

L'évaluation des impacts sur la reproduction en écotoxicologie(aquatique) : les perturbateurs endocriniens un défi pour l'évaluation du risque écologique

Jeanne GARRIC



Laboratoire d'écotoxicologie

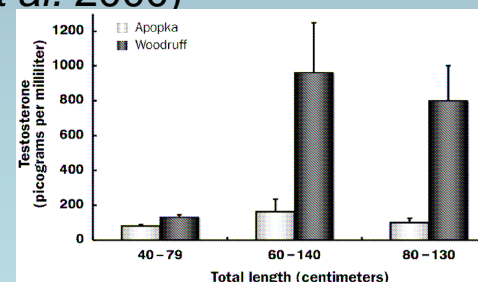
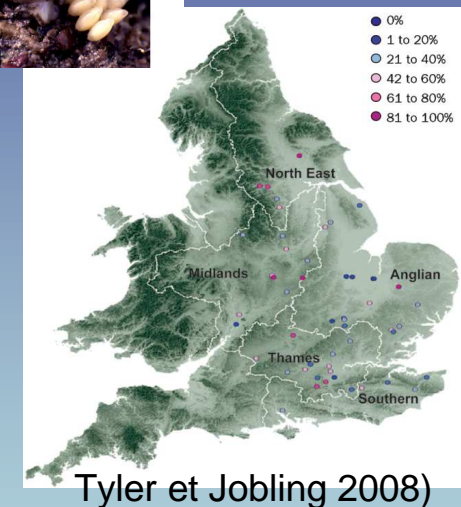
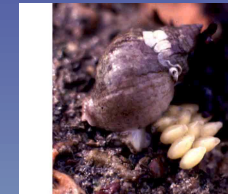
LYON

**Perturbateurs Endocriniens : changement de paradigme dans la Biodiversité ?
MNHN, Paris 29 avril 2011**

Constat

□ Des relations avérées substances chimiques – perturbation endocrinienne et effet sur la reproduction

- L'imposex chez les gastéropodes prosobranches (Blaber 1970) et TBT (Smith 1981)
- La féminisation des poissons : intersex gardons (1978) et effluents urbains (Purdom *et al.* 1994)...
- jusqu'à la population (Kidd *et al.* 2007)
- Le déclin des alligators (Lac Apopka) (Woodward *et al.* 1993) et pesticides (Guillette *et al.* 2000)



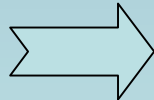
[Testosterone] exposé < témoin
Milnes & Guillette 2008)

- La féminisation et le castration chimique chez le xénope (Hayes *et al.* 2010) et atrazine

Prévenir et réduire le risque écotoxique

□ A priori (REACH)

- Détecter des mécanismes d'action « PE »
- Identifier les impacts physiologiques associés
- Établir les relations doses réponses
- Définir des conditions d'exposition « sûres »



□ A posteriori (DCE)

- Diagnostiquer les perturbations des mécanismes reproducteurs
- Identifier les causes et les voies d'exposition

Predicted Non Effect Concentration

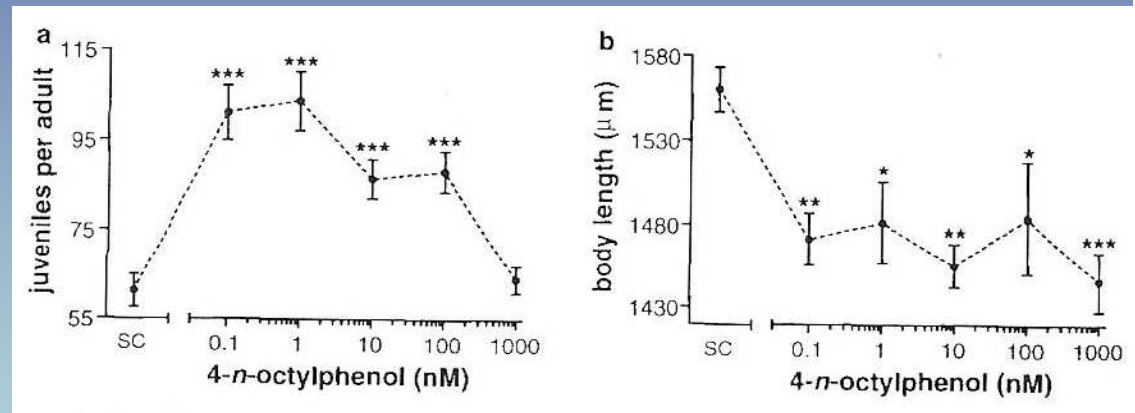
Des défis

PE : mimétique ou antagoniste d'hormones, facteurs d'altération de la synthèse, de la dégradation ou du transport (inhibition ou activation de récepteurs), altération de la transcription ou de l'expression de gènes (mécanismes épigénétiques)

□ Des processus écotoxiques complexes à appréhender

- Perturbations endocriniennes apparaissent à de faibles doses
 - EE2 : Tox survie (mg/L)/ Tox repro (ng/L): 1 000 000 (poisson)

- Des relations effet-dose
- non monotones
(Effet du 4n octylphenol sur *C. elegans*, Hood et al. 2000)



- Un effet mélange avéré : des mécanismes d'action similaires chez les vertébrés (mimétique estrogène, androgène ...) additivité, synergie

