui souhaiteraient s'engager dans des démarches d'évaluation de leur portefeuille produits et, il faudra sans doute attendre plusieurs années pour que ce cadre méthodologique devienne totalement opérationnel...

Dans ce contexte, une forme de pré-validation pourrait constituer une étape en amont d'une

reconnaissance européenne (ECVAM) et/ou internationale (OCDE) et pourrait faciliter le processus d'accréditation de méthodes.

En attendant l'arrivée de méthodes accréditées, l'industrie estime qu'il est préférable d'avoir recours à une validation simplifiée (pré-validation) plutôt que de ne rien faire ou bien de laisser se développer des méthodes à l'écart de toute approche « qualité » avec tous les problèmes de faux positifs ou négatifs et de reproductibilité associés. La prévalidation pourrait ainsi constituer une forme de confirmation de l'intérêt d'un essai par un jugement collégalement indépendant avec une validation ultérieure plus formelle par l'OCDE et/ou l'ECVAM.

Le MEDEF considère que plusieurs prérequis doivent être satisfaits pour permettre aux entreprises et / ou aux fédérations professionnelles de s'engager plus en avant dans ce projet. Parmi les éléments importants figurent les points suivants :

- La nécessité d'une dimension d'européenne et internationale : la plateforme doit d'emblée fonctionner en interface avec les réseaux ou plateformes européens, en particulier « l'Endocrine Disruptor Expert Group » mis en place par l'ECHA. Elle doit également tisser des liens forts avec l'OCDE et l'ECVAM. De plus, il paraît pertinent de se rapprocher de l'US EPA (Endocrine Disruptors Screening Program, EDSP) ainsi que de la FDA et du NIEHS dont les travaux visent à approfondir et accélérer les programmes de screening prédictif et la validation de la stratégie OCDE. Une plateforme franco-française n'aurait pas de sens en regard des processus d'accréditation européens et internationaux,
- La gouvernance de la plateforme est fondamentale, et, au-delà de la plateforme la question de la collaboration public-privé nécessite de travailler d'un cadre assaini et sécurisé afin d'éviter toute remise en cause ultérieure. L'ouverture à l'ensemble des parties prenantes est jugée nécessaire par les entreprises. Cependant leur positionnement doit être clarifié notamment dans l'hypothèse d'un financement de l'industrie,
- Les questions de gestion des informations confidentielles et de propriété intellectuelle doivent être approfondies,
- La collaboration public – privé implique un partage équitable des ressources, financement et livrables de la plateforme,
- Enfin, la structuration de la plateforme et la mise en place d'un réseau de laboratoires nationaux devrait faire l'objet d'une stratégie « industrielle ».

A ce stade, le projet est au stade de l'étude de faisabilité. L'adoption de la SNPE portant les positions des autorités nationales n'a pas été perçue par les entreprises comme un signal positif dans le contexte de cette réflexion, même si l'avis du CNTE prend en compte l'avis des acteurs économiques.

Etat d'avancement des travaux sur les tests perturbateurs endocriniens à l'OCDE et perspectives d'évolutions

Anne GOURMELON - OCDE

Depuis 1997, l'OCDE œuvre pour le développement de nouvelles Lignes directrices et pour la révision des Lignes directrices existantes afin de prendre en compte les effets mesurables des substances ayant une action perturbatrice sur les systèmes endocriniens humains et animaux (faune). A ce jour, une dizaine de Lignes directrices ont été adoptées à cet effet. D'autres Lignes directrices potentielles sont encore au stade de la validation ou du développement. Un cadre conceptuel organisant ces Lignes directrices par niveau d'information fournie (sur les mécanismes d'action et sur les effets indésirables) et par niveau de complexité biologique (*in vitro* versus *in vivo*). A été élaboré et récemment mis à jour. Un document guide a été développé pour aider ceux qui évaluent les résultats de tests réglementaires à tirer mieux profit des informations générées par les essais au vu des autres informations disponibles. Tout ceci dans le but d'augmenter la ligne d'évidence qu'une substances

possède ou ne possède pas d'action perturbatrice sur le système endocrinien, et le cas échéant de choisir le test le plus approprié pour augmenter l'évidence si nécessaire.

D'autres défis sont à l'horizon afin d'harmoniser les approches envisagées par les pays membres de l'OCDE dans l'identification des perturbateurs endocriniens. Les nouvelles technologies sont applicables pour passer au crible un large nombre de substances. D'autres mécanismes d'action que oestrogénique, androgénique ou thyroïdien sont possibles pour expliquer les effets néfastes de ces substances. Il est donc nécessaire de poursuivre les efforts et la collaboration sur ces sujets à l'OCDE au sein du groupe consultatif existant.

La normalisation des tests sur des perturbateurs endocriniens

Sébastien LOUIS-ROSE – AFNOR

La commission de normalisation AFNOR/T95E "Ecotoxicologie" est en charge du programme visant à élaborer les normes pour l'évaluation de l'impact des polluants sur le milieu marin et terrestre à l'aide d'organismes biologiques. Elle regroupe les parties prenantes du domaine (ministère, chercheurs, laboratoires, bureaux d'étude, organismes publics, industriels) dans l'objectif d'établir par consensus un document de référence pour un sujet donné. L'enjeu du programme de normalisation est de valoriser et de diffuser, sur le marché économique, les travaux principalement issus du monde de la recherche, afin de mettre à disposition un corpus de normes basées sur des méthodes validées, compatibles avec les prescriptions applicables, partagées et acceptées par le plus grand nombre, et dont pourront s'emparer administrations, collectivités locales, industriels, associations et professionnels de l'environnement.

A l'écoute des besoins exprimés par les parties prenantes, la normalisation d'essais pour l'identification des effets des perturbateurs endocriniens dans les hydrosystèmes a débuté en 2013 au sein de la commission AFNOR/T95E pour répondre aux enjeux émergents et croissants en termes de prévention des risques sanitaires et environnementaux liés à ses substances.

Plusieurs projets de futures normes sont actuellement en cours de discussion :

- au niveau français : la commission AFNOR/T95E a créé en 2013 un groupe de travail piloté par Watchfrog, pour l'élaboration d'une norme française sur des essais *in vivo*, avec organismes aquatiques, qui mesure par fluorescence les effets de perturbateurs endocriniens ou de leurs mélanges sur les axes endocriniens - thyroïdien et œstrogénique.

- au niveau international (à l'Organisation Internationale de Normalisation – ISO) : une norme internationale à l'initiative de l'Allemagne composée de trois parties pour des essais *in vitro* est en cours d'élaboration. Les deux premières parties (lancées fin 2013) concernent la normalisation d'un essai d'œstrogénicité sur levures (YES test). La troisième partie initiée en 2014 couvre la caractérisation du potentiel œstrogénique à partir de lignée cellulaires humaines bioluminescentes.

Les normes devraient être disponibles entre 2015 (essais *in vivo*) et 2017 (essais *in vitro*).

Quelle recherche pour les perturbateurs endocriniens?

Marion GUST - MEDDE

La recherche française sur les perturbateurs endocriniens (PE) mobilise de nombreuses disciplines et de nombreux établissements de recherche.

Elle a été soutenue jusqu'à présent dans le cadre de plusieurs appels d'offres plus ou moins ciblés. Le seul programme de recherche spécifiquement dédié à la recherche sur les PE est le Programme National de Recherche sur les Perturbateurs Endocriniens (PNRPE), piloté par le Ministère est chargé de l'Ecologie. Ce programme, en appui au politique publique, existe depuis près de 10 ans et a permis de financer une quarantaine de projets pour 5 millions d'euros. Il s'appuie sur un comité d'orientation qui permet de définir les orientations stratégiques du programme et d'identifier les besoins des parties prenantes en terme de recherche, de valorisation et d'animation. Le conseil scientifique traduit ces orientations en thèmes de recherche, élabore le texte des APR et évalue les réponses et les résultats des projets. Une conférence internationale s'est tenue en décembre 2012 avec pour objectif la valorisation des projets du PNRPE mais aussi d'autres programmes en particulier celui de l'ANSES.

Outre ce programme spécifique, le Programme National de Recherche en Environnement, Santé et Travail (PNREST), piloté par l'ANSES, finance également des projets nationaux sur les PE. L'Agence Nationale de la Recherche (ANR), soutien de manière non spécifique la recherche sur les PE. Celle-ci se fait également au niveau européen et international.

Le PNRPE constitue un moyen de structurer la recherche en France. D'autres démarches ont également contribué à renforcer la capacité de la recherche française sur ce sujet : expertise collective de l'INSERM, réseaux ANTIOPES, de plateformes de l'INERIS...

Il est intéressant de dresser un panorama de ces travaux.

Comment évaluer la sécurité d'un produit destiné aux femmes enceintes ? Expérience d'une évaluatrice de la sécurité des produits cosmétiques

Corinne BENOLIEL - *Scientis*

Les perturbateurs endocriniens peuvent interférer avec le fonctionnement du système endocrinien et induire des effets néfastes sur l'organisme d'un individu ou sur ses descendants. Les femmes enceintes font parties des populations les plus sensibles aux perturbateurs endocriniens (troubles de la fonction reproductrice féminine, risque de mortalité intra-utérine, retard de croissance foetale).

Le Règlement n°1223/2009 relatif aux produits cosmétiques en vigueur depuis le 11 juillet 2013 impose de s'assurer de la sécurité de tous les produits mis sur le marché dans l'Union Européenne. Pour y répondre, les produits cosmétiques doivent faire l'objet d'une évaluation de la sécurité dans les conditions normales et raisonnablement prévisibles d'utilisation. Les données d'exposition sont alors prises en compte, à savoir notamment la population cible, la quantité de produit utilisée à chaque application, le site d'application... Les données toxicologiques et les propriétés de pénétration cutanée de l'ensemble des substances présentes dans le produit cosmétique doivent être étudiées, si elles existent... sachant que le recours à l'expérimentation animale est devenue impossible... Des marges de sécurité doivent être calculées pour chacune d'entre elles.

Comment mener l'évaluation de la sécurité d'un produit cosmétique destiné aux femmes enceintes ? Quelles sont les études à réaliser ? Comment identifier les perturbateurs endocriniens susceptibles d'être présents dans les produits cosmétiques ainsi que dans leur conditionnement primaire ? Comment appréhender leur passage systémique ?

Le but de cette évaluation spécifique est d'exclure tout risque d'exposition à un ingrédient toxique pour le fœtus. Aucun effet systémique risquant d'entraîner une perturbation du système endocrinien ne doit résulter de l'application de ces produits à destination superficielle du corps humain.

La Commission Européenne révisera le Règlement cosmétiques en ce qui concerne les substances

présentant des propriétés perturbant le système endocrinien lorsque des critères convenus par la Communauté ou au niveau international relatifs à leur identification seront disponibles, ou au plus tard le 11 janvier 2015.

Une résolution sur la protection de la Santé Publique contre les Perturbateurs Endocriniens fixe au 1er juin 2015 la modification des législations en vigueur (Règlements REACH, CLP, cosmétiques, biocides, pesticides, phytopharmaceutiques) afin d'appréhender et de réduire l'exposition humaine, en particulier des groupes vulnérables que sont les femmes enceintes, les bébés, les enfants et les adolescents, aux perturbateurs endocriniens

Cette résolution souligne notamment l'importance de protéger les femmes contre les risques potentiels que représentent les perturbateurs endocriniens ayant des effets oestrogènes ou anti-oestrogènes pour leur santé reproductive et préconise la mise en oeuvre des méthodes d'essais recommandées et récemment validées par l'OCDE (Cadre Conceptuel pour les Essais et l'Evaluation des Perturbateurs Endocriniens révisé en 2011 et Ligne Directrice 455 adoptée en octobre 2012).

Comment améliorer la maîtrise des risques de diffusion des perturbateurs endocriniens ?

Bruno TISSERAND – Veolia (voir page 11)

Présentation de l'Union des Industries Chimiques

Patrick LEVY - UIC

L'Union des Industries Chimiques est le porte-parole du secteur chimique auprès des pouvoirs publics nationaux, européens et des instances internationales. L'UIC agit pour la compétitivité et le développement de l'industrie chimique et de ses applications en France et aux niveaux régional, national et européen.

L'industrie chimique est fortement contributrice à l'économie française, avec plus de **156 000 salariés**, un chiffre d'affaires de près de **90 milliards d'euros et un solde positif de la balance commerciale de 4,4 milliards d'euros** du fait de son caractère fortement exportateur. Elle participe au maintien des emplois en France et au développement d'un tissu de PME/ETI dans les territoires.

L'UIC regroupe une trentaine d'experts qui croisent leurs travaux pour répondre au mieux aux problématiques des industriels de la chimie (questions techniques, économiques, fiscales, commerciales, juridiques, sociales, d'image...) et créer les conditions favorables au développement d'une chimie durable en France.

L'UIC comporte en son sein une **Commission Santé Environnement** qui aborde les questions relatives aux interactions entre les produits chimiques et la santé et l'environnement.

Les besoins des entreprises de la chimie en matière de tests

La perturbation endocrinienne correspond à des mécanismes d'action pouvant conduire à des effets sur la santé ou l'environnement lesquels peuvent être, **dans la plupart des cas, mis en évidence par les essais réalisés en application des réglementations, en particulier les essais listés dans les annexes VII à X de REACH, des règlements Biocides, Produits de Protection des Plantes...** Cependant, selon les avancées scientifiques et la validation des essais au niveau international et européen,

l'évaluation des propriétés de perturbation endocrinienne pourra faire l'objet de stratégie(s) complémentaire(s).

Au-delà de la réglementation, les entreprises se reconnaissent dans la stratégie d'évaluation des PE telle que préconisée par l'OCDE et considèrent que chaque méthode d'essai de façon individuelle a bien été validée. Elles estiment cependant que des **travaux restent encore à réaliser pour rendre cette stratégie totalement opérationnelle**, notamment en ce qui concerne la valeur prédictive des tests de screening.

La mise en place d'une coopération internationale dans le cadre des travaux supervisés par l'OCDE et un rapprochement avec les pays ayant engagé des travaux équivalents, en particulier l'US-EPA (Endocrine Disruptors Screening Program, EDSP) devrait également être pris en compte au niveau de la Stratégie Européenne. A cet effet, l'approche de l'US-EPA apparaît intéressante ; celle-ci propose d'analyser l'ensemble des données disponibles d'une liste de substances réglementées afin de pondérer chaque test par rapport à la démonstration d'un effet perturbateur endocrinien chez l'homme ainsi que son caractère prédictif.

Les positions de l'UIC sur la stratégie d'évaluation des PE

1. Programme coordonné européen d'évaluation

Sur la base d'un **processus de sélection au niveau européen dans le cadre de la mise en œuvre de la stratégie européenne**, une sélection de substances potentiellement PE (sur la base de critères de danger et d'exposition de populations vulnérables) pourrait s'opérer dans le cadre ou en marge de la liste du CoRAP, sur propositions des Etats Membres.

Après coordination entre les Etats Membres, **les substances seraient réparties entre les Etats volontaires pour réaliser leur évaluation de risques** dans le cadre d'un programme pluriannuel, tenant compte des données de danger et d'exposition ;

L'évaluation diligentée par les Etats Membres se ferait sur la base d'un **cadre méthodologique d'évaluation** prenant notamment en compte la stratégie de l'OCDE et d'autres initiatives prises au niveau mondial. **La France se verrait ainsi confier un lot de substances à évaluer** (5 substances / an évaluées par l'ANSES).

Les résultats des évaluations donneraient lieu à discussion entre les Etats Membres de telle sorte que **l'identification des PE avérés fasse consensus au niveau européen. Les PE avérés donneraient alors lieu à une analyse de la meilleure option de gestion des risques** (best RMO) pour déterminer la voie réglementaire la plus pertinente à appliquer (dans le cadre de REACH : autorisation/restriction, de dispositions sectorielles...).

2. Evaluation diligentée par les entreprises

Sur la base des essais réalisés en application des réglementations existantes (REACH annexes VII à X, PPP, biocides...), certains éléments, lorsqu'ils sont concordants et basés sur une évaluation scientifique (weight of evidence), **peuvent évoquer un mode d'action pouvant relever de la perturbation endocrinienne**.

Dans cette hypothèse, une évaluation complémentaire dont l'objectif premier est d'identifier des perturbateurs endocriniens avérés, peut être déployé par les entreprises. L'UIC incite fortement ses adhérents à s'engager dans ce type de démarche.

La position de l'UIC sur les évolutions de la réglementation

L'UIC tient à rappeler que **les questions relevant de la sécurité des produits chimiques doivent être abordées en priorité au niveau européen**. Seul le défaut d'initiative au niveau européen justifie d'une action nationale lorsque les intérêts de la santé publique sont clairement engagés. S'agissant des perturbateurs endocriniens, la Commission a indiqué depuis plusieurs mois son intention d'agir en révisant sa stratégie et en s'engageant dans l'élaboration d'une définition et de critères associés.

Pour qu'une approche (et a fortiori une réglementation) soit bien comprise, efficace et pérenne, il est nécessaire qu'elle s'appuie sur des données scientifiques incontestées. Les diverses positions exprimées montrent le niveau d'incertitude scientifique qui prévaut toujours sur ce sujet. **A défaut de données scientifiques incontestées, le Principe de précaution avec les critères bien définis dans la Charte de l'environnement devrait s'appliquer¹,** pouvant conduire les autorités publiques à mettre en place des mesures de précaution proportionnées. L'UIC réitère donc sa demande **pour que les mesures de précaution prises soient effectivement proportionnées et révisées à la lumière des avancées scientifiques.**

Dans ce contexte, l'UIC rappelle qu'elle est **favorable à l'adoption d'une définition européenne basée sur celle de l'OMS, en prenant bien en compte chaque élément de cette définition, ce qui conduit à l'assortir de critères** (mode d'action, effets adverses, puissance de l'effet, sévérité, irréversibilité) permettant l'identification des perturbateurs endocriniens avérés. Les contextes d'application de cette définition pour les différents types de produits concernés doivent être appréciés selon les exigences attachées à chaque réglementation (REACH, PPP, Biocides, DM, Cosmétiques...). Pour la chimie, **il n'est pas nécessaire (ni même techniquement possible compte tenu du règlement CLP) d'aller vers une catégorisation plus avancée** des PE « suspectés ».

Les stratégies de tests plus spécifiques du mode d'action PE manquant encore de robustesse (prédictivité, reproductibilité, disponibilité...), **il n'est pas envisageable à l'heure actuelle de modifier les annexes de REACH pour y inclure des essais spécifiques** PE à conduire de façon systématique. Cette approche « au cas par cas » et volontaire permettrait notamment de tester la validité de l'approche OCDE d'identification des PE avérés.

L'existence ou non d'un seuil d'effet : les éléments scientifiques disponibles à ce jour ne permettent pas de considérer a priori l'ensemble des perturbateurs endocriniens comme des substances exerçant un effet sans seuil. **Seule une évaluation substance par substance sur la base d'une approche « poids de la preuve » (*weight of evidence*) peut permettre de statuer sur l'existence de seuils. Plusieurs études scientifiques montrent en effet l'existence de seuils d'effet pour plusieurs perturbateurs endocriniens.**

Les propositions de l'UIC en matière de substitution des PE

L'UIC estime que la substitution des perturbateurs endocriniens avérés (et plus globalement des substances qualifiées d'« extrêmement préoccupantes » au sens de REACH) ne peut se décréter dans une stratégie ou une réglementation ; elle nécessite une réelle prise en compte de toutes les dimensions et des enjeux, à savoir :

- **L'évaluation de la sécurité sanitaire et environnementale des solutions de substitution**, qu'elles soient « chimiques » ou non ;
- L'analyse de la **faisabilité technique** et opérationnelle des solutions proposées ;
- L'évaluation de **l'impact micro-économique**, notamment sur les PME, et **macro-économique** à l'échelon d'une filière, d'un Etat, de l'Europe... ;
- **Leur acceptabilité par les utilisateurs** industriels ou professionnels et, le cas échéant, par le consommateur final.

Enfin, compte tenu des impacts très significatifs sur les entreprises, l'UIC considère qu'une **analyse des impacts socio-économiques préalable à toute initiative réglementaire devrait être réalisée.**

¹ « Lorsque la réalisation d'un dommage, bien qu'incertaine en l'état des connaissances scientifiques, pourrait affecter de manière grave et irréversible l'environnement, les autorités publiques veilleront, par application du principe de précaution, et dans leurs domaines d'attribution, à la mise en œuvre de procédures d'évaluation des risques et à l'adoption de mesures provisoires et proportionnées afin de parer à la réalisation du dommage. »

Perturbateurs endocriniens

Michel LOUBRY - *PlasticsEurope*

Le sujet est un point d'attention à l'agenda politique et médiatique. La Commission européenne est en train de revoir sa position sur les perturbateurs endocriniens qui date de 1999. Depuis lors, la connaissance scientifique et les méthodologies d'analyse ainsi que le cadre réglementaire ont sensiblement évolué. PlasticsEurope se félicite du débat en cours qui prend en compte ces évolutions. Les implications réglementaires qui en découleront devront nécessairement être fondées sur une base scientifique.

Comprendre la science: Que sont les perturbateurs endocriniens et comment les réglementer?

L'OMS définit comme perturbateur endocrinien « une substance ou un mélange exogène qui **altère les fonctions du système endocrinien et entraîne en conséquence des effets nocifs (adverses) sur la santé d'un organisme intact** ou de sa descendance, ou de (sous-) populations ». Sur la base de cette définition et les directives pertinentes de l'OCDE, certains États membres (proposition commune Allemagne-UK) ont élaboré des critères pour identifier et évaluer les perturbateurs endocriniens. Nous encourageons l'utilisation de cette approche, car elle fournit des critères clairs, objectifs et scientifiquement fondés qui doivent être utilisés dans une évaluation des risques, fondement de la décision des autorités compétentes. Si une substance préoccupante est identifiée, alors les mesures appropriées sur le plan réglementaire, par exemple restrictions ou interdictions, peuvent être appliquées par la législation existante comme le règlement REACH.

C'est la dose qui fait la différence

Certaines substances naturelles dans le régime alimentaire (par exemple le soja, les carottes, le café, le vin rouge, le houblon, etc) peuvent interagir avec le système endocrinien, mais ne provoqueraient des effets néfastes qu'à très fortes doses. En dessous de ces doses élevées, ces substances peuvent être consommées sans inquiétude. La même chose s'applique pour les substances synthétiques qui ont des effets similaires: Pour ces substances, la dose journalière admissible (= dose sécuritaire) est fixée bien au-dessous du niveau auquel aucun effet ne peut être mesuré. Certains scientifiques prétendent qu'il n'y a pas de seuils en dessous desquels une substance « perturbateur endocrinien » peut être considérée comme sûre. Cette théorie est très controversée et il n'y a pas pour le moment de preuves reconnues et acceptées. Les résultats des études exploratoires qui ont démontré ce que l'on appelle des effets à faibles doses ne peuvent être reproduits ou confirmés par des études plus complètes.

Il y a déjà un ensemble d'exigences réglementaires qui garantit la sécurité des matières plastiques

L'industrie des plastiques est très impliquée dans les travaux permettant une utilisation sûre de ses produits. Les substances chimiques utilisées dans les plastiques doit se conformer à REACH, la réglementation la plus stricte pour les produits chimiques à travers le monde. De plus, une législation spécifique s'applique aux applications sensibles en plastique comme les matériaux au contact des aliments ou les jouets. Cela garantit que les produits en plastique mis sur le marché sont sûrs.

Messages clés:

La compréhension de la science est un élément clé

Lorsqu'une substance interagit avec le système endocrinien, cela ne signifie pas qu'elle génère forcément un effet néfaste sur l'organisme. Même si une substance est considérée comme un perturbateur endocrinien potentiellement actif, des niveaux d'exposition sûrs (= seuils) peuvent être définis.

Les règlements devraient être fondés sur des critères scientifiques internationalement reconnus.

Les lignes directrices d'évaluation des perturbateurs endocriniens sont actuellement à l'étude au niveau international. L'UE et la réglementation nationale devrait suivre ces critères scientifiques pour l'identification, l'évaluation et la réglementation de ces substances.

Nécessité d'une communication responsable des risques

Des informations contradictoires et imprécises sur certains dangers augmentent inutilement l'aspect émotionnel de la perception du risque par le public. Par conséquent, il est indispensable pour tous les scientifiques et les autorités de communiquer de façon précise et scientifique sur les perturbateurs endocriniens et de bien faire la distinction entre danger et risque. Ce n'est qu'à cette condition que le débat public sera possible.

Denis REQUIER - *Polepharma*

Pôle Pharma a pour rôle de stimuler le développement Economique et Industriel des acteurs de la première filière pharmaceutique Française par des actions favorisant la Compétitivité, l'Innovation et le dynamisme du réseau.

Légitime par son ancrage territorial et sa représentativité, Pôle Pharma est une force de proposition auprès des pouvoirs publics en terme de politique industrielle de santé.

Michel URTIZBEREA - *IUPP*

L'industrie phytopharmaceutique et l'industrie Chimique prend la thématique des Perturbateurs Endocriniens de façon très sérieuse car il s'agit d'un sujet très important concernant en premier lieu les populations les plus vulnérables (femmes enceintes, foetus, enfants en développement ...). Il y a pour les industriels deux enjeux, le développement d'une stratégie de tests claire permettant de mettre sur le marché des produits ne présentant pas d'effet PE et la gestion des produits déjà sur le marché et pour lesquels des questions se posent. Malgré sa contribution active à la Stratégie Nationale sur les Perturbateurs Endocriniens (SNPE), l'industrie, qui réclamait la prise en compte de points importants comme la puissance des effets observés et l'approche par le poids de la preuve, n'a pas obtenu que ces demandes soient intégrées dans la version finale de la SNPE portée par le Gouvernement. L'industrie dans son ensemble s'inquiète des conséquences d'une telle situation: manque d'outils discriminants pour les substances vraiment perturbatrices par rapport aux substances entraînant des modifications sans perturbation. Quelles conséquences à attendre pour les produits qui se retrouveront dans des listes et pour lesquels un amalgame sera fait entre les avérés, les présumés et les suspectés. Sur de tels principes des produits comme les soja contenant des phytoestrogènes ou la caféine pourraient être éliminés alors que de simples mesures de prévention pour les populations à risque semblent déjà très efficaces La mise en place de programmes de substitution ne s'improvise pas et l'importance d'être clair sur les substances à considérer en priorités est clef. Le choix des substances à détecter est aussi un point crucial pour éviter la confusion et la déstabilisation des industriels.

Michel URTIZBEREA - *Position BASF*

NOTE DE SYNTHÈSE SUR LES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS

Perturbateurs endocriniens : de quoi parle-t-on ?

A l'issue de la conférence environnementale de septembre 2012, le gouvernement français a décidé de définir une stratégie nationale sur les perturbateurs endocriniens, ces substances suspectées de

modifier le système hormonal de la faune et de l'Homme. Ainsi, des critères permettant de juger si une substance peut être considérée comme perturbatrice endocrinienne ou non, ont été proposés.

Le sujet s'avère très émotionnel car les perturbateurs avérés présentent un danger pour les populations vulnérables que sont les femmes enceintes, les fœtus, les jeunes enfants.

L'OMS a publié en 2002 une définition d'un « perturbateur endocrinien » ; celle-ci a été reconfirmée par les scientifiques en 2012. Il s'agit de « substances chimiques d'origine naturelle ou artificielle étrangères à l'organisme qui peuvent interférer avec le fonctionnement du système endocrinien et induire ainsi des effets délétères sur cet organisme ou sur ses descendants ».

Cette définition est clé car elle précise qu'une molécule ne peut être classée en tant que perturbateur endocrinien qu'à partir du moment où elle génère des effets néfastes pour la santé chez un organisme vivant intact.

Un débat émotionnel ou la confusion ne contribue pas à la résolution des enjeux

Dans ce débat très émotionnel, certaines organisations non gouvernementales jouent sur la fibre sensible pour clamer des faits non avérés : de très nombreuses molécules chimiques seraient considérées comme étant responsables de tous les maux (obésité, maladies cardio-vasculaires, diabète, cancers, baisse de la fertilité...) au travers de leur effet perturbateur endocrinien.

La position de l'industrie : une évaluation rationnelle fondée sur des données scientifiques fiables

La position de l'industrie est de faire la part des choses entre d'une part certaines molécules qui présentent un effet avéré méritant clairement des mesures de gestion encadrée de l'exposition voire suppression de la substance, et d'autre part les molécules qui ont un effet temporaire sur l'activité hormonale sans la perturber. Si l'approche très conservatrice proposée par la France était adoptée, le principe de précaution pourrait conduire à la disparition de très nombreux aliments (café, soja, épinard,...) contenant des substances d'origine naturelle (caféine, génistéine...) qui ont un effet temporaire sur l'activité hormonale sans la perturber. L'intégration de cette notion de puissance perturbatrice est donc fondamentale. En faisant l'analogie avec la puissance d'un moteur, si l'éthinylestradiol contenu dans la quasi-totalité des formulations modernes des pilules contraceptives combinées est évalué à 1 000 000 cv, alors la puissance du coumestrol que l'on retrouve dans les épinards ou encore dans les choux de Bruxelles serait de 10 000 cv et celle de génistéine présente dans le soja s'élèverait à 37 cv. En comparaison, la puissance des substances de synthèse de la famille des parabènes (butylparabène, benzylparabène...) utilisées notamment dans le domaine de la cosmétique en tant que conservateur, s'établirait à moins de 1 cv.

La prise en compte de la puissance avait été proposée comme point important à considérer par à l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) elle-même dans ses avis de 2011 et 2012 mais n'a pas été reprise dans le document final de la Stratégie Nationale sur les Perturbateurs Endocriens.

Stratégie européenne et nationale : enjeux et calendrier à venir

■ A L'ECHELLE NATIONALE

Le gouvernement français, a adopté le 29 avril dernier, après avis du Conseil national pour la transition écologique, la stratégie nationale contre les perturbateurs endocriens. La stratégie retenue constitue le scénario le plus radical qui pouvait être imaginé, allant au-delà même des positions portées par la DG Environnement au sein de la Commission Européenne et reprenant les arguments considérés par l'industrie comme très militantes sur le sujet. L'essentiel des propositions faites par l'industrie a été écarté (prise en compte de la notion de puissance, de l'exposition...). Trois classes de perturbateurs endocriens ont été définies avec la mise en œuvre du principe d'exclusion pour les catégories perturbateurs endocriens « avérés » et « présumés » (ou mesures de gestion de risques pour ces derniers. Le gouvernement confie, par ailleurs, à l'ANSES, l'expertise d'au moins une quinzaine de substances chimiques sur 3 ans. Ségolène ROYAL a, dès lors, annoncé que 5 substances (mé-

thyl-parabènes, BHA, composé de l'acide orthoborique, DINCH et DEHTP) seront expertisées dès 2014 par l'ANSES alors même que le gouvernement prétend agir selon le calendrier européen !

En outre, l'industrie s'étonne de retrouver dans un rapport parlementaire d'information sur la stratégie européenne en matière de perturbateurs endocriniens du député écologiste Jean-Louis Roumégas des passages entiers de revendications de certaines ONGs, sans la prise en compte des avis des scientifiques et des avis de l'industrie de l'industrie.

■ A L'ECHELLE EUROPEENNE

Les critères actuels proposés au sein de la Commission Européenne par la DG Environnement ont été refusés par la DG Santé et Consommateurs (SANCO) et la DG Entreprises qui ont demandé la réalisation d'une étude d'impact socio-économique de la mise en place de tels critères. L'enjeu est de placer le curseur au bon endroit : suffisamment protecteur pour la population sans une surexpression du principe de précaution pouvant être à l'origine d'entrave au développement de l'innovation et à une perte de compétitivité des entreprises (déstabilisation importante de pans entiers de l'industrie chimique, pharmaceutique, biocides...).