❑ Fenêtre d'exposition cruciale : réversibilité / irréversibilité, effet retardé



Stade exposé E2 1-100ng/L	Vtg	Sexe ratio	Histologie gonades	Caractères sexuels secondaires	Nombre oeufs
Embryon-larve (0-21 jpf)	+	Augmentation proportion de femelles à 100ngE2/L	NS	NS	Augmentation à 100 ng E2/L
Juvénile (21-42 jpf)	+	NS	Intersex à 42 jpf	NS	Diminution
Adulte (> 200 jpf)	++	NS	NS	Augmentation fréquence papille urogénitale (mâles)	Diminution

Approches «standards» existantes aujourd'hui ne permettent pas de capturer ces mécanismes

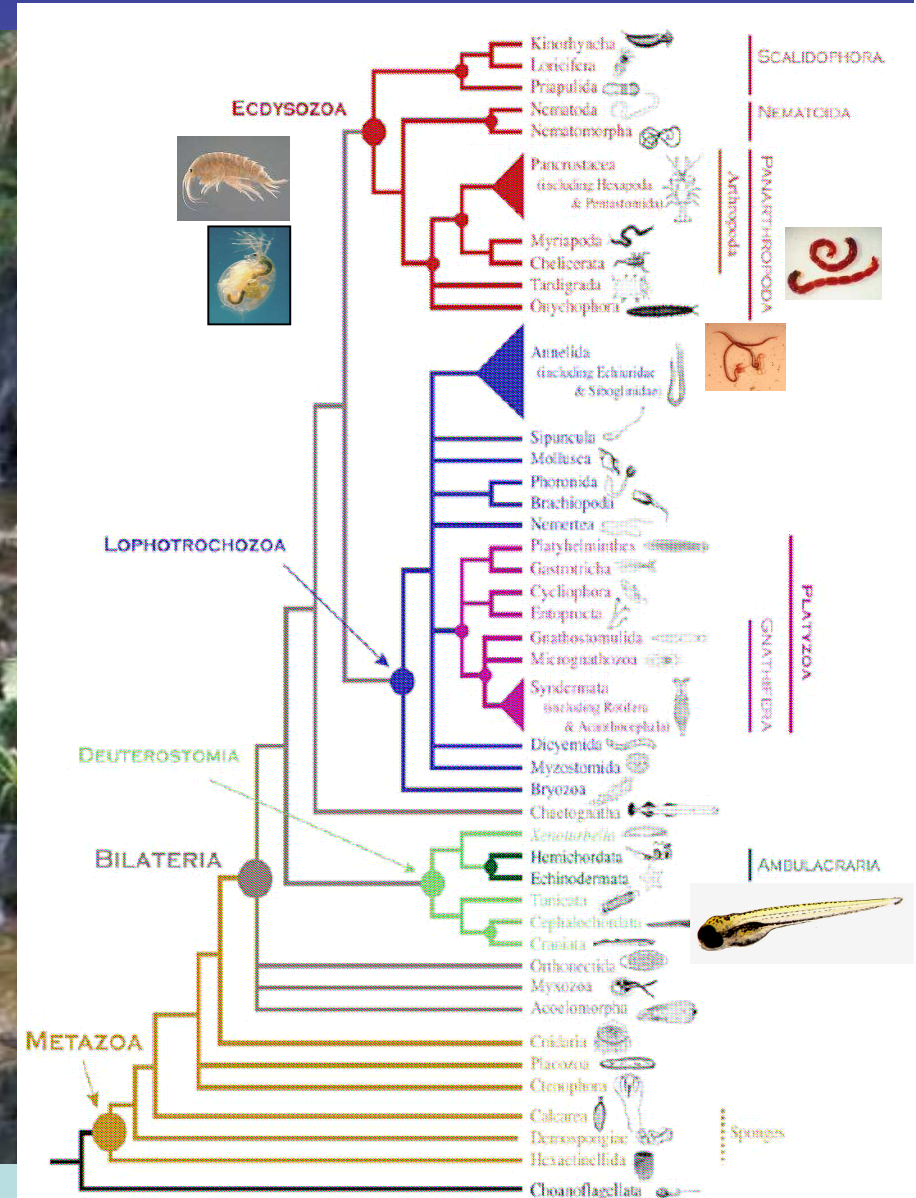
Des défis : la biodiversité



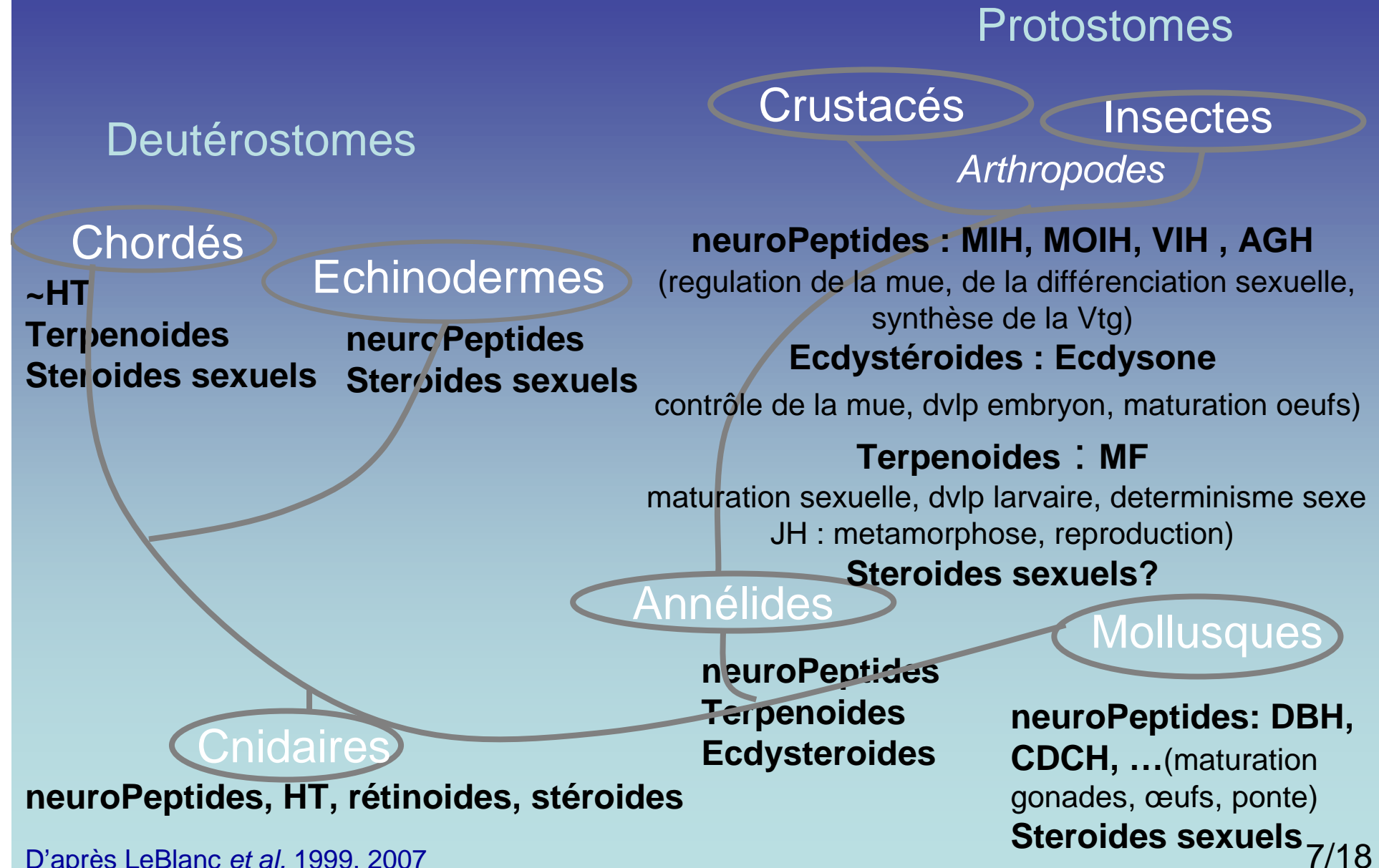
Une diversité de
génotypes
phénotypes



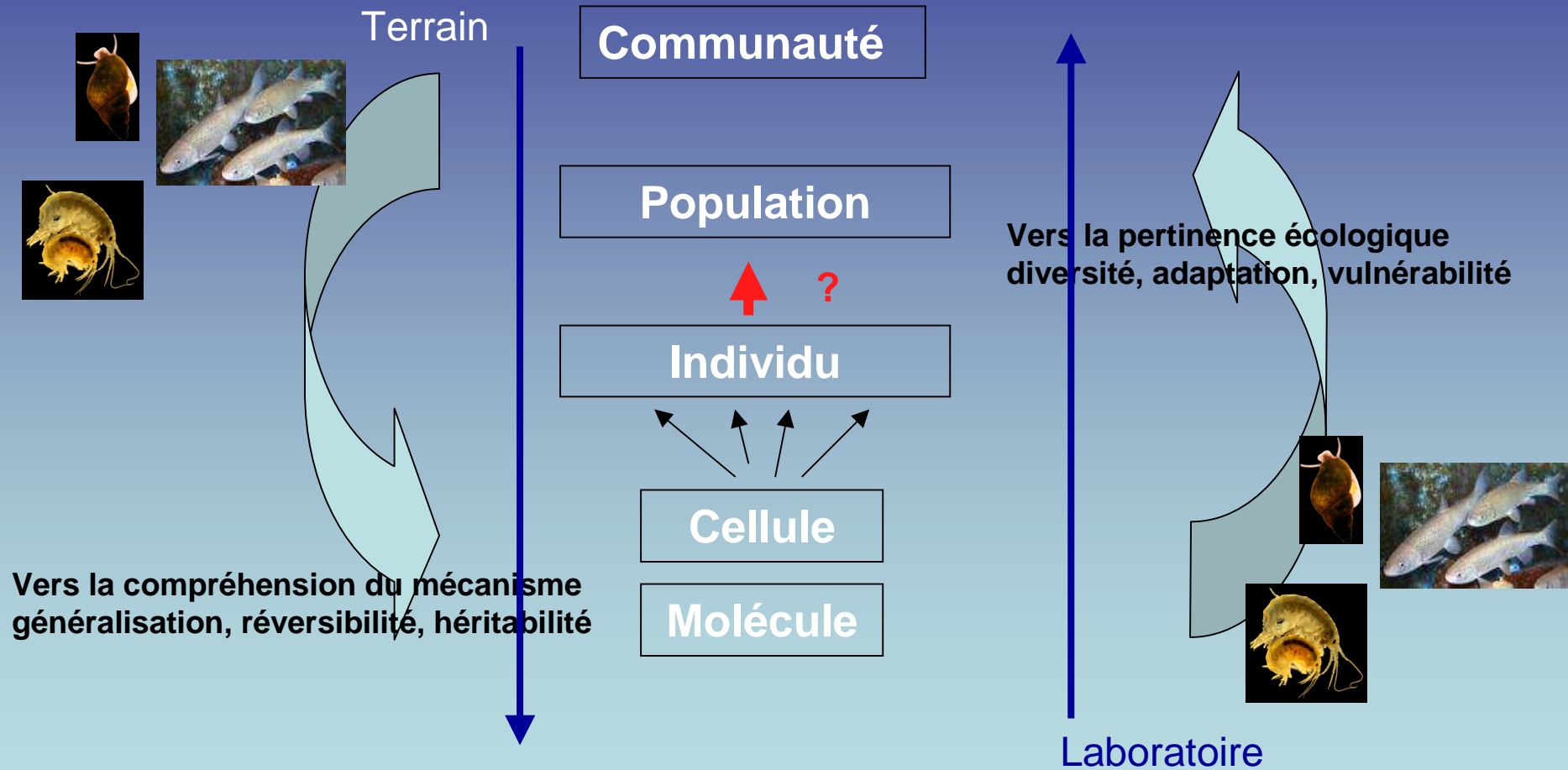
Différences d'aptitudes
écologique
toxicologique
capacité adaptative



Diversité des systèmes de régulation hormonale



Des défis : le changement d'échelle



Des concepts et outils pour l'évaluation du risque

- Élaborer des outils adaptés à la spécificité des PE
 - Détecter des mécanismes d'action spécifiques
 - différencier PE et reprotoxicité
 - Évaluer un grand nombre de substances : tests cellulaires de screening, QSAR
 - Prioriser les substances
 - Caractériser les conséquences physiologiques : cycle de vie, multi génération, batterie d'espèces
 - Etablir des facteurs de sécurité pertinents

- Considérer les mélanges pour l'établissement des NQE
 - Développer des modèles d'interaction basés sur des mécanismes d'action

- Adapter les outils de surveillance du milieu
 - Développer des biomarqueurs et biotests pertinents pour alerter sur des modes d'action PE in situ

(OCDE 2002, EDTA : Essais et évaluation des perturbateurs endocriniens

Note: Document prepared by the Secretariat of the Test Guidelines Programme based on the agreement reached at the 6th Meeting of the EDTA Task Force

OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals

<p>Level 1 Sorting & prioritization based upon existing information</p>	<p>- physical & chemical properties, e.g., MW, reactivity, volatility, biodegradability, - human & environmental exposure, e.g., production volume, release, use patterns - hazard, e.g., available toxicological data</p>
<p>Level 2 <i>In vitro</i> assays providing mechanistic data</p>	<p>- ER, AR, TR receptor binding affinity - Transcriptional activation - Aromatase and steroidogenesis <i>in vitro</i> - Aryl hydrocarbon receptor recognition/binding - QSARs</p> <p>- High Through Put Prescreens - Thyroid function - Fish hepatocyte VTG assay - Others (as appropriate)</p>
<p>Level 3 <i>In vivo</i> assays providing data about single endocrine Mechanisms and effects</p>	<p>- Uterotrophic assay (estrogenic related) - Hershberger assay (androgenic related) - Non-receptor mediated hormone function - Others (e.g. thyroid)</p> <p>- Fish VTG (vitellogenin) assay (estrogenic related)</p>
<p>Level 4 <i>In vivo</i> assays providing data about multiple endocrine Mechanisms and effects</p>	<p>- enhanced OECD 407 (endpoints based on endocrine mechanisms) - male and female pubertal assays - adult intact male assay</p> <p>- Fish gonadal histopathology assay - Frog metamorphosis assay</p>
<p>Level 5 <i>In vivo</i> assays providing data on effects from endocrine & other mechanisms</p>	<p>- 1-generation assay (TG415 enhanced) ¹ - 2-generation assay (TG416 enhanced) ¹ - reproductive screening test (TG421 enhanced) ¹ - combined 28 day/reproduction screening test (TG 422 enhanced) ¹</p> <p>- Partial and full life cycle assays in fish, birds, amphibians & invertebrates (developmental and reproduction)</p> <p><small>¹ Potential enhancements will be considered by VMG mamm</small></p>