Le calendrier européen, retardé par rapport aux échéances initialement annoncées par la Commission, prévoit à ce jour, suite à la publication et à la consultation publique de l'étude d'impact socio-économique :

- La publication du rapport final de l'étude socio-économique courant de l'été 2015
- L'adoption des critères liés à la définition des perturbateurs endocriniens probablement fin 2015

Notre demande

- Il est important que la France attende que l'Europe définisse les perturbateurs endocriniens pour protéger efficacement la santé de nos concitoyens sans nouvelle surenchère réglementaire inutile.
- Compte-tenu des impacts majeurs en terme de perte de compétitivité et de distorsions de concurrence que cette stratégie risque d'occasionner, il serait souhaitable que l'Office Parlementaire d'Evaluation des Choix Scientifiques et Technologiques puisse se ressaisir de ce dossier afin que le parlement propose, sur ce genre de sujet complexe, une approche plus rationnelle, construite sur des données scientifiques fiables, s'appuyant sur les Agences de Santé Publique, permettant d'informer le grand public.

Comment innover tout en étant privé d'un certain nombre de tests réglementaires validés et non encore remplacés

Adama TRAORE - LVMH

Présentation de notre structure

Fondé en 1980, LVMH Recherche est un Groupement d'Intérêt Economique (G.I.E.) dont les membres sont aujourd'hui Parfums Christian Dior, Guerlain, Parfums Givenchy et Fresh. LVMH Recherche regroupe environ 260 chercheurs, situés à Saint Jean de Braye et Paris.

Notre activité de recherche s'étend de la connaissance de la peau et des utilisateurs de cosmétiques, à la création de formulations aptes à l'industrialisation. Tout au long du processus, l'innovation s'exprime au travers des ingrédients, des formulations et des procédés que nous élaborons, unis dans un même objectif : la création de nouvelles solutions de beauté.

Notre stratégie sur les PE

Notre stratégie suit celle défendue par l'industrie aujourd'hui : à savoir assurer la sécurité de nos consommateurs et de nos produits mis sur marché. Pour arriver à ce but, nos ingrédients sont évalués en

suivant des "Notes Guidances établies" pour tous les end-points. En ce qui concerne ce sujet des perturbateurs endocriniens nous ne voyons pas de raisons particulières de les traiter différemment des autres end-points.

Nous basons notre stratégie sur une bonne connaissance / caractérisation de nos matières premières, suivie d'une étude de relations structures - activités, puis d'une expertise des données disponibles (e.g. littérature, *in vitro*, *in vivo*) conformément au règlement cosmétique en vigueur.

Nos besoins en tests

A la suite de l'arrêt des tests sur animaux, nous souhaiterions disposer rapidement des Tests alternatifs & une stratégie propre à notre industrie pour continuer à innover.

Nos besoins sont donc une batterie de tests vitro et/ou eco-toxicologiques garantissant la sécurité de nos consommateurs.

Nos attentes sur les évolutions de la réglementation

La réglementation devrait soutenir l'innovation dans notre industrie.

Elle devrait établir un cadre réglementaire unique (inter industries, intercontinentale) pour traiter ce sujet comme tous les autres end-points.

Nos propositions

*Le principe du "Weight of evidence" (e.g. *silico*, *in vitro* screening, tests de bio-dégradation, tests d'évaluation d'effets sur les systèmes biologiques: daphnie, poisson...)

*Le principe du TTC

Béatrice de REYNAL - Club PAI-Food ingredients

Créé en 1993, le Club PAI est une association loi 1901 qui regroupe 60 professionnels des Produits Alimentaires Intermédiaires. Il a pour but de créer une dynamique afin de mieux définir et de faire connaître les filières PAI, d'échanger les expériences et de mieux communiquer vers les utilisateurs et la presse spécialisée. <http://www.clubpai.com/>

Les industriels de l'agro-alimentaire ayant déjà été touchés par des crises importantes sont très sensibles à toute information sur la réglementation qui se révélerait impactante sur leurs activités.

L'eau du robinet contient-elle des perturbateurs endocriniens ?

Bruno CORMAN – *Profilomic (voir page 13)*

Impact of p,p'DichloroDiphenylTrichloroethane (p,p'DDT) on the FSH receptor activity.

Mathilde MUNIER - *Inserm1083 - Cnrs6214*

Mathilde Munier¹, Julie Groueff², Louis Gourdin¹, Régis Coutant¹, Birgit Schiott², Marie Chabbert¹ and Patrice Rodien¹

¹ CNRS UMR6214 - INSERM U1083, Medical School, University of Angers, France

² The Center for Insoluble Protein Structures, Aarhus University, Denmark

In humans, exposure to p,p'DDT, an organochloride insecticide defined as endocrine disruptor (ED), is frequently associated with reproductive diseases (genital malformation and precocious puberty). p,p'DDT accumulates in the environment. Thus, while banned in most countries, it is a major pollutant. The FSH receptor (FSHR) is involved in gonadal function especially and gametogenesis. This receptor is preferentially coupled to Gs thus to the production of cAMP. Given the importance of this GPCR in reproductive function, we aimed at investigating the impact of p,p'DDT on FSHR activity. We have used a stably transfected CHO cell lines overexpressing the human FSHR and assessed the effect of p,p'DDT by measuring the production of cAMP using biosensor kit. Our data show that p,p'DDT has a dose-dependent potentiating effect on FSH-stimulated cAMP accumulation. It increases the maximal response of FSHR 1.3-fold without changing FSH sensitivity or basal activity. Interestingly, we show a 1.4-fold rise of forskolin (an AC activator)-induced cAMP accumulation with p,p'DDT in CHO-FSHR cells compared with CHO cells where no effect is observed, indicating that the p,p'DDT effect on cAMP is FSHR-dependent. In addition, p,p'DDT has no effect on the endogenous calcitonin receptor function. Finally, to establish which domain of the FSHR (ectodomain or transmembrane domain) may interact with p,p'DDT, we developed and used structural models of FSHR for molecular docking of p,p'DDT. Preliminary results reveal preferential binding sites in the internal cavity of FSHR. The sensitivity of FSHR to a low molecular weight agonist, binding to the internal cavity of transmembrane domain, increases 10-fold in presence of p,p'DDT, making likely the presence of different binding sites. In order to validate the putative binding sites of p,p'DDT, FSHR mutants in the transmembrane helices 3 and 7 have been engineered and are currently under investigation. In summary, p,p'DDT seems to behave as a positive allosteric modulator of FSH receptor. Moreover, this work suggests that beyond their effects on nuclear receptors, ED could also modify the GPCR activity and contributes to a better understanding of mechanisms of action of ED.

Méthodologies : bioanalyses et mesures physico-chimiques, in vitro

Systèmes testés : stéroïdogénèse

Degré de maturité du test : en cours de développement

Sécurité alimentaire et l'analyse de Perturbateurs endocriniens: « Bisphénol A ; nonyl phénol ; estrogènes ; parabènes »

Kaynoush NARAGHI - POLYINTELL

Delphine Derrien ; Olivier Lépine ; Michel Arotçaréna ; Kaynoush Naraghi et Sami Bayoudh

Les perturbateurs endocriniens comme les bisphénols, les nonylphénols et parabènes sont actuellement présents dans une grande variété de matrices alimentaires; cosmétiques ou environnementales. En raison de la complexité des milieux dans lesquels on les trouve, l'analyse de ces substances requière l'utilisation d'un prétraitement d'échantillons en complément d'outils analytiques (GC ou LC) de plus en plus performants. Ce prétraitement permet d'obtenir des analyses fiables et reproductibles, d'atteindre de meilleures sensibilités et réduit de manière conséquente la maintenance des équipements liée à l'encrassement.

Nous présenterons de nouvelles méthodes de prétraitement d'échantillons basées sur l'extraction sur phase solide (SPE) à partir de polymères à empreintes moléculaires (MIPs). Les MIPs sont des matériaux polymère très stables aux solvants (aqueux ou organiques), aux variations de pH et à la température. La souplesse du procédé de synthèse de ces matériaux lui confère des propriétés de reconnaissance et de rétention sélectives d'une molécule ou d'une famille de molécules. Un nouveau produit peut être développé en très peu de temps. L'ensemble de ces qualités sont les principales raisons de leur utilisation dans les applications de prétraitement d'échantillons pour les matrices les plus complexes.

La détermination de perturbateurs endocriniens comme les bisphénols, les nonylphénols et les parabènes sera effectuée dans des matrices alimentaires variées telles que les viandes, poissons, lait, légumes...mais également de matrices cosmétiques (crème ; shampooing...) ou de matrices biologiques (urine ; plasma ;...). Lors du prétraitement simple et rapide, le taux de récupération des analytes est élevé (>80%) permettant une analyse facile à interpréter et fiable.

Méthodologies : bioanalyses et mesures physico-chimiques

Systèmes testés : oestrogénique, stéroïdogénèse

Degré de maturité du test : commercialisé

Analyse et évolution d'une diversité d'hormones dans des filières de traitement d'eau

Amélie GUILLON - Suez Environnement (voir page 14)

Criblage à haut débit de substances à activité œstrogénique

Véronique LE TILLY - LIMATB-EG2B Université de Bretagne-Sud

A. Le Grand, V. Bourgeteau, V. Maxime, O. Sire et V. Le Tilly

Equipe Génie des Bioprocédés et Biomolécules, LIMAT-B, CER Y. Coppens - UBS, 56017 Vannes
EPHYLA, CER Y. Coppens - UBS, 56017 Vannes

Les effets nocifs des substances œstrogéniques sont aujourd'hui bien référencés ; en effet, chez l'homme ces substances peuvent induire des problèmes de reproduction, génotoxicité, respiratoire, cancérogénicité, neurotoxicité...; chez la faune aquatique ont été observés une féminisation des mâles, un développement incomplet des organes génitaux, des malformations, des mortalités embryonnaires. De part leurs effets physiologiques néfastes pour les organismes, ces substances doivent être soumises à une réglementation stricte. Toutefois, parmi ces substances, sont retrouvés des composés œstrogéniques purs ou partiels et des composés anti-œstrogéniques purs. Par ailleurs, il est à préciser que la connaissance des substances œstrogéniques reste encore à l'état exploratoire.

Depuis des années, nos travaux de recherche sont focalisés sur les mécanismes responsables de l'activation transcriptionnelle de plusieurs récepteurs aux œstrogènes. Toutes les compétences développées au cours de ces années ont été mises à profit pour la mise au point de deux méthodologies complémentaires, basée in cellulo pour l'une et in tubo pour l'autre, pour détecter et doser ces micropolluants œstrogéniques présents dans différents produits, de l'ingrédient jusqu'au produit fini.

Après avoir mis au point les techniques d'extraction de ces micropolluants issus de produits finis, nous avons évalué, en utilisant la méthodologie in cellulo basée sur la mesure de l'expression de gènes induite par l'activation transcriptionnelle du récepteur aux œstrogènes, le risque œstrogénique de produits issus des cosmétiques (parfum, huile et crème), des IAA (galettes, capsules,...), des emballages (films étirables, housse mortuaire) et des eaux de surface. A partir de ces mesures, nous pouvons estimer une concentration relative d'œstrogènes.

Parallèlement, la méthodologie in tubo basée sur l'interaction moléculaire entre ces composés œstrogéniques et leur récepteur a été mise au point en utilisant des composés purs, elle pourra également s'étendre à des produits finis selon des protocoles d'élution à définir. Cette technique présente l'avantage d'être extrêmement simple et rapide, donc de cribler à haut débit des molécules ou des compositions potentiellement œstrogéniques et/ou anti-œstrogéniques. La méthodologie in cellulo peut être mise en œuvre pour discriminer entre ces 2 familles de molécules.

Méthodologies : in vitro, in tubo

Systèmes testés : œstrogénique

Degré de maturité du test : en cours de développement, recherche de partenaires pour validation

Test ELISA de quantification des perturbateurs endocriniens dans les eaux

Sylvain ENGUEHARD - NOVAKITS (voir page 14)

Polluants dans le lait maternel

Raphaël SERREAU - Hôpital Necker Paris (voir page 12)

Evaluation du risque d'exposition aux perturbateurs endocriniens pour la santé animale et humaine

Delphine PILLON - INRA

Lyes Derouiche, Anne Duittoz, Pascal Vaudin, Delphine Pillon

L'équipe de recherche MiDyNNet de l'UMR-PRC du Centre INRA Val de Loire a deux objectifs : (i) produire des connaissances scientifiques sur l'effet des perturbateurs endocriniens (PE) sur la fonction de reproduction et (ii) mettre au point des tests *in vitro* d'évaluation toxicologique de xénobiotiques.

Les PE sont des micropolluants altérant notamment la reproduction des vertébrés en interférant avec les hormones stéroïdes endogènes impliquées dans le développement sexuel et l'organisation cérébrale des circuits neuroendocrines qui coordonnent la physiologie et les comportements de manière sexe-spécifique. L'éthinylœstradiol (EE2) est le principal composant des pilules contraceptives. Partiellement métabolisé par l'organisme, il contamine drastiquement les environnements aquatiques profonds et de surface. En conséquence, il est essentiel d'évaluer les risques pour la santé humaine et animale associés à l'exposition environnementale à l'EE2. Par une approche intégrative, multiéchelle et multidisciplinaire, nous déterminons les conséquences physiologiques de l'exposition à l'EE2 et les mécanismes d'actions cellulaires et moléculaires impliqués. Nos résultats montrent que, chez la souris, l'exposition développementale à des doses environnementale à l'EE2 modifie des paramètres physiologiques et comportementaux de la vie reproductive adulte. Certains de ces paramètres présentent une transmission transgénérationnelle.

La communauté européenne (CE) encourage fortement le développement d'alternatives à l'expérimentation animale. La mise au point de tests toxicologiques *in vitro* est donc une nécessité. Les modèles *in vitro* permettent une évaluation fine des effets de mélanges de xénobiotiques. L'objectif du projet ToxEmergenCe, soutenu par la région Centre, est de construire des lignées cellulaires neurales, obtenues après modification génétique de cellules précurseurs du système GnRH (Gonadotrophin Releasing Hormone). La GnRH est une neuro-hormone hypothalamique qui contrôle la totalité de la fonction de reproduction chez les mammifères. L'obtention de ces lignées permettra d'identifier les phénotypes morphologiques et fonctionnels induits par les xénobiotiques et les mécanismes moléculaires impliqués à la suite d'une exposition par ces xénobiotiques, ceci aussi bien sur les cellules souches que sur les cellules différenciées GnRH.

Méthodologies : in silico, in vitro, in vivo

Systèmes testés : oestrogénique

Degré de maturité du test : en cours de développement

Comparaison entre la production de testostérone et l'expression des enzymes clef de la stéroïdogénèse dans le testicule foetal murin en réponse à divers stimuli.

Tiphany GRISIN - UMR 967 labo LDG

T. Grisin, R. Hervé, S. Tourpin, M.J. Guerquin, D. Moison, V. Rouiller-Fabre, R. Habert et G. Livera

La production de testostérone du testicule foetal est capitale pour permettre la masculinisation correcte de l'embryon mâle. Parmi les différentes enzymes qui concourent à la stéroïdogénèse, il est peu clair quelle est ou sont le(s) étapes limitantes.

Nous avons exposé, en culture organotypique, des testicules foetaux de souris de 12,5 jpc à 5 régulateurs ou perturbateurs connus de l'activité des cellules de Leydig: la Luteinizing Hormone (LH), l'acide rétinoïque (AR), le diethylstilbestrol (DES), le mono-2-ethylhexyl phtalate (MEHP) et le bisphenol A (BPA).

La LH, l'AR et le MEHP simulent la production de testostérone et le DES et le BPA inhibent celle-ci. Après trois jours d'exposition, l'expression de Star, P450scc, P450c17, 3bHSD, 17bHSD et de l'aromatase a été mesurée. De manière intéressante, il apparait i) que l'expression de la 3bHSD et de la 17bHSD ne sont pas des paramètres limitant la production de testostérone, ii) que l'expression de l'aromatase semble capable de moduler le taux d'androgènes dans le testicule foetal. En effet, seule l'inhibition du taux d'aromatase en réponse à l'AR peut expliquer la hausse simultanée du taux de testostérone. De plus, l'inhibition de l'aromatase en présence d'acide rétinoïque empêche la stimulation de la production de testostérone. Les causes de l'inhibition de la sécrétion de testostérone en présence d'une substance oestrogénomimétique ne semblent pas pouvoir être élucidées simplement par la mesure de l'expression des enzymes de biosynthèse des stéroïdes.

En conclusion, cette étude révèle pour la première fois l'implication non négligeable de l'aromatase dans la production de testostérone par le testicule foetal.

Méthodologies : bioanalyses et mesures physico-chimiques, in vitro

Systèmes testés : androgénique, stéroïdogénèse

Degré de maturité du test : en cours de développement

3Rs alternatives for early identification of endocrine disruptors

Tzutzy RAMIREZ - BASF SE Experimental Toxicology and Ecology

Tzutzy Ramirez, Susanne Kolle, Hennie Kamp Robert Landsiedel, Bennard van Ravenzwaay.

BASF SE Experimental Toxicology and Ecology, Germany

Endocrine disruptors (EDs) are a group of natural or synthetic compounds that have the capacity to interact with the endocrine system from living organisms. Due to the impact that this interaction could have on human health and wildlife, there is an increasing interest in assessing the risk of the exposure to EDs. The US EPA developed the Endocrine Disruptor Screening Program (EDSP), which has been recently implemented. With it, a large number of experimental animals will be used, even for testing some of the *in vitro* assays of the Tier 1 approach. Here we present a testing paradigm which includes three innovative and robust test systems, with which the detection of EDs can be achieved in a way that includes both replacement as well as a reduction through refinement concept.

The first test system is based on the transcriptional activation of transgenic yeast for detection of compounds that interact with the human estrogen or androgen receptor, the second is effects on steroid hormone biosynthesis were assessed using the human cell line H295R screening assay based on OPPTS 890.1550 and OECD TG 456. The third approach involves the identification of EDs metabolic profile by means of metabolomics tools. The metabolome profile is derived from a small blood sample obtained during regulatory testing; identification is achieved using a data base (MetaMap®Tox) which contains profiles of reference compounds. The combination of these methods will not only contribute to refinement and reduction of animal testing, but also, allows for a sound assessment of the endocrine disruption potential of compounds.

Méthodologies : in vitro, in vivo, alternative methods

Systèmes testés : oestrogénique, androgénique, stéroïdogénèse

Degré de maturité du test : publié

POSTER #11-C

A sensitive *in-vitro* bio-assay to assess the potential toxicity of waters on spermatogenesis

Guillaume MARTIN - *Kallistem (voir page 16)*

POSTER #12-C

Testing of estrogenic and androgenic reference compounds using 2 versions of the yeast-based YES and YAS assay

Markus KAMBER - *Xenometrix AG (voir page 17)*

POSTER #13-C

Approches moléculaires des effets de toxines marines et de micropolluants sur modèles cellulaires.

Mariem LAAMARI - *LIENSS- Université de La Rochelle (voir page 19)*

Evaluation *in vitro* des perturbateurs endocriniens dans l'eau: des outils pertinents pour la caractérisation et la gestion de la qualité des eaux environnementales, de ressource ou industrielles.

Anthony MARCONI - *VigiCell*

Laurent Paulic, Emmanuelle Moll, Caroline Codron, Jean-Emmanuel Gilbert & Anthony Marconi

La présence de perturbateurs endocriniens dans l'environnement est une préoccupation croissante en termes de santé humaine et environnementale. L'évaluation de la qualité de l'eau est un enjeu majeur à ce titre, cette dernière n'étant pas seulement un aliment primordial mais aussi une ressource naturelle et industrielle qui l'est tout autant.

VigiCell implémente depuis de nombreuses années divers bioessais de détection d'impacts sur le vivant spécifiquement dédiés au suivi de la qualité de l'eau. Dans cette optique, la détection biologique de perturbateurs endocriniens stéroïdiens ou thyroïdiens a une importance particulière. Ces tests reposent sur l'utilisation *in vitro* de cellules humaines (MELN, PALM et HG5LN-TR) équipées de gènes rapporteurs permettant l'émission d'un signal lumineux directement dépendant de l'activation des récepteurs hormonaux d'intérêt. Point crucial, ces modèles sont mis en oeuvre via des protocoles spécialement étudiés pour les matrices aqueuses, permettant une semi-quantification pertinente et robuste des activités hormonales présentes dans des eaux de tous types. Ces dernières sont soit testées telles qu'elles, via l'utilisation de suppléments nutritifs choisis permettant la mise en contact directe avec les cellules, soit après extraction ciblée sur colonne type C18 lorsque ceci s'avère préférable.

Cette méthode a permis d'explorer la présence de perturbateurs endocriniens dans des eaux naturelles à l'échelle d'un bassin, au niveau de points de captage d'usines de potabilisation ou directement sur des rejets types industriels.

Ainsi, le suivi des perturbateurs endocriniens au niveau d'une 15aine de sites répartis sur le bassin Adour-Garonne a pu mettre en évidence les pressions de pollution des zones fortement anthropisées (agglomérations, zones industrielles etc.) sur le milieu au travers de comparaisons amont/aval multiples, lesquelles pressions étaient difficilement ou non observables avec des méthodes purement physico-chimiques.

De même, le suivi au niveau de l'usine de potabilisation de la Marne a montré des dynamiques météo- et période-dépendantes reflétant l'impact des activités amont et enrichissant les connaissances liées au pilotage et au dimensionnement de la station.

Enfin, les rejets de diverses industries ont aussi été étudiés, jetant une lumière pertinente sur leur dangerosité et les moyens de la gérer.

Méthodologies : bioanalyses et mesures physico-chimiques, in vitro

Systèmes testés : thyroïdien, oestrogénique, androgénique

Degré de maturité du test : commercialisé

Inclusion and removal of pharmaceutical residues from aqueous solution using water- Insoluble cyclodextrin polymers

Mohamed SKIBA - *Université de Rouen*

L. Moulahcene¹, M. Skiba^{1,2}, F. Bounoure¹, N. Milon¹ and M. Lahiani-Skiba¹

¹Pharmaceutical Technology and Biopharmaceutics Laboratory, Faculty of Medicine and Pharmacy, Rouen University, 22 Bd Gambetta, 76183 Rouen, France,

²In-Cyclo, 75 Route de Lyons, 76000 Rouen, France

³Laboratoire des matériaux organiques, Faculté de technologie, Université de Bejaia (Algérie).

A novel water insoluble cyclodextrin polymers (PolyCyC®) (copolymer, terpolymer and tetrapolymer) containing different cyclodextrins (α , β , γ - cyclodextrin) crosslinked with citric acid were used for removing of progesterone as an endocrine disruptor from aqueous solutions. The adsorptions experiments were carried out by using recycling column procedure; results show that these polymers exhibited a high adsorptions capacities and cycle number more than activated carbon. The effects of initial pH, initial concentration, adsorbent amount, ionic strength, flow rate and temperature were studied but only with β -cyclodextrin polymer, kinetic study was also investigated using different models for all polymers which show that kinetic extraction can be modeled by pseudo second order model.

The different cyclodextrin polymers were characterized by Fourier transform infrared spectroscopy, X-ray analysis, scanning electronic microscopy and surface area analysis

Méthodologies : in vitro

Systèmes testés : progestatif

Degré de maturité du test : breveté, en cours de développement, recherche de partenaires pour validation

Nouvelles stratégies d'étude de l'effet des perturbateurs endocriniens : de la métabolomique à la biologie des systèmes

Nicolas CABATON - *INRA TOXALIM*

Cabatton N.J., Jourdan F., Audebert M., Tremblay-Franco M., Canlet C., Cravedi J.P., Zalko D.

INRA, UMR 1331, Toxalim, Research Center in Food Toxicology, Toulouse, France

Au cours des vingt dernières années, de nombreuses études ont mis en évidence la capacité de nombreux contaminants chimiques présents dans l'environnement ou les aliments à perturber le système endocrinien. Initialement les perturbateurs endocriniens (PE) ont été mis en cause dans les troubles liés à la reproduction et au développement. Cependant, les travaux récents concernant les molécules œstrogène-mimétiques, ou encore les activateurs d'autres récepteurs nucléaires, démontrent clairement que les PE ont des cibles multiples, comme par exemple le développement cognitif, ou les troubles métaboliques (obésité, syndrome métabolique). Il est donc nécessaire de développer des approches capables de mieux appréhender les dangers que présentent les PE en termes de santé publique. Ces approches doivent s'appuyer sur des techniques à hauts débits afin de tenir compte de la multitude de substances à tester, seules et/ou en mélange, et donc préférentiellement avoir recours à des méthodes *in vitro*. Mais il est également nécessaire de développer des méthodologies globales, permettant de mieux comprendre l'impact attendu du composé testé sur le fonctionne-

ment du système biologique cible : c'est l'objectif des approches initiées par l'INRA dans le domaine de la biologie des systèmes.

Les techniques spectrales (RMN: Résonance Magnétique Nucléaire; HRMS: Spectrométrie de Masse Haute Résolution) permettent de mesurer les variations de concentrations de plusieurs centaines de métabolites dans un tissu ou un biofluide. Cette approche (dite de "métabolomique"), couplée à des analyses statistiques, permet d'explorer l'impact des PE sur le métabolisme global. Nous avons notamment montré que l'exposition périnatale à des composés modèles comme le bisphénol A, γ compris à faible dose, conduisait à une modulation significative du métabolome [1]. La "signature métabolique" d'une exposition à des contaminants chimiques a également pu être démontrée chez l'Homme [2], malgré les difficultés inhérentes à la variabilité génétique. En parallèle, nous avons développé les approches bioinformatiques permettant la mise en réseau des informations expérimentales obtenues *in vivo* et *in vitro*.

Nous faisons l'hypothèse qu'il sera possible, au travers des approches métabolomiques et de l'étude de la modulation du réseau métabolique, de parvenir à identifier les biomarqueurs d'effets biologiques permettant de discerner quels sont les composés pour lesquels le danger est marqué, de ceux pour lesquels les effets attendus sont plus limités. Dans l'étude présentée, nous aborderons les effets des xéno-oestrogènes, en utilisant des lignées hépatocytaires humaines comme système biologique. Non seulement les effets sur le métabolome sont distincts selon la concentration appliquée, mais également ils recourent les résultats des études *in vivo* déjà publiées chez l'animal [3], établissant clairement un lien avec la perturbation du métabolisme énergétique. L'approche métabolomique appliquée aux PE ouvre donc aujourd'hui des perspectives importantes dans le domaine de la toxicologie, et pourrait à moyen terme contribuer à une meilleure compréhension de la modulation des systèmes biologiques par des contaminants chimiques.

¹Cabatón, N.J., et al., *Effects of low doses of bisphenol A on the metabolome of perinatally exposed CD-1 mice*. Environ Health Perspect, 2013. **121**: p. 586-593.

²Bonvallot, N., et al., *Metabolomics tools for describing complex pesticide exposure in pregnant women in Brittany (France)*. PLoS One, 2013. **8**(5): p. e64433.

³Alonso-Magdalena, P., et al., *Bisphenol A exposure during pregnancy disrupts glucose homeostasis in mothers and adult male offspring*. Environ Health Perspect, 2010. **118**: p. 1243-1250.

POSTER #17-C

An *in vitro* evaluation of bisphenols focusing on hepatotoxicity and obesity under environmental levels of exposition.

Ludovic PEYRE - INRA-TOXALIM

Ludovic Peyre, Cécile Héliès-Toussaint, Claudia Costanzo, Georges de Sousa, Patrick Rouimi, Benjamin Carré, Sylvie Barcellini, Marie-Christine Chagnon, Roger Rahmani.

BACKGROUND: For several decades, people have been in contact with bisphenol A (BPA) primarily through their diet. Because BPA was shown to induce adverse effects on human health, especially through the activation of endocrine pathways, it is about to be withdrawn from the European market and replaced by its analogue the bisphenol S (BPS). However, given the scarce toxicological data on this chemical, it is necessary to evaluate the possible effects of BPS on human health.

OBJECTIVES: We aimed to compare the toxicological impacts of BPA and BPS, in parallel with the positive control Diethylstilbestrol (DES), on the hepatic functions, obesity and steatosis processes using both high and low doses in the same range of that found into the environment.

METHODS: We used different *in vitro* models, the differentiated adipocytes 3T3-L1, the HepaRG cells for its well characterized hepatic functions, the HepG2 cells and the HepG2/PXR stable cell line. We analyzed different parameters such as cytotoxicity thanks to the real-time cellular impedance system, but also PXR transactivation, lipids (using the HCS cell imaging) and glucose uptake, lipolysis

process, leptin production as well as the modulations of genes involved in detoxification (CYP3A4, CYP2B6, GSTA4), drug transporters (ABCB1), lipid metabolism (LPL, LHS, FAS, PLIN) and energy balance (SREBP-1, PPAR, ERR, PGC1, aP2).

RESULTS: First, we observed that BPS is less hepatotoxic than BPA, regardless of the cell model. We also demonstrated that, unlike BPA, BPS does not appear to be a PXR agonist and does not modulate the expression of CYP3A4, CYP2B6, ABCB1, FASN and PLIN, but weakly affect GSTA4 protein expression and the Erk1/2 pathway. In a second time, using environmental concentrations, we found that BPA and BPS induce an increase of lipids content in both 3T3-L1 and HepG2 cells. We also noticed a decrease of the lipolysis process after bisphenols treatment in adipocytes. But only BPS was shown to be involved in the increase of glucose uptake and in leptin production. Those effects could be linked to the modulation of PGC1 α and ERR δ genes after BPS exposition, whereas BPA appeared to target the SREBP-1c, PPAR δ , aP2 and ERR α/δ genes.

CONCLUSION: Even if BPS seems to be less toxic at high concentrations, the findings make us think that both BPA and BPS could be involved in obesity and steatosis processes *in vitro*, but through two different endocrine signaling pathways.

Méthodologies : *in vitro*

Systèmes testés : *adipocytaire et hépatique*

Degré de maturité du test : *publié*

POSTER #18-C

Comment peut-on expliquer les courbes dose-réponse non monotoniques en U inversé induites par le bisphénol A ?

Patrick FÉNICHEL - INSERM/Université

Nicolas Chevalier, Rachel Paul-Bellon, Adil Bouskine, Patrick Fénelichel

INSERM U1065 C3M CHU Nice

Contexte : Nous avons précédemment rapporté dans un modèle cellulaire de séminome humain (lignée JKT-1) qu'à doses faibles (nM), le 17b β -estradiol (E2) inhibait la prolifération cellulaire via le récepteur ERbeta, alors que le bisphénol A (BPA) stimulait la prolifération cellulaire via un récepteur membranaire GPER/GPR30.

Méthodes : Etude sur la prolifération cellulaire *in vitro* de doses croissantes d'E2 et BPA, avec ou sans agonistes/antagonistes spécifiques de ERbeta (ZU, ICI) ou de GPER/GPR30 (G1, G15).

Résultats : Les courbes dose-réponse (de 10⁻² à 10⁻¹⁵M) de E2 et du BPA sont non monotoniques, en U inversé, et en miroir l'une de l'autre, avec un effet maximal à 10⁻⁹M inhibiteur pour E2 et promoteur pour BPA. L'utilisation des agonistes et antagonistes spécifiques, et le décalage vers le bas de la courbe dose-réponse du BPA lors de l'association à une dose fixe d'E2 (10⁻⁶M) permet d'expliquer ces courbes comme l'effet résultant du

BPA ou de E2 capables d'interagir à la fois avec les récepteurs ERbeta et GPER/GPR30 mais avec une affinité différente et inverse, maximale à 10⁻⁹M avec GPER/GPR30 pour le BPA et avec ERbeta pour E2 à la même dose.