Biotests

□ Vertébrés

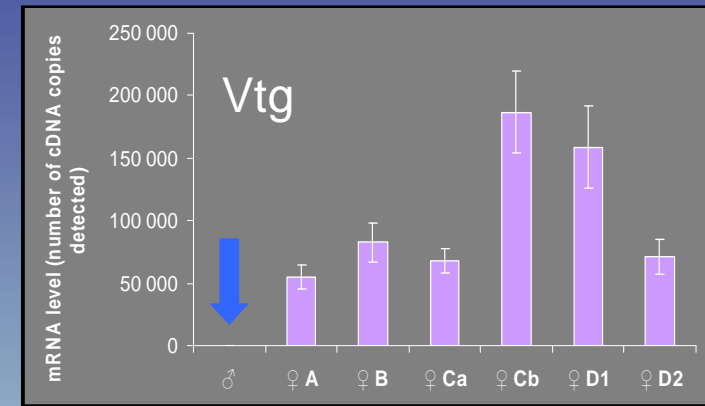
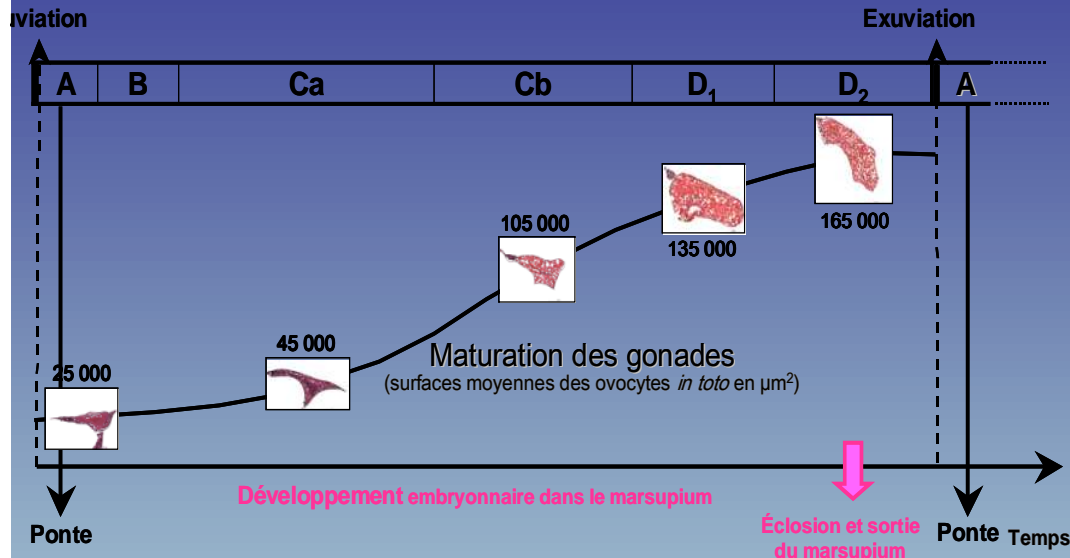
- Amphibiens : métamorphose, développement, reproduction, biomarqueurs
- Poissons : test sur cycle de vie partiel ou complet (développement, reproduction : Vtg, histologie, fécondité, biomarqueurs)
- Oiseaux : morphologie et comportement (activité androgénique)
- Reptiles : induction sexe femelle (inhibition stéroïdogénèse)

□ Invertébrés

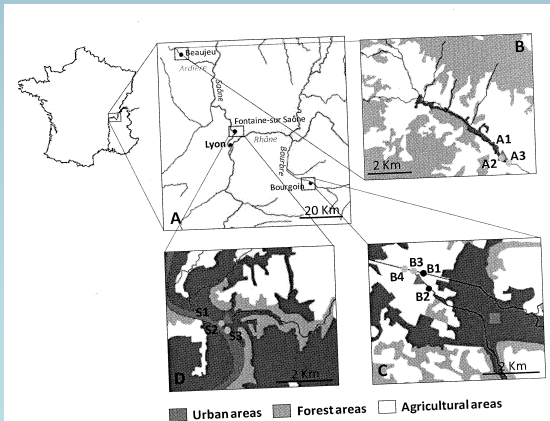
- Arthropodes
 - Crustacés : mysidacés (cycle de vie, biomarqueurs, F0 et F1); gammaridés
 - Insectes : chironomidés (cycle de vie)
- Annélides : oligochètes, polychaetes
- Mollusques : gastéropodes pulmonés et prosobranches , bivalves (cycle de vie, biomarqueurs?)
- Echinoderme : *étoile de mer* (développement, régénération)
- Rotifères

Exemples

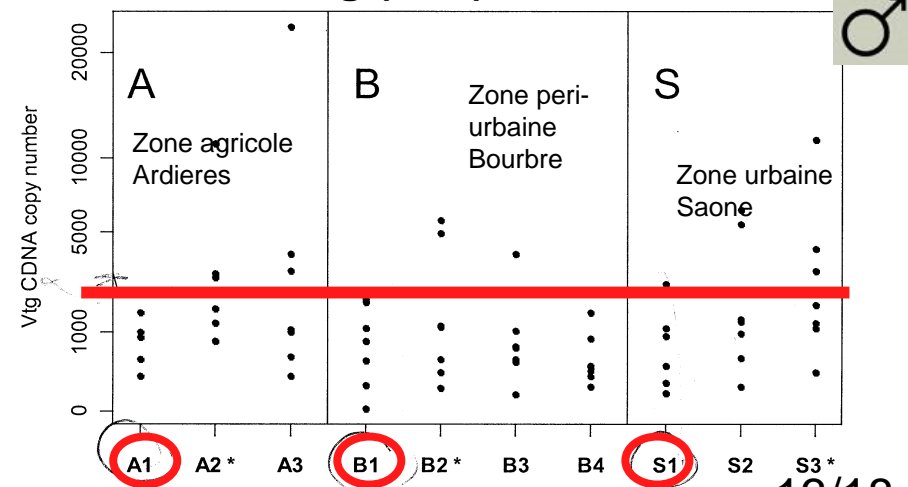
Développement de biomarqueurs de PE chez *G. fossarum*