Discussion : Dans notre modèle n'exprimant pas ERalpha, le BPA est très affin pour GPER/GPR30, stimulant la prolifération à très faibles doses (identiques aux concentrations plasmatiques mesurées en population générale) mais pas pour ERbeta, E2 présentant une affinité inverse, expliquant ainsi les

courbes dose-réponse non monotoniques observées. Ceci est important à prendre en compte pour évaluer l'effet seul ou en cocktail des xéno-estrogènes.

Méthodologies : in vitro

Systèmes testés : oestrogénique

Degré de maturité du test : concept

POSTER #19-C

***In Vitro* Screening of Thyroid Function Disruption: PCCl3, A Promising Tool ?**

Constantin DALLOT - Université de Nice - Sophia Antipolis

C. Dallot, R. Bars, O. Blanck, C. Risso-de Faverney

The evaluation of the endocrine disrupting properties of chemicals has become a necessity for the chemical industry. So far, the focus has mainly been put on sexual hormone disruption. Numerous early *in vitro* screening tests are already available and validated to assess disruption of the Hypothalamic-Pituitary-gonadal axis. This is not the case for the disruption of thyroid function. The aim of this work is to set-up a suitable test for a rapid and cheap detection of thyroid disruption.

Thyroid hormone synthesis occurs in thyroid follicles, a three dimensional structure of thyrocytes, and involves specific proteins. Interference with these proteins or with the hormone synthesis leads in most of the cases to the deregulation of the transcription of the corresponding genes.

A rat thyrocyte cell line, PC-Cl3 (Primary culture-clone3), appears to be able to reproduce *in vitro* the profiles of deregulation of gene expression observed *in vivo* after administration of thyroid toxicants. In the present study, we tested the hypothesis that mRNAs levels of thyroid specific genes are affected in a similar manner *in vivo* and in the studied cell line when exposed to excess iodine, propylthiouracyle (PTU), and Sodium Perchlorate (ClO₄). We exposed male Wistar rats to 0.05% sodium iodide in drinking water (@ 37.5 mg/kg/d); to 0.4 and 2.8 mg/kg/d PTU; and to 0.5 and 5.0 mg/kg/d ClO₄ for 7 consecutive days. This exposure time and doses are documented to be sufficient to observe significant changes in blood TSH and thyroid hormone levels. Thyroids have been collected for histopathological, cell proliferation and qPCR investigations. The aim was to confirm the relevance of the measurement of mRNA of major genes involved in thyroid hormone synthesis as biomarkers of the hormone synthesis perturbation. PC-Cl3 were also exposed to an excess of iodine, PTU and ClO₄ (0 to 10⁻⁵ M for 72 hours) to assess if disruption of the thyroid hormone synthesis observed *in vivo* can also be observed *in vitro* using the expression of genes involved in hormone synthesis as biomarkers. Levels of transcription of Thyroglobulin (Tg), thyroperoxydase (Tpo), slc5a5 (Nis), slc26a4 (Pendrin), and Tshr genes were altered both *in vivo* and *in vitro*, suggesting a possible use as markers of thyroid hormone synthesis perturbation in early screening tests.

Méthodologies : in vitro, in vivo

Systèmes testés : thyroïdien

Degré de maturité du test : concept

Effets du Bisphénol A et de ses substituts sur le développement du testicule foetal

Soria ELADAK - INSERM U 967/CEA/Univ. Paris Diderot (voir page 18)

Evaluation of sub-lethal toxicity of Tributyltin (TBT) and Testosterone (T) in gills, gonads and hepatopancreas of male and female marine mussels

Marielle GUIBBOLINI - Université de Nice-Sophia Antipolis

Guibbolini-Sabatier, M. & Risso-de-Faverney, C.

Université de Nice-Sophia Antipolis, ECOMERS E.A 4228, Faculté des Sciences – Parc Valrose, France

Tributyltin (TBT) is an effective biocide that enters the aquatic environment mainly from its employment in antifouling paints on vessels, but also via discharge of wastewaters and dumping sewage sludge. Despite the fact that molluscs are known to be very sensitive to low concentrations of TBT, limited information concerning the mechanism of action of organotin compounds is available. The aim of the present work was to determine the impact of TBT, (at environmentally relevant concentrations) and Testosterone on biomarker responses on marine mussels (*Mytilus galloprovincialis*). The organo-somatic index, the lipid peroxidation level, the glutathion-S-transferase, catalase and superoxide-dismutase activities were assessed after 7 days exposure to increasing concentrations of the masculinizing substances. Results taken together will be discussed taking into account both the organs (gills, digestive gland and gonads) and sex of the bivalve molluscs. They will provide further information concerning the putative toxic effects of TBT.

Méthodologies : in vivo

Systèmes testés : androgénique

Degré de maturité du test : en cours de développement

Comparative effects of Nonylphenol and 17 β -œstradiol in gills, gonads and hepatopancreas of male and female marine mussels.

Christine RISSO-DE-FAVERNEY - Université de Nice-Sophia Antipolis

**Risso-de-Faverney, C. @ Guibbolini-Sabatier, M*

*Université de Nice-Sophia Antipolis, ECOMERS E.A 4228, Faculté des Sciences – Parc Valrose, France (*Christine.RISSO@unice.fr)*

The endocrine disruptors are present in seawater, mainly in ports, urban and industrial effluents. Nonylphenol (NP) and 17 β -œstradiol (E2) are commonly found in surface waters nearby municipal wastewater treatment plants. In marine biomonitoring, biomarkers are used as tools to assess the aquatic environment health. The marine mussels, *Mytilus galloprovincialis*, are routinely chosen as "sentinel" organisms in Mediterranean coastal monitoring programs. The purpose of this study was to investigate the toxic effects of NP and E2, feminizing substances, on biomarker responses in mussels. The organo-somatic index, lipid peroxidation, glutathion-S-transferase, catalase and superoxide-dismutase activities were measured after exposure to increasing concentrations of organic pollu-

tants. Three organs were considered regarding to their physiological functions: gills (filtration), hepato-pancreas (digestion) and gonads (reproduction). Results, obtained with biomarkers of defence and damage, were discussed in function of the sex of animals.

Méthodologies : in vivo

Systèmes testés : oestrogénique,

Degré de maturité du test : en cours de développement

POSTER #23-D

La dent, organe cible des perturbateurs endocriniens et biomarqueur précoce d'exposition à ces agents

Sylvie BABAJKO - INSERM

Katia Jedeon, Sophia Loiodice, Sophia Houari, Clémence Marciano, Marie-Chantal Canivenc-Lavier, Ariane Berdal, **Sylvie Babajko**

Depuis une vingtaine d'années, les perturbateurs endocriniens (PE) sont suspectés d'induire des troubles de la reproduction et des effets néfastes sur la santé. Dans le même temps, se développe une pathologie de l'émail récemment décrite (le MIH) qui touche 15 à 18% des enfants âgés de 6 à 9 ans. La fenêtre de sensibilité aux PE et notamment au bisphenol A (BPA) étant semblable à la fenêtre de minéralisation des dents affectées par cette pathologie, nous avons recherché les impacts que pouvait générer ce PE seul ou en association avec deux autres PE, la genistéine (G) et la vinclozoline (V).

Les rats ont été exposés à faible dose à ces agents de la conception à 30 et 100 jours après la naissance. A 30 jours, 6/8 rats mâles exposés à 5 µg/kg/j BPA présentent des défauts de l'émail diagnostiqués par des taches blanches opaques. De façon intéressante, à 100 jours après la naissance, aucun rat ne présente des défauts de l'émail suggérant l'existence d'une fenêtre temporelle de sensibilité au BPA au cours de l'amélogénèse (synthèse de l'émail). La comparaison systématique des caractéristiques structurales et biochimiques des incisives de rats exposés au BPA et des dents humaines atteintes de MIH montrent des similarités flagrantes, nous amenant à proposer le BPA comme agent causal du MIH.

Comme les individus sont exposés à de nombreux PE simultanément, nous avons ici testés la combinaison du BPA à deux autres PE à faible dose (DJT/10), G pro-œstrogénique et/ou à V anti-androgénique. Alors que 6 rats sur 8 sont affectés par le BPA seul, seulement 2 rats sur 8 sont touchés par BPA combiné à G, V ou G/V et aucun rat n'est affecté lorsqu'il est exposé simultanément à de fortes doses G/V (DJT*10). Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que ces 3 PE modulent différemment l'expression de deux gènes clés de l'amélogénèse. Des expériences en cours montrent l'impact différentiel de ces 3 agents sur les améloblastes en relation avec l'effet des androgènes et des œstrogènes. En ce sens, il est intéressant de remarquer que seules 2/8 femelles exposées au BPA montrent des hypominéralisations amélaire alors que 6/8 mâles sont affectés.

En conclusion, les PE sont capables d'affecter l'amélogénèse conduisant à une hypominéralisation amélaire facilement diagnostiquée par des taches opaques sur l'émail dentaire. Nous proposons d'utiliser ces dents comme marqueurs précoces d'exposition aux PE aussi bien en expérimentation qu'en clinique.

Méthodologies : in vitro, in vivo

Systèmes testés : oestrogénique, androgénique

Degré de maturité du test : concept, publié

Inter-laboratory validation of the *Xenopus* Embryonic Thyroid Signalling Assay

David DU PASQUIER - *WatchFrog*

Anthony Sebillot¹, Sophie Mothre¹, Ikumi Hirakawa⁴, Nelly Teyssandier¹, Allyson Cameron³, Taisen Iguchi⁴, Daniel Buchholz³, Barbara Demeneix², Gregory Lemkine¹ and **David Du Pasquier**¹

¹Watchfrog, Evry, France

²MNHN, Paris, France

³University of Cincinnati, USA

⁴National Institute for Basic Biology, Okazaki, Japan

With support from France and financial participation from Watchfrog and the French ministry responsible for ecology, a validation plan has been developed for the *Xenopus* Embryonic Thyroid signalling Assay (XETA); laboratories from 3 OECD member participate. The objectives are : 1) to establish the relevance of the assay by assessing its sensitivity to detect disruption by compounds active at different points within the thyroid system 2) to assess the reproducibility of the assay across laboratories.

XETA is an assay based on the genetic detection of a chemical's impact on transgenic *Xenopus* embryonic stages. This transgenic line can detect the activity of Thyroid Hormone (TH) agonists that activate TH receptors, as well as antagonists of thyroid axis that work through various mechanisms. The XETA provides a rapid response.

Méthodologies : in vivo

Systèmes testés : thyroïdien

Degré de maturité du test : publié, commercialisé

Détection rapide en fluorescence des (anti-)androgènes avec une lignée medaka spiggin-gfp

Anthony SÉBILLOT – *WatchFrog (voir page 21)*

Neonatal exposure to the mycotoxin zearalenone induces programming of adult male infertility via epigenetic mechanisms.

Mohamed BENAHMED - *Inserm*

Benahmed M, Lakdhari N, Siddeek B, Inoubli L, Paul-Bellon R, Meunier L, Guarmit B, Vega A, Mauduit C.

In utero and/or neonatal exposure to estrogen-like molecules have been linked to pathologies such as male infertility. Exposure to Zearalenone (ZEA), a mycotoxin with estrogenic activities, present in cereals (breakfast cereals, bread, and noodles...) occurs at different periods of life including vulnerable periods. Questions remain unresolved: could ZEA lead to a neonatal programming of testicular pathologies via its agonist effect on ER-alpha or antagonist effect on ER-beta? What are the (epigenetic) mechanisms of action of ZEA in the reproductive system alterations?

To try to highlight these issues, we developed an experimental model corresponding to male rats exposed from post-natal day (PND) 1 to 5 to different doses of ZEA. At adult age (PND 90), these rats presented significant diminished testicular weight at the higher dose (30 mg/kg) and significant decreased epididymis and prostate weights (5, 10, 30 mg/kg). These effects were similar to that observed with a neonatal exposition to a standard estrogen (estradiol benzoate). Neonatal exposure to ZEA induced at adult age an alteration of the spermatogenesis characterized by a long-term germ cell apoptosis (from 0.1 mg/kg). At the molecular level, this long-term alteration of germ cell death is probably linked to alteration of epigenetic mechanisms i.e. a decrease in DNA methyl transferase (DNMT) levels that drive a diminished level of genome methylation (assessed through line-1 retrotransposons). The decreased DNMT levels were associated with an increase of the Heat Shock transcription factor HSF1 with a decrease in HSP70 levels. The over-expression of the retrotransposon Line-1 and HSF1 both converge to induce apoptosis in the adult testes. In conclusion, we developed an experimental model to elucidate the (estrogenic) effects of the mycotoxin ZEA in the germ cell death through epigenetic mechanisms.

Méthodologies : bioanalyses et mesures physico-chimiques, in vivo
Systèmes testés : reproduction male
Degré de maturité du test : concept

POSTER #27-D

Thyroid disruption and brain development: the xenopus embryo model

Jean-Baptiste FINI - UMR 7221 CNRS (voir page 22)

POSTER #28-D

Testing mixtures of endocrine disruptors *in vivo* at human-relevant exposure levels

Steffen SCHNEIDER – BASF

¹Fussell, Karma C., ¹Steffen Schneider, ¹Stephanie Melching-Kollmuss, ¹Sibylle Groeters, ¹Volker Strauss, ²Benazir Siddeek, ²Mohamed Benahmed, ¹Markus Frericks, ¹Bennard van Ravenzwaay

¹Experimental Toxicology and Ecology, BASF SE, 67056 Ludwigshafen, Germany

²Inserm U895, équipe 5, Bâtiment Universitaire Archimède, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M), Centre Hospitalier l'Archet 2, 06204 Nice CEDEX 3, France

Endocrine disruption has become an important topic of public concern. Despite an increasing amount of attention, little is understood about whether environmentally relevant doses of endocrine disrupting chemicals (EDCs) affect homeostasis. Furthermore, knowledge gaps often exist in the studies used to assess EDCs. To address these concerns we performed pre-/post-natal reproductive toxicity studies to measure the developmental toxicity of low single- and mixture-doses of three anti-androgens. Doses were selected to mimic a low observed adverse effect level (LOAEL), the no observed adverse effect level (NOAEL) for endocrine effects, and the acceptable daily intake (ADI) for each compound, which were then additionally combined together into three mixtures of the LOAELs, NOAELs, and ADIs. The endocrine consequences of a larger effect dose of flutamide were also evaluated as a positive control.

While female offspring developed normally, the male offspring demonstrated anti-androgenic effects at the single and mixed LOAEL doses only. A significant decrease in anogenital distance on PND 1 and an increase in the number of nipples/areolas on PND 12 were noted in these animals. The latter effect was partially transient, as all had regressed by PND 20, except at the positive control dose. The

male offspring in these dose groups which were reared to young adulthood displayed additional anti-androgen effects including delayed sexual maturation and reduced sex organ sizes and weights; offspring from the positive control dose also had an increased incidence of developmental sexual defects. No adverse effects were noted at either the NOAEL or ADI dose levels. Assessment of molecular endpoints including the transcriptome, miRNome and metabolome (with hormone levels) is ongoing.

Méthodologies : in vivo

Systèmes testés : androgénique

Parcours des intervenants et des membres des comités

Selim AÏT-AÏSSA, INERIS

Docteur de l'Université de Technologie de Compiègne, Selim AIT-AISSA est ingénieur recherche à l'INERIS, au sein de l'unité Ecotoxicologie *in vitro* et *in vivo*. Depuis 2000, il s'intéresse au développement et à l'utilisation d'outils biologiques (modèles cellulaires, biomarqueurs) pour la compréhension des modes d'action et des effets des contaminants aquatiques. Son activité actuelle concerne le développement de bioessais cellulaires *in vitro* (modèles cellulaires humains et ichthyens) et leur intégration dans une démarche bioanalytique pour la détection et l'identification de composés perturbateurs endocriniens et dioxin-like dans les milieux aquatiques, dans le cadre de différents projets de recherche collaboratifs nationaux et internationaux. Son expertise l'amène également à s'impliquer dans des actions d'appui aux pouvoirs publics sur la validation et l'opérationnalité des bioessais *in vitro* pour la surveillance des milieux (e.g. convention INERIS-ONEMA, réseau SQUAREF, réseau européen NORMAN). Il est membre de la commission scientifique Ecotoxicologie et Ecodynamique des Contaminants (ECODYN) de l'INSU.

Patrick BALAGUER, DR2 INSERM, IRCM INSERM U896 Montpellier

Patrick Balaguer, 52 ans, est Directeur de Recherche à l'INSERM. Il fait partie de l'équipe Signalisation Hormonale et Cancer (Dr Vincent Cavallès) de l'Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier (IRCM-INSERM U896, Dr André Pélegrin). Dans cette équipe, Patrick Balaguer anime un groupe de 6 personnes qui s'intéressent aux perturbateurs endocriniens et à leur mode de liaison et d'activation des récepteurs nucléaires.

Patrick Balaguer est biologiste cellulaire et moléculaire. Dès son post-doctorat (1991-92) dans le laboratoire de Pierre Chambon à Strasbourg (INSERM U184), il s'est intéressé aux pathologies en lien avec les récepteurs nucléaires. Recruté ensuite comme chargé de recherche dans l'équipe de Jean-Claude Nicolas (INSERM U58), il a travaillé dans le domaine de la perturbation endocrinienne.

Patrick Balaguer a une grande expérience de la mesure d'activité de perturbation endocrine de composés chimiques ou d'échantillons environnementaux, humains et alimentaires. Il dirige une plateforme de criblage équipée en lignées cellulaires bioluminescentes spécifiques de récepteurs nucléaires, stations robotisées d'ensemencement et traitement de cellules, détecteurs de luminescence, fluorescence et radioactivité.

Enfin, Patrick Balaguer est aussi membre des comités scientifiques du Programme National de Recherche sur les Perturbateurs Endocriniens (PNRPE) et du Programme National de recherche Environnement Santé-travail de l'ANSES (PNREST).

Gilbert BARBIER, SÉNAT

Gilbert Barbier est ancien chirurgien, praticien hospitalier, sénateur du Jura depuis 2001, membre du groupe R.D.S.E.. Il est vice-président de la commission des affaires sociales, secrétaire de la mission de contrôle de la Sécurité Sociale, membre de divers organismes entre autres, du Conseil d'orientation de l'Agence de Biomédecine, du Conseil National du SIDA. Il est membre de l'Office Parlementaire des choix scientifiques et technologiques. Au titre de cet office il présenté un rapport

en juillet 2011 intitulé : *perturbateurs endocriniens : le temps de la précaution*. Il a été rapporteur de la mission d'information sur les toxicomanies en travail commun avec l'Assemblée Nationale.

Il a été député du Jura de 1978-1981, 1986-1988, 1993- 1997. Il a exercé les fonctions de maire de Dole de 1983 à 2008.

Robert BAROUKI, Inserm

Professeur de Biochimie, Praticien Hospitalier - Directeur de l'unité Inserm 1124 - Université Paris Descartes - Chef de Service de Biochimie Métabolomique et Protéomique, Hôpital Necker Enfants Malades Paris, France

Robert Barouki est biochimiste et biologiste moléculaire. Il a consacré ses travaux récents à l'étude des mécanismes de toxicité des xénobiotiques, notamment certains polluants de l'environnement comme la dioxine et les pesticides. Il a analysé les effets biologiques et toxiques de l'activation du récepteur de la dioxine, AhR. Dans un premier temps ses intérêts portaient sur l'étude des stress cellulaires comme le stress oxydant et le stress du réticulum endoplasmique. Par la suite, et grâce à des technologies haut débit et à différents modèles biologiques, il s'est focalisé sur l'étude de la perturbation des fonctions endogènes du récepteur et des effets spécifiques de différents ligands. Il a ainsi montré la plasticité fonctionnelle de ce récepteur dont les effets dépendent de la nature du ligand. Parmi les fonctions étudiées, une des plus notables a été la modulation de la transition épithélio-mésenchymateuse qui est impliquée dans le développement, la diffusion cancéreuse et la fibrose. Il étudie aussi les interactions entre composés toxiques et tissu adipeux chez l'homme et dans des systèmes expérimentaux. D'autres projets concernent la recherche de biomarqueurs pertinents en clinique, notamment en ce qui concerne la toxicité et les maladies métaboliques.

Corinne BENOLIEL, Scientis

Spécialisée dans les domaines de la formulation, réglementation, microbiologie et marketing scientifique des produits cosmétiques, détergents, désinfectants (biocides et dispositifs médicaux).

Actuellement Directrice Scientifique de SCIENTIS, laboratoire prestataire de services : expertise scientifique des produits précités, R&D notamment axée sur l'adhésion des microorganismes / problématique des biofilms, organisme de formation, agréé par le Ministère de la Recherche.

Expériences professionnelles passées : Groupe ALES (Cosmétiques) / Laboratoire Prodene-Klint (Hygiène)/ Directrice Scientifique de l'IRM (Institut de Recherche Microbiologique).

Docteur en Pharmacie, Experte microbiologiste, Evaluatrice de la sécurité sanitaire des produits cosmétiques et des ingrédients de parfumerie, titulaire d'un DESS de Marketing pharmaceutique.

Membre expert des commissions AFNOR Antiseptiques et désinfectants chimiques/Cosmétiques.

Formatrice auprès de professionnels et universitaires.

François BRION, INERIS

François BRION est ingénieur recherche au sein de l'unité Ecotoxicologie *in vitro* et *in vivo* de la Direction des Risques Chroniques de l'INERIS. Depuis son doctorat (1999-2001), ses travaux sont consacrés à la compréhension des mécanismes d'actions et des effets biologiques des perturbateurs endocriniens chez les poissons à l'aide d'une espèce modèle, le poisson zèbre (*Danio rerio*). Il s'intéresse à l'expression et la perturbation de gènes cibles hormono-régulés qui s'expriment dans le système nerveux central, le foie, les gonades et directement impliqués dans le développement et la reproduction. Membre du conseil scientifique du Programme National de Recherche sur les Perturbateurs Endocriniens depuis 2008, François BRION conduit ses travaux dans le cadre de collaborations et de programmes de recherche nationaux et européens. Ses travaux ont permis de développer des méthodes et des modèles biologiques originaux basés sur les mécanismes d'actions des perturbateurs endocriniens qui trouvent leurs applications dans un contexte réglementaire pour la détection de substances endocrines actives.

Bruno CORMAN, *Profilomic*

Bruno Corman est actuellement PDG de la société Profilomic fondée en 2010. A partir d'un savoir-faire académique original du CEA, Profilomic a développé des services en analyses métabolomiques et lipidomiques pour la recherche de biomarqueurs de diagnostic, pronostic et suivi thérapeutique. Ces approches qui combinent la chimie analytique, la spectrométrie de masse, la bioinformatique et les statistiques multiparamétriques ont été adaptées à la recherche de polluants émergents dans les eaux potables et environnementales.

De formation scientifique en physiologie et biophysique, après une thèse de doctorat es Sciences et un séjour de recherche au Canada, Bruno Corman a mené des recherches et participé à des enseignements supérieurs dans le domaine du vieillissement rénal et cardiovasculaire, avant de créer une société de service en Gestion du Capital Santé en 2001.

Olivier DELMAS, *INERIS*

Olivier DELMAS est chargé de mission recherche partenariale à la direction scientifique de l'INERIS. Sa mission est de créer des liens entre les programmes scientifiques de l'institut et les besoins des acteurs socioéconomiques, en matière de maîtrise des risques.

A partir de sa formation d'Ingénieur en génie biologique de l'Université de Technologie de Compiègne, Olivier Delmas conduit des projets en biotechnologies. Il a réalisé une thèse de doctorat sur le lait maternel à l'Université de Lille, poursuivie en contrat post-doctoral à l'Institut Pasteur de Lille. Il a développé des produits cicatrisants dérivés du sang, au LFB (Laboratoire Français des Biotechnologies) puis dans une PME innovante de dispositifs médicaux. Il s'est ensuite orienté vers le conseil en innovation, à Oséo, où il a accompagné la création de plusieurs entreprises de biotechnologies. Il a rejoint l'INERIS en 2007.

Béatrice DE REYNAL, *Club PAI-Food Ingredients*

- Nutritionniste (pH D Nutrition) • Créatrice de NutriMarketing® et Nutrinno® • Secrétaire générale du CLUB PAI-Food Ingredients® • Administrateur de la Fondation Louis Bonduelle • Expert pour le groupe de travail NUTRIPREVIUS (AFSSA / ACTIA). • Expert pour différentes associations professionnelles et pour des groupes agroalimentaires, de cosmétique et de compléments alimentaires.
- Rédactrice et Conseil pour différents supports média professionnels, télévisuels, radio et presse grand public. • Rédactrice en chef de la Lettre des PAI, de CONSULTATION NUTRITION • Membre du Comité scientifique de la revue professionnelle « Nutritions et endocrinologie » •

Auteur d'ouvrages grand public sur la Nutrition (Weight Watcher, Encyclopédie & Connaissance, Ed. Josette Lyon), MANGO et Vuibert les Vérités qui dé-mangent », De l'étiquette à l'assiette, etc.

- Auteur d'ouvrages professionnels : INNOVER AVEC LES INGREDIENTS (Editions RIA) , TRENDS BOOK, Guide d'audit Nutritionnel (ACTIA) Juin. Ouvrage collectif « les polyphénols » aux éditions Lavoisier. Additifs et auxiliaires technologiques – Tec & Doc LAVOISIER - Coordinatrice.

- Chargée d'enseignement à Université Paris VI, à l'INA-PG, Agro Toulouse, Paris XIII Bobigny. Blog : <http://miammiamnutrition.blog.lemonde.fr/>

James DEVILLERS, *CTIS*

James Devillers (Dr, HDR) est le fondateur (1989) et le directeur du CTIS (centre de traitement de l'information scientifique).

Son activité concerne les QSAR (quantitative structure-activity relationship), la modélisation (éco) toxicologique, l'analyse de données et l'écotoxicologie de l'abeille.

Il est membre du conseil scientifique du Programme Pesticides et du PNRPE (Programme National de Recherche sur les Perturbateurs Endocriniens).

Il est le créateur en 1993 et rédacteur en Chef du journal international "SAR and QSAR in Environmental Research" (Taylor & Francis) et membre des comités éditoriaux de "Ecological Modelling" (Elsevier), "Xenobiotica" (Informa Healthcare), "Current Bioactive Compounds" (Bentham Science) et

"Toxics" (MDPI Ag). Il a publié plus de 200 articles et chapitres ainsi que 15 livres dont : Devillers J. (2009). *Endocrine Disruption Modeling*. CRC Press, Boca Raton, p. 404 et Devillers J. (2013). *Juvenile Hormones and Juvenoids: Modeling Biological Effects and Environmental Fate*, CRC Press, Boca Raton, p. 387.

Soria ELADAK, INSERM/CEA/Univ. Paris Diderot

Soria Eladak effectue, depuis novembre 2012, sa thèse de doctorat au Laboratoire de Développement des Gonades du CEA de Fontenay-aux-Roses. Normalienne de l'Ecole Normale Supérieure de Cachan, elle valide en 2009 une licence de Biochimie, Biologie Moléculaire et Cellulaire de l'Ecole Normale Supérieure de Cachan et de l'Université d'Orsay, et en 2011 un master de Physiologie en Conditions Extrêmes de l'université Lyon 1. Lauréate de l'agrégation de Biochimie Génie Biologique de la session 2012, elle obtient son diplôme de l'Ecole Normale Supérieure de Cachan en 2013. Actuellement inscrite en deuxième année de doctorat à l'école doctorale de Biochimie, Biothérapies, Biologie Moléculaire et Infectiologie (B3MI) de l'université Paris Diderot, son travail porte sur les effets du bisphénol A et de ses substituts sur le développement du testicule fœtal. Par ailleurs, elle effectue en parallèle de son travail de recherche une mission d'enseignement en tant que monitrice et formatrice à la préparation au CAPES des Sciences de la Vie et de la Terre de l'université Paris Diderot.

Sylvain ENGUEHARD, NOVAKITS

Sylvain ENGUEHARD a d'abord complété son cursus universitaire en Biologie par des formations en développement produit, marketing et gestion au sein d'universités de l'Ouest. Il a débuté sa carrière dans de grands groupes de renom du diagnostic médical et équipementiers de laboratoire à des postes de responsable clientèle et d'agence.

Sa carrière s'est ensuite orientée dans le domaine du diagnostic agro-alimentaire pour la recherche de pathogènes et contaminants. Il a ainsi acquis une vision large de l'activité lui permettant d'identifier les besoins émergents du secteur. La collaboration avec plusieurs start-up en forte croissance spécialisées dans le développement de tests pour l'analyse de contaminants environnementaux et alimentaire l'a conduit à créer l'entreprise NOVAKITS en 2008.

Ce réseau à l'interface des besoins émergents et des innovations produits permet de répondre rapidement aux nouvelles préoccupations sanitaires et besoins d'outils de maîtrise des contaminations. De la mélamine en 2008 à la crise Cheval en 2013, c'est auprès de NOVAKITS que les laboratoires ont trouvé les tests disponibles et simples à mettre en place.

Aujourd'hui, les évolutions réglementaires dans les allergènes alimentaires, la présence de toxines dans le milieu et les aliments, les contaminations par des résidus chimiques et les effets des perturbateurs endocriniens sont les axes prioritaires de développement de NOVAKITS aux côtés du monde de la recherche, des autorités sanitaires et des industriels.

Jean-Baptiste FINI, CNRS

Après une école d'Ingénieur en développement de produits en Biologie, Jean-Baptiste Fini a rejoint l'équipe du Pr Barbara Demeneix (Paris 5ème) afin d'effectuer sa thèse sur le développement de têtards « sentinelles » d'une pollution environnementale. Grâce à la fois aux travaux de recherche fondamentales issus du laboratoire mais également aux techniques de pointe et la collaboration avec l'entreprise Watchfrog, plusieurs lignées « sentinelles » fonctionnelles ont pu être créées (détection de métaux lourds, de perturbateurs des hormones thyroïdiennes ou de stéroïdes). Le principe de ces lignées est basé sur la production de fluorescence au sein de tissus cibles de très jeunes têtards de xénope (grenouille) lors de la présence du type de molécules recherché. Mr Fini a ensuite travaillé, dans le cadre d'une action Marie Curie, au sein de l'entreprise suédoise Axcentua basée au Karolinska Institutet où il a effectué un post doctorat sur la recherche de nouvelles molécules thérapeutiques contre le cancer du pancréas. De retour en France, il a obtenu un poste de chercheur au CNRS dans son laboratoire de thèse où il travaille sur la détection et l'étude des conséquences à court et long termes d'une exposition embryonnaire à des perturbateurs endocriniens seuls ou en mixtures.

Olivier FOULON, *CitoxLab*

Olivier Foulon est pharmacien toxicologue, titulaire d'un doctorat de troisième cycle en toxicologie. Il a commencé en tant que toxicologue de la reproduction chez Bayer Crop-Science pendant une dizaine d'années, puis a été responsable de la toxicologie au CIT pendant 5 ans. Il a ensuite rejoint le groupe Pierre Fabre en tant que Directeur de la toxicologie expérimentale. Il a finalement rejoint le groupe CiToxLAB depuis 2012 où il exerce la fonction de Directeur des Opérations et de Directeur Général Délégué. Son expérience a été centrée sur la toxicologie de la reproduction et le management des équipes dans l'industrie chimique, pharmaceutique et cosmétique. Il est ERT (European Registered Toxicologist) et a participé à des expertises en particulier en collaboration avec l'INERIS dans le cadre des fiches Demeter.