(Geffard *et al.* 2010), (Xuereb *et al.* 2011)



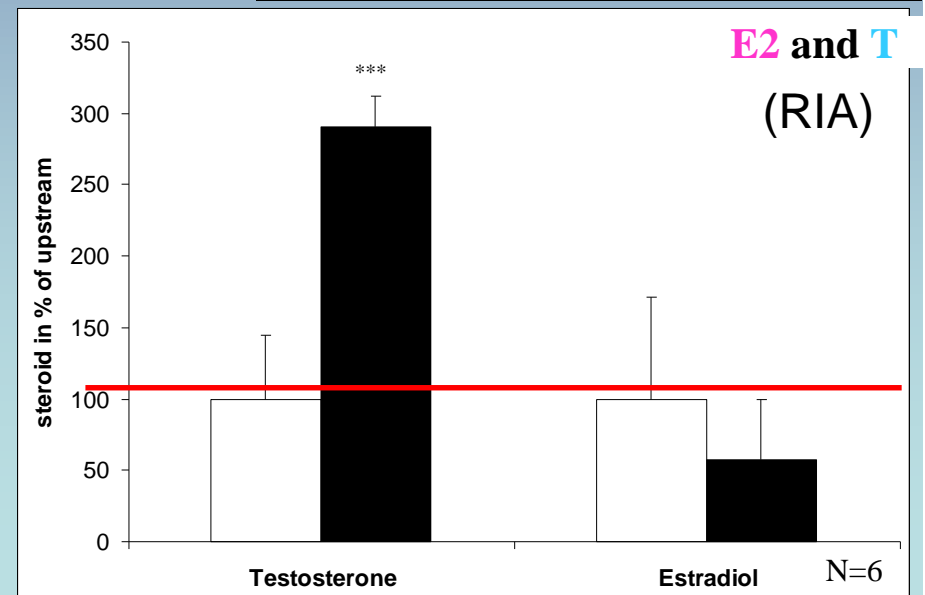
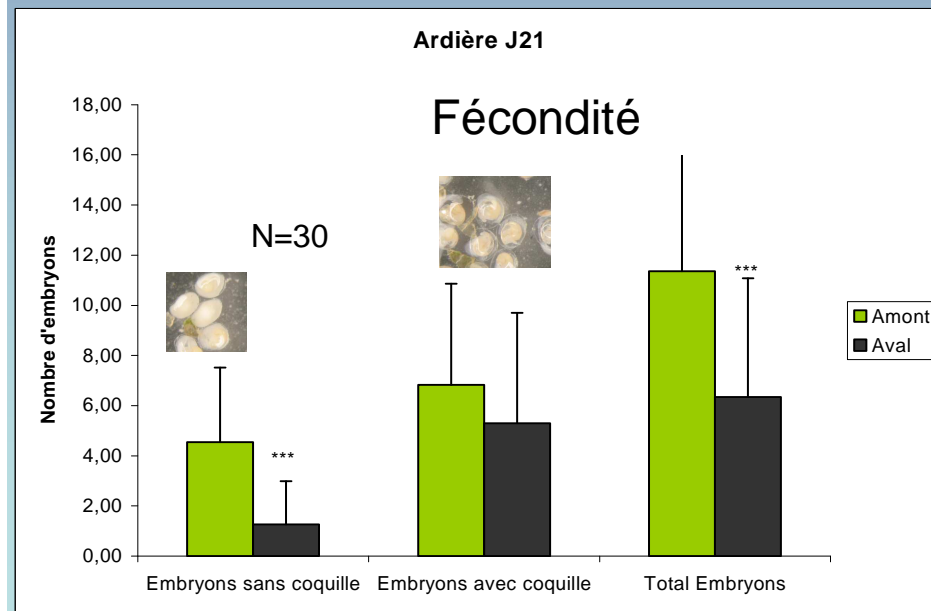
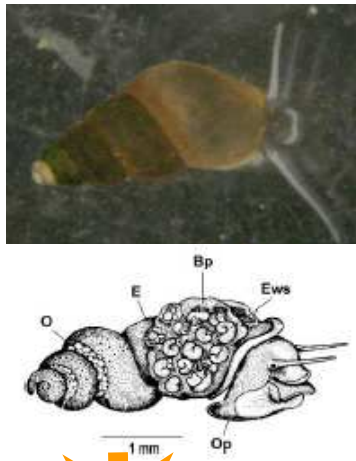
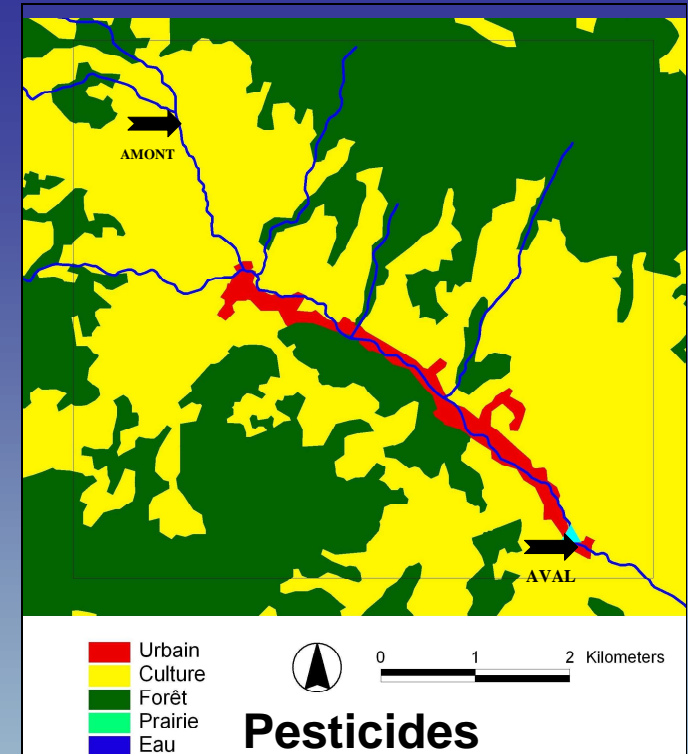
Transcrit Vtg (21J.), mesures in situ