Anne GOURMELON, *OCDE/OECD*

Anne Gourmelon est ingénieur agronome (ISAB) et est diplômée d'un Master en sciences et toxicologie environnementales de l'Université d'Agriculture de Wageningen aux Pays-Bas. Elle a travaillé à l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture à Rome de 2000 à 2002, au sein du groupe de gestion des pesticides et auprès du Secrétariat de la Convention de Rotterdam/PIC. Depuis 2002, elle travaille à l'OCDE pour le Programme des Lignes directrices pour les tests sur les produits chimiques. Elle a aussi assuré le secrétariat pour le Programme d'évaluation des dangers des substances produits à fort tonnage/HPV de 2006 à 2012. Depuis 2013, elle est administrateur principal du Programme des Lignes directrices qui comprend également l'activité OCDE du groupe consultatif sur les tests et l'évaluation des perturbateurs endocriniens.

Amélie GUILLON, *Suez Environnement*

Position actuelle : Amélie Guillon est ingénieur de recherche au CIRSEE, le principal centre de recherche du groupe Suez Environnement. Ses recherches se focalisent sur l'analyse de micropolluants organiques dans les eaux potables, les eaux usées et les boues. Elle est notamment en charge des analyses par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution (LC-Orbitrap).

Formation : Diplômée en 2008 de l'Ecole Nationale Supérieure des Ingénieurs en Arts Chimiques et Technologiques de Toulouse, spécialité analyses physico-chimiques, elle obtient également, cette année-là, un master de l'Université de Toulouse sur les thématiques de l'Hydrologie, Hydrochimie, Sols, et Environnement. En 2011, suite à des recherches en chimie atmosphérique (laboratoire EPOC), elle obtient un doctorat de chimie analytique et environnement à l'Université de Bordeaux.

Expérience professionnelle : Dans le cadre de son doctorat, elle a acquis son expertise scientifique en développant une méthodologie analytique innovante, basée sur la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS et GC/C/IRMS), pour le traçage de source des HAP-particulaires dans l'atmosphère. Elle s'investit ensuite dans un projet de recherche portant sur le couplage d'outils innovants biologiques et chimiques pour le suivi de traitements avancés des eaux et des boues (Echibioteb). Elle participe à ce travail en réalisant des analyses de composés pharmaceutiques notamment (médicaments et antibiotiques) dans des capteurs passifs et les eaux (post-doctorat à l'Université de Bordeaux) et des analyses de screening haute résolution par LC-Q-TOF. Depuis fin 2012, elle occupe son poste d'ingénieur de recherche au laboratoire d'expertise du CIR-SEE.

Marion GUST, *MEDDE*

Marion Gust est vétérinaire. Elle a intégré le corps des Ingénieurs du Génie Rural, des Eaux et Forêts. Elle est titulaire d'une thèse en écotoxicologie aquatique, réalisée au Cemagref, s'intéressant notamment à l'évaluation des effets des polluants reprotoxiques sur les organismes non cible. Suite à cela elle a travaillé au ministère de l'Environnement Canadien sur les impacts des effluents urbains sur le fleuve Saint Laurent. Elle a ensuite rejoint Irstea sur les thématiques de l'évaluation des effets des polluants émergents dans le milieu aquatique, notamment les perturbateurs endocriniens, mais éga-

lement les médicaments et les rejets urbains. Elle est titulaire d'une Habilitation à Diriger les Recherches.

Elle est actuellement en charge des questions Environnement-Santé au Ministère de l'Ecologie, dans la Mission Risques-Environnement-Santé au Service de la Recherche au sein du Commissariat Général du Développement Durable. Elle est notamment la responsable du Programme National de Recherche sur les Perturbateurs Endocriniens (PNRPE).

Philippe HUBERT, INERIS

Position actuelle - Depuis 2003, Directeur des Risques Chroniques à l'Institut de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS), une des 4 directions opérationnelles de cet EPIC de 600 personnes. Au sein de l'institut, il anime cette direction centrée sur les nuisances sur la santé et l'environnement des activités industrielles et des substances chimiques. Plus de 200 personnes pratiquent des recherches en laboratoire (Chimie, déchets, sciences du vivant), des études sur les sites et installations, des investigations sur les substances chimiques dans les milieux, mais aussi analyses et dossiers, déployant ainsi une expertise ancrée sur la recherche et la connaissance du terrain.

Expérience professionnelle - De 2002-2003, Conseiller auprès du Directeur de l'Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire, il participe à l'organisation de l'institut (1500 personnes), créé en février 2002. De 2001 à mai 2002 ; Conseiller Technique auprès du ministre de l'Environnement et de l'Aménagement du territoire, chargé des questions relatives à l'énergie au sein du cabinet. De 1991 à 2001 ; chef du Service d'Evaluation et de Gestion des Risques de l'Institut de Protection et de Sûreté Nucléaire, au sein du département chargé de la protection de la santé de l'homme. Il développe des sujets comme l'épidémiologie, l'évaluation de l'impact autour des installations et installe l'observatoire de la perception des risques et de la sécurité (qui cumule aujourd'hui plus de 20 ans d'observations en continu). De 1993 à 1996 il coordonne de plus un projet européen de grande échelle (9 Pays, 25 équipes) sur la réhabilitation des territoires contaminés autour de Tchernobyl, combinant faisabilité technique et opportunité économique. De 1979 à 1990 ; il fait partie de la petite équipe de chercheurs rassemblant l'INSERM U 240 (évaluation des risques et des actions de prévention) et une association loi de 1901 (CEPN), qui ont développé les méthodes de l'évaluation et de la gestion du risque. Il introduit notamment l'évaluation comparative intégrée des risques des filières énergétiques en France, utilisée dès le débat parlementaire de 1981.

Formation - 1978 ; Ingénieur statisticien de l'ENSAE (Ecole Nationale Supérieure des Statistiques et de l'Administration Economique) 1976 Ingénieur de l'Ecole Polytechnique (promotion 1973) 1975 DEUG de philosophie, Université de Paris I

Appartenances - Directeur du GIS « Francopa », plate forme française du réseau européen pour le développement des méthodes alternatives en expérimentation animale. Représentant le GIS dans le réseau européen. Représentant Français du réseau Europe-US « Evidence Based Toxicology Collaboration ». Comité de Prévention et de Précaution auprès du ministre chargé de l'Environnement. Commission des Produits Chimiques et des Biocides auprès du ministre chargé de l'environnement. Comité de suivi du Plan National Santé Environnement (PNSE II). Table Ronde « radiofréquences, santé et Environnement ».

Markus KAMBER, Xenometrix AG

Markus Kamber obtained his Ph.D. in Cell Biology and Immunology from the University of Basel, Switzerland. During his postdoctoral studies at Roche and later at the Tufts-New England Medical Center in Boston he worked in the field of human monocyte differentiation using lymphokines and vitamin D derivatives and later characterized immune responses in human malaria.

Back in Basel with Roche he worked as lab head and project leader in the field of Dermatology studying the effects of retinoids and vitamin D derivatives. He later moved on to study host defense mechanisms in bacterial infections and was project leader for the identification of novel targets for antibiotics. He was a member of the founding staff of the Roche spin-off Basilea Pharmaceutica where he continued his projects on novel antibiotics target identification.

In 2004 he became head of Study Coordination at the study center of the Swiss Group for Applied Cancer Research SAKK where he gained in-depth insight into the design and management of clinical studies.

Since 2005 he is Head of the Cytotoxicity Section and Deputy Head of the Ames MPF Section at Xenometrix AG in Allschwil, Switzerland. Since 2011 he is also Head of the Endocrine Disruptor project and in this function responsible for the development and quality management of the XenoScreen YES/YAS assay kits.

Mariem LAAMARI, LIENSS- Univ.de La Rochelle

Mariem LAAMARI est une doctorante en 1^{ère} année au sein du laboratoire LIENSS – UMR 7266 à l'Université de La Rochelle. Elle travaille sur l'une analyse des effets de toxines marines telles que l'acide okadaïque et de micropolluants comme le bisphénol A et le glyphosate sur deux modèles cellulaires : les cellules du cancer du sein (ER+ et ER-) et les cellules graisseuses humaines à différents stades de maturation. Son travail est basé principalement sur la réalisation d'une approche comparative entre le comportement de ces cellules suite à leur traitement par chaque substance seule (bisphénol, glyphosate, acide okadaïque) ou par un cocktail de ces substances. Elle utilise l'électrophorèse bidimensionnelle pour comparer l'expression des protéines extraites des cellules après leur traitement. Elle travaille aussi sur la caractérisation du lien entre l'obésité et le cancer du sein.

Elle a également travaillé sur la caractérisation de l'interaction entre les adipokines issues de cellules graisseuses humaines et les cellules du cancer du sein dans le cadre de son stage de mastère II en Biotechnologie et Management en Agro-industrie effectué à l'Université de La Rochelle. Elle est aussi Ingénieur en Biologie industrielle diplômée de l'Institut National des Sciences appliquées et de Technologie (INSAT) de Tunis.

Danielle LANDO, Adebiotech

Danielle Lando est titulaire d'un doctorat d'état obtenu à l'Institut Pasteur pour la recherche en virologie. Elle a effectué sa carrière dans l'industrie pharmaceutique où elle a exercé des fonctions de chercheur en pharmacologie cellulaire et moléculaire avant de prendre la responsabilité des biotechnologies au sein de Roussel Claf devenu Aventis.

Elle a œuvré pour des rapprochements entre son entreprise et le secteur académique en soutenant des projets collaboratifs. Elle a été membre nommé au Comité National du CNRS de 1995 à 2000.

Depuis 2001, elle exerce des activités scientifiques bénévoles au sein d'Adebiotech et est actuellement vice-présidente d'Adebiotech.

Grégory LEMKINE, WatchFrog

Dr. Gregory LEMKINE, co-fondateur et PDG de WatchFrog

Docteur en Physiologie du Muséum National d'Histoire Naturelle, Gregory Lemkine maîtrise parfaitement les éléments scientifiques et technico-commerciaux du développement biotechnologique. Il a complété sa formation par un cycle de formation pratique de l'école de management HEC. Avant la création de la société en 2005, Gregory Lemkine était en charge de la valorisation au Muséum National d'Histoire Naturelle à Paris. Il a publié plusieurs articles dans des revues scientifiques internationales.

Patrick LEVY, UIC

De 2000 à 2004, Patrick Lévy a été directeur corporate product-stewardship (sécurité des produits) et médecin conseil du groupe RHODIA, après avoir été de 1992 à 2000 médecin coordinateur du groupe SOLVAY, chargé de la santé au travail et de l'hygiène industrielle pour la France. Il assure les fonctions de médecin conseil de l'UIC et de président de groupe Santé Environnement du MEDEF. Patrick LEVY intervient dans plusieurs instances nationales et européennes (UIC, MEDEF, CEFIC, Business Europe, Commission européenne, Agence de Bilbao...).

Il est notamment titulaire d'un doctorat d'Etat en Médecine (internat de spécialité en santé publique) et du DEA national de toxicologie fondamentale et expérimentale.

Michel LOUBRY, *PlasticsEurope*

Michel Loubry est Directeur Régional Europe de l'Ouest (France, Belgique, Luxembourg et Pays-Bas) de Plastics Europe, syndicat européen des producteurs de matières plastiques.

Ingénieur chimiste, il a suivi un parcours classique en production, chez le lessivier Unilever puis le chimiste DSM, avant de s'orienter vers des postes de management général dans cinq pays de l'Union Européenne : France (1983-1989) – Pays-Bas (1989-1993) – Espagne (1993-1995) et Italie (1995-1998) pour revenir en France en 1998. Depuis 2005, il est Directeur Régional Europe de l'Ouest chez PlasticsEurope.

Depuis 2014, il est également Directeur du programme Protection des consommateurs.

Sébastien LOUIS-ROSE, *AFNOR*

Francelyne MARANO, *Université Paris Diderot / FRANCOPA*

Francelyne MARANO est Professeur de biologie cellulaire et de toxicologie à l'université de Paris Diderot, Présidente du Groupe de veille sur les impacts sanitaires des nanotechnologies et Membre du Haut Conseil de Santé publique.

Ses travaux de recherche portent sur la toxicité respiratoire des polluants atmosphériques, plus spécifiquement, sur l'étude de leurs mécanismes d'action au niveau cellulaire et moléculaire.

Principales responsabilités

- Responsable du Master Recherche et professionnel "Toxicologie, Environnement, Santé". - Codirectrice de l'École doctorale médicament, chimie, toxicologie, environnement des universités Paris Descartes et Paris Diderot. - Membre du conseil scientifique du programme PRIMEQUAL (MEDD) 1998-2006. - Présidente du conseil scientifique de l'Agence française de sécurité sanitaire environnementale (AFFSE) 2002-2006. - Membre de la commission d'orientation du Plan national santé environnement - 2004. - Vice-présidente du conseil scientifique de l'Institut national industriel et des risques (INERIS). - Membre du conseil scientifique des appels d'offre Santé environnement travail et contaminants, écosystèmes, santé de l'Agence nationale pour la recherche.

Représentante française dans l'action européenne COST 633 pour une meilleure connaissance de la pollution particulaire atmosphérique au niveau européen et de ses impacts. - Membre du collège État G3, Grenelle de l'Environnement et du COMOP 20 pour l'élaboration du rapport pour le PNSE2. - Présidente du comité de suivi sur les risques émergents du PNSE2. - Membre du Haut conseil de Santé publique et présidente du groupe de veille sur l'impact sanitaire des nanotechnologies. - Expert auprès du SCCP et du SCHENIR (DG SANCO) pour les impacts sanitaires des nanoparticules.

Guillaume MARTIN, *Kallistem*

Guillaume Martin est chef de projets au sein de Kallistem. Cette société de biotechnologies est spécialisée dans l'étude de la toxicité testiculaire *in vitro*. Fondée en 2012 au sein de l'ENS Lyon, Kallistem valorise la technologie et l'expertise développée par Philippe Durand et Marie-Hélène Perrard, deux scientifiques reconnus dans le domaine de la spermatogénèse *in vitro*.

Titulaire d'un doctorat en Biologie de la Reproduction de l'Université Claude Bernard de Lyon depuis 2006, Guillaume Martin a ainsi débuté son parcours professionnel en étudiant la mort cellulaire programmée (apoptose) des spermatozoïdes. C'est ensuite au cours de ses expériences successives de responsable de laboratoire de production de semence bovine pour l'industrie de l'élevage, puis d'ingénieur hospitalier au sein d'un laboratoire d'AMP-CECOS qu'il s'intéresse au problème de la réduction de la fertilité masculine. Il rejoint dans ce contexte Kallistem, peu de temps après la création de la société.

Guillaume Martin utilise aujourd'hui ses compétences à la gestion de projets et au développement de nouvelles technologies visant à déterminer l'impact de différents composés sur la spermatogénèse.

Jean-Roch MEUNIER, *Medicen Paris Region*

Jean-Roch Meunier est ingénieur agronome (AgroParisTech), titulaire d'une thèse en biologie moléculaire et d'un Executive Mastère Spécialisé (HEC). Chercheur post-doctoral au sein du Weizmann Institute of Sciences (Israël), il rejoint L'Oréal en 1995 où il occupe les fonctions de chercheur en biologie cellulaire et moléculaire et participe à de nombreux projets de développement d'innovation.

Il assure, entre 2006 et 2012, la responsabilité d'un département de recherche pluridisciplinaire de biologie translationnelle préclinique. Tout au long de son parcours professionnel, Jean-Roch Meunier a pu développer des partenariats de nature scientifique et industrielle, manager des équipes pluridisciplinaires et des projets internationaux.

Jean PACHOT, *Oroxcell*

Jean est ingénieur avec 19 ans d'expériences dans l'industrie et 8 ans d'expérience entrepreneuriale en Biotechnologie. Il a débuté sa carrière à l'Institut Français du pétrole où il était en charge de la miniaturisation des tests de caractérisation des catalyseurs d'hydrotraitement. Il a ensuite rejoint la CERNEP Synthélabo pour mettre au point une formulation pour la nutrition entérale par sonde gastrique.

Il a rejoint le groupe sanofi (Roussel Uclaf à l'époque) où il a occupé plusieurs postes scientifiques et managériales dans le Laboratoire de Préformulation Galénique, Nouvelles technologies, Laboratoire des Systèmes transdermiques. Dans les débuts des années 1990 il a fondé au sein du Groupe Sanofi (Hoechst Roussel) le laboratoire d'investigation du transport des médicaments à travers les barrières physiologiques. Il a été l'un des pionniers à industrialiser et robotiser l'évaluation du transport des médicaments à travers l'intestin humain reconstruit. Il a ensuite coordonné le groupe d'Absorption, Distribution, Métabolisme et Excrétion (ADME) au sein de sanofi. Durant sa carrière dans l'industrie pharmaceutique, Jean a participé à la recherche et développement du Ketek[®], Rulid[®], Mifegyne[®], Odrik[®] HMR 1297, HMR1404, HMR3270, HMR3432 et a contribué à plus de 18 programmes R&D jusqu'en 2004 date à laquelle il a créé avec Christophe Dini la Société Oroxcell, une jeune Entreprise Innovante au modèle économique original :

- Activités de Recherche et Développement : Nouvelles entités chimiques pour traiter la douleur et l'anxiété / dépression.
- Activités de sous-traitance : spécialisé dans les méthodes alternatives à l'utilisation d'animaux de laboratoire pour évaluer le profil ADME et toxicologique de molécules et de formulations issues de l'industrie des Sciences du Vivant : Pharmacie, cosmétique, bien de consommation et chimie.

Jean est auteur de plusieurs articles et co-auteurs de 3 brevets dont 2 déposés par Oroxcell sur des séries chimiques pour le traitement de la douleur. Une des molécule est en développement préclinique réglementaire.

Marc PALLARDY, *Université Paris Sud, SPTC*

Professeur, INSERM UMR 996, Faculté de Pharmacie - Université Paris Sud

Diplômé en Pharmacie en 1982, Marc Pallardy fait une thèse en toxicologie en 1997 à l'Université Paris-Sud 11. Il est professeur assistant en 1987/88 du Docteur Jack Dean.

En 1997, il est professeur et responsable du département de toxicologie à l'Université Paris-Sud.

Actuellement, il est vice Doyen et Directeur de la recherche à la faculté de pharmacie de Paris-Sud, Directeur du Master "Toxicologie humaine, évaluation des risques et vigilance" et du Doctorat "Innovation thérapeutique: du fondamental à l'application" et responsable de l'UMR-S 996 "Cytokines, chimiokines et immunopathologie" de l'INSERM. Il est notamment membre de plusieurs groupes au sein de l'ANSM.

Denis REQUIER, Polepharma

Vice-Président De la Technopole Chimie-Biologie-Santé (CBS)

Vice-Président de Pôle pharma

Carrière

Jusqu'en 1991 : différents postes de responsabilités chez Rhône Poulenc Sante puis Rhône Poulenc Rorer puis cadre Dirigeant chez Aventis.

- 1991 : Création de la Sarl DRsante et reprise de deux Sociétés :
- 1991 à 1994 : Président de la SA Réactifs RAL
- 1996 à 1999 : Gérant de la sarl Orchidis laboratoire
- 1994-1996 : Président d'Apotex Europe filiale d'Apotex canada
- 1999 à 2005 : Vice-Président du Développement Scientifique chez Ethypharm SA .
- 2008-2010 : président Directeur Général d'Oralance Pharma

Etudes et diplômes

Ingénieur Chimiste - Pharmacien - Docteur en chimie thérapeutique - Docteur en Pharmacie - Diplômé de l'institut du Contrôle de Gestion

Steffen SCHNEIDER, BASF

Anthony SÉBILLOT, WatchFrog

Ingénieur CNAM de Paris, Anthony Sébillot a commencé sa carrière en 2004 en étudiant les interactions neurones-cellules gliales chez la souris ainsi que les activités des désiodases chez *Xenopus laevis* au sein de l'unité CNRS UMR7221 / MNHN.

En 2005, il a rejoint la société WatchFrog où il a d'abord été technicien de recherche. Il a contribué au développement d'outil de mesure des perturbateurs endocriniens et à la réalisation d'essais pour la mesure globale et continue de la qualité de l'eau sur site industriel.

A partir de 2012, il est chargé de projet R&D à WatchFrog afin de développer des tests *in vivo* pour la détection et la quantification des perturbateurs endocriniens. Il est responsable du plateau technique pour la production de lignées transgéniques par transgénèse germinale chez le poisson médaka *Oryzias latipes* et le modèle amphibien *Xenopus laevis*.

Ses travaux ont abouti d'une part à la création de nouveaux modèles portant des marqueurs génétiques qui révèlent par fluorescence les micropolluants et d'autre part à la validation de tests *in vivo* pour l'évaluation du potentiel de perturbation androgénique dans les eaux.

Raphaël SERREAU, Hôpital Necker Paris

Raphaël Serreau est médecin de Santé Publique et pharmacologue à Paris, il est Praticien Hospitalier à l'AP-HP depuis 2007. Il a été nommé Chef de service de médecine préventive depuis décembre 2013 à la ville d'Orléans.

Il a fait ses études de Médecine à la Faculté François Rabelais à Tours de 1988 à 1994 puis l'Internat des Hôpitaux de Paris de 1995 à 2000. Il a effectué son service militaire par un volontariat à l'outre-mer, dans les établissements médico-sociaux de l'île de la Réunion.

Il a été Assistant Hospitalo-Universitaire à la Faculté de Médecine Xavier Bichat de 2001 à 2005, dans une Unité de Pharmacologie Clinique et Pharmacogénétique, à l'hôpital Robert Debré à Paris.

Il est praticien hospitalier de l'Assistance Publique – Hôpitaux de Paris depuis 2007. Parallèlement, il a effectué une formation de chercheur en Pharmacologie clinique et évaluation des thérapeutiques par un DEA à Paris XI en 2002 et une Thèse d'Université en Pharmacocinétique à Paris Descartes en 2007 sur la thématique « mère-enfant », passage des xénobiotiques via le placenta et le lait maternel.

Il enseigne depuis plus de 10 ans, sur médicaments et allaitement maternel, dans plusieurs Diplômes Universitaires à Paris et en France (Grenoble, Brest, Toulouse et Lille). Il est le Président fondateur du

réseau Médic-AI en 2006, réseau de chercheurs (Dr Virginie Rigourd, Melle Brune de Villepin) qui est situé à l'hôpital Necker-Enfants Malades.

Il a créé et coordonné le comité scientifique de la Coordination Française de l'Allaitement Maternel (COFAM) de mars 2010 au 31 décembre 2013.

Il coordonne actuellement deux projets de recherche sur le plan national (PHRC AOR10127 Antalait et CRC12014 Contalait).

Le Dr Raphaël Serreau va présenter au congrès ADEBIOTECH, la mise en place d'une étude de toxicologie clinique nationale, l'étude CONTALAIT sur le dosage des différents contaminants liés à l'environnement dans le lait maternel chez 180 femmes allaitantes, étude en collaboration avec l'ANSES, Madame Marion Hulin et Madame Véronique Sirot.

Bruno TISSERAND, Veolia

Bruno Tisserand rejoint la Compagnie générale des eaux en septembre 1985, en tant que directeur adjoint du centre de Paris. En décembre 1992, il est chargé de la mise en œuvre de l'assistance technique pour les contrats d'exploitation et les activités d'assainissement au GIE Anjou Recherche (centre de R&D de la Compagnie générale des eaux).

En juillet 1996, il prend la tête du département de traitement des eaux usées au sein de la direction technique. En juillet 2002, il est nommé au département des affaires municipales, dont il deviendra directeur adjoint en 2005.

De 2009 à août 2012, il travaille comme conseiller technique et directeur délégué à l'assainissement au sein de la direction Technique et Synergies de VEOLIA EAU.

Il participe aux travaux de la Fédération Professionnelle des Entreprises de l'Eau (commission technique et scientifique). Il est également membre du conseil d'administration de l'ASTEE. Il est président du comité technique ISO 224, chargé de la normalisation des services d'alimentation en eau et d'assainissement. Depuis juin 2011, il est président de la commission Assainissement (n° 2) de l'EUREAU (Fédération européenne des associations nationales de service d'eau et d'assainissement).

Depuis septembre 2012, il a rejoint Veolia Environnement Recherche et Innovation, en tant que directeur du programme de recherche Eaux usées.

Adama TRAORE, LVMH

Adama TRAORE est pharmacien de formation (Diplôme Docteur en Pharmacie 1995) et est titulaire d'un PhD en Toxicologie (2001 - Options Sciences Pharmaceutiques). L'objet de sa thèse a porté sur l'étude des mécanismes d'action de l'acide okadaïque (toxine marine) responsable d'intoxications diarrhéiques. Ce travail, lui a valu 7 publications scientifiques et un certain nombre de communications et posters. Il est Responsable Sécurité MPs depuis Novembre 2011 chez LVMH et est membre d'UROTOX depuis 2005.

Il a commencé sa carrière professionnelle chez Chanel (2001), puis a rejoint le groupe L'Oréal (2002-2009) en tant que Safety assessor. Au cours de ces années, Adama TRAORE a été en charge de l'évaluation de la sécurité de Matières Premières entrant dans une diversité de produits cosmétiques (Capillaire, Maquillage, Coloration des cheveux).

La mise en place du programme REACH et défi de sécuriser dans un temps record les MPs de l'industrie de la Chimie ont poussé Adama à s'orienter vers la réglementation de 2009-2011 du côté des fournisseurs (Symrise, Seppic).

Son retour dans l'industrie Cosmétique (fin 2011) coïncide avec le nouveau règlement cosmétique et l'interdiction des tests animaux sur les MPs cosmétiques.

Ce nouveau challenge met l'industrie devant un dilemme important à relever "comment innover tout en étant privé d'un certain nombre de Tests réglementaires validés et non encore remplacés?"

Parmi les end-points toxicologiques, la perturbation endocrinienne fait figure constituée une de nos préoccupations majeures à gérer au quotidien. A cet effet, nous mettons en place dans nos entre-

prises des stratégies d'évaluations accompagnées de raisonnements scientifiques le temps qu'une position commune de l'industrie soit validée par tous.

Michel URTIZBEREA, BASF

Le Dr Michel Urtizbera, toxicologue, expert en évaluation des risques dirige le service Homologation de BASF Agro depuis 2006. Animateur du groupe Perturbateurs Endocriniens (PE) au sein de l'UIPP Union des Industries de la Protection des Plantes et membre du groupe PE de l'UIC, animé par le Dr Levy, M Urtizbera contribue au partage de la vision des industriels sur la thématique des PEs.

Jordane WODLY DGPR/MEDDE

Jordane WODLI a intégré le corps des Ingénieurs de l'Industrie et des Mines à la suite d'une formation d'ingénieur à l'Ecole Nationale Supérieure des Mines de Douai. À la suite de cette formation, il est en charge depuis octobre 2012 du suivi du règlement européen REACH, des réglementations sur les Polluants Organiques Persistants ainsi que de la thématique des perturbateurs endocriniens au Ministère de l'Ecologie, dans le Bureau des Substances et Préparations Chimiques au sein de la Direction Générale de la Prévention des Risques.

Concernant les perturbateurs endocriniens, à la suite de la publication de la Stratégie Nationale sur les Perturbateurs Endocriniens, il suit la mise en place des différents volets de cette stratégie au niveau national ainsi que les discussions au niveau européen concernant les problématiques liées à ces substances perturbatrices endocriniennes.

Aurelio ZERIAL, Institut Gustave Roussy

Aurelio Zerial a obtenu son doctorat en biochimie à Trieste (Italie) et son Ph.D en biologie à l'Université de Wesleyan (Connecticut, Etats-Unis).

Aurelio Zerial a démarré sa carrière professionnelle comme chercheur à l'Institut Battelle (Genève, Suisse) puis à Rhône Poulenc en France où, dans les années 80s, il a dirigé des recherches en immunologie, chimiothérapie antivirale et anticancéreuse.

Il est auteur de nombreuses publications dont certaines sont consacrées au mécanisme d'action de molécules entrant en clinique.

En 1990, peu après la constitution de Rhône Poulenc-Rorer (devenu Aventis), Aurelio Zerial a rejoint les Affaires Réglementaires du Groupe et entrepris une nouvelle carrière, jusqu'au poste de directeur, dans l'enregistrement international de molécules issues de la chimie et des biotechnologies.

Après avoir quitté Aventis en 2001, il a fondé et dirigé BioProgetti, société de conseil dans la R&D et les affaires réglementaires.

Actuellement Aurelio Zerial est aussi responsable de la formation continue à l'Institut de Formation Supérieure Biomédicale de l'Institut G. Roussy.

**Domaine de compétences: développement pharmaceutique, préclinique et clinique - stratégies réglementaires – biotechnologies.*

Sponsor



The Chemical Company

Pour une agriculture compétitive et responsable

Employant plus de 112 000 collaborateurs dans le monde dont près de 3 000 en France, le Groupe BASF, leader mondial de l'industrie chimique, propose dans le respect des exigences du développement durable et avec une attention permanente à la protection de la santé et de l'environnement, des solutions intelligentes pour l'industrie et l'agriculture tout en préservant les ressources disponibles.

Les défis du XXIème siècle sont multiples pour répondre aux attentes de nos concitoyens et aux enjeux de la mondialisation : accroissement de la population mondiale et donc de la demande alimentaire et énergétique, changement climatique et respect de l'environnement, poursuite de l'urbanisation, croissance des besoins des pays émergents, raréfaction des ressources,... Dans ce contexte, les agriculteurs ont, eux aussi, besoin de solutions innovantes leur permettant de garantir une production d'aliments de qualité accessible à tous, de développer le niveau de compétitivité de leur entreprise et ce, tout en respectant l'environnement.

Pour répondre à l'objectif de « produire plus et mieux », BASF, acteur majeur de l'industrie de la protection des plantes, développe des solutions pour contribuer à une agriculture durable, moderne et performante et répondant aux systèmes de production conventionnels ou biologiques. Ainsi, au-delà de l'offre produits, nous proposons des services favorisant le raisonnement tel que les outils d'aide à la décision, ou des expertises, comme l'aménagement de la biodiversité, la gestion de l'eau et l'utilisation sécurisée et responsable de nos produits. Par ailleurs, il nous paraît essentiel de mesurer les progrès accomplis. C'est pourquoi nous avons initié en 2008, la démarche « Eco-acteurs » qui s'appuie sur des indicateurs permettant d'évaluer et de mesurer l'atteinte de nos objectifs sur les trois piliers, économique, social et environnemental, du développement durable. Au-delà des débats stériles opposant produits chimiques conventionnels et méthodes biologiques, nous sommes convaincus qu'il existe une troisième voie, entre le « tout intensif » et le « tout écologique » : la voie de l'équilibre, conciliant compétitivité de l'agriculture grâce à l'accès à l'innovation et respect de l'environnement. C'est cette vision de l'agriculture de demain que nous défendons.

Malheureusement, nous nous heurtons de plus en plus fréquemment à l'émergence de l'idée selon laquelle toute innovation technologique et scientifique serait davantage un risque qu'une opportunité. Cet état de méfiance permanente face à toute innovation entraîne un excès de « précautionnisme » réglementaire, voire parfois une véritable surréglementation, comme en témoigne la stratégie nationale sur les perturbateurs endocriniens, qui brouille l'horizon et la visibilité des industriels de tous les secteurs, compromettant de fait leur capacité d'investissement et de développement en France.

Nous sommes ainsi intimement convaincus que le rapport bénéfices / risques de toute innovation ou solution doit être évalué par une approche rationnelle fondée sur des données scientifiques fiables sans une surexpression du principe de précaution. L'enjeu est de trouver le bon équilibre : une approche suffisamment protectrice de la population n'entravant pas pour autant le développement de l'innovation gage d'emplois durables demandés par nos concitoyens.