Exemples

Reprotoxicité in situ chez *P. antipodarum*

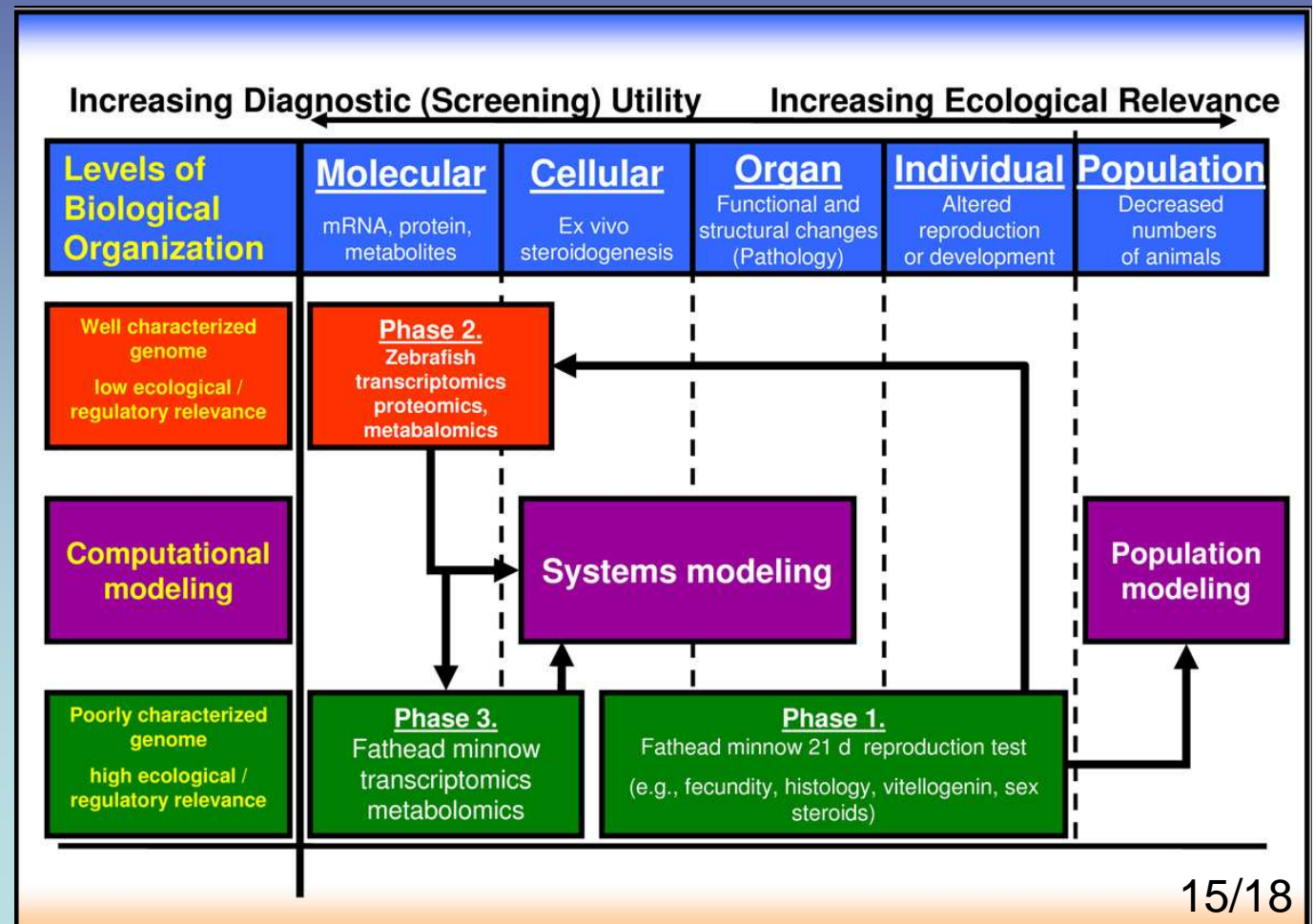
Gust et al. 2010



Du moléculaire à la population

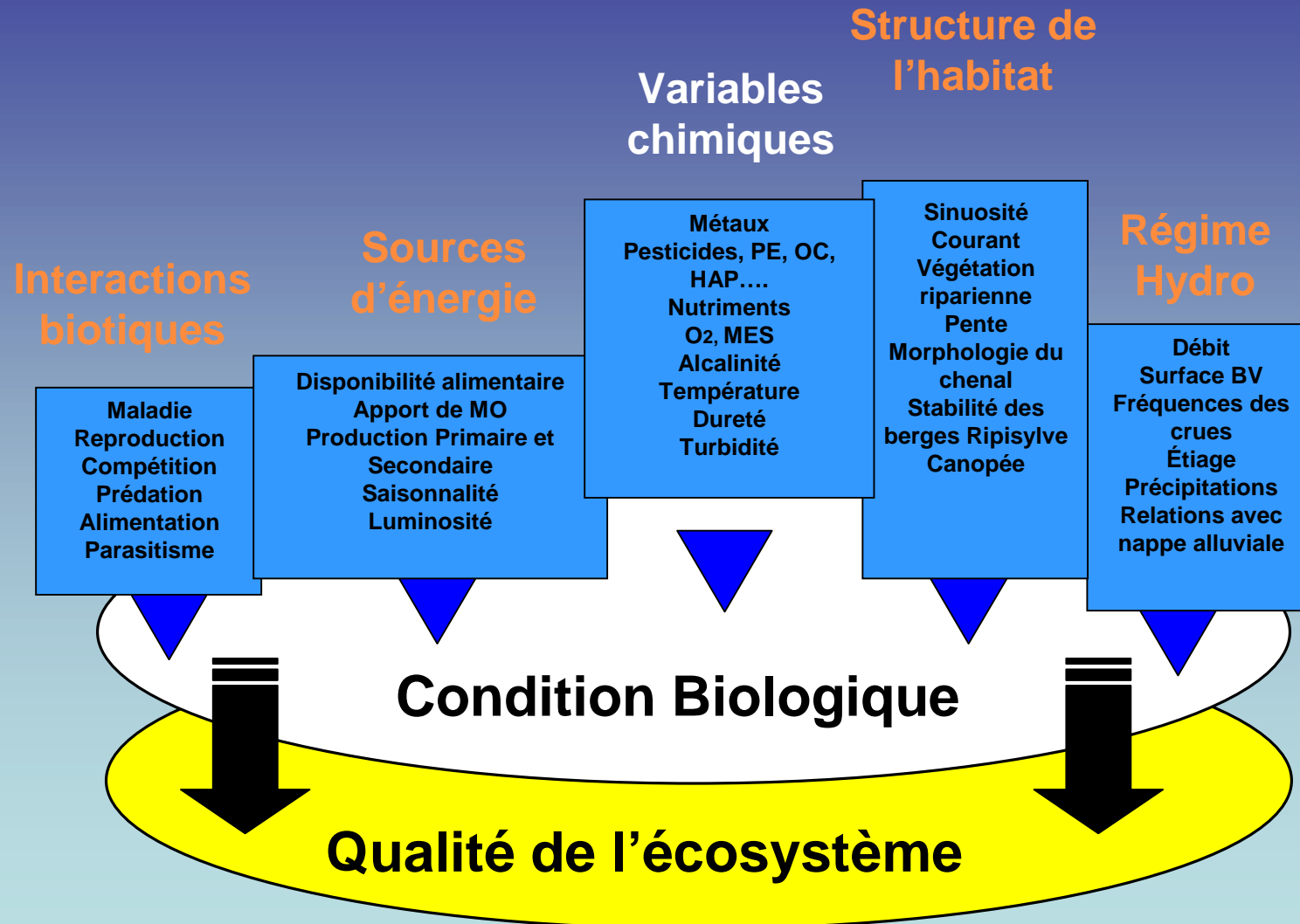
- ❑ Recherche de nouvelles méthodologies et outils (in silico, in vitro, in vivo) pour l'évaluation du risque « PE » chez le poisson (Ankley et al. 2009, US EPA)

Évaluation de substances « modèles » actives sur différentes cibles de l'axe hypothalamus-hypophyse –gonade chez le poisson : intégration des informations : **du gène à la population** > modélisation des voies métaboliques, identification de biomarqueurs



PE dans les écosystèmes

Une approche éco-épidémiologique complexe



Adapté de Karr et al. 1986

PE dans les écosystèmes

□ Des observations

- Inter sexe, métabolisme stéroïdien, malformations : vertébrés et invertébrés
- Comportement reproducteur anormal : prolongation ponte gastéropodes (Benstead et al. 2011)

□ Des interrogations PE ou autre chose ?

- Normalité : « niveau de base »
- Parasitisme
 - Gardon: modulation des stéroïdes, de l'expression de gènes E-dépendant ..., (cestodes, Trubiroha et al. 2010)
 - Amphipodes : intersexe, féminisation (microsporidies, Ford & Fernandes 2005)
 - Gastéropodes : trématodes ? (Morley 2008)

□ Des questions

- Comportement reproducteur des poissons mâles : compétition exposés / non exposés, contribution à la reproduction (Lavelle & Sorensen 2011; Lange et al 2011)
- Adaptation (résistance et succès reproducteur), variabilité génétique dynamique des populations

Conclusion

- ❑ Un corpus de connaissances sur les mécanismes d'action et des outils (biotest, biomarqueurs) en développement : vertébrés
- ❑ Des lacunes chez les invertébrés
 - Connaissances
 - Méthodes et outils (biomarqueurs, biotests) : généralisation délicate
- ❑ Des questions (encore) à traiter
 - Élaboration de tests de screening performants
 - Effet des mélanges (mécanismes d'action et modélisation)
 - Exposition et impact via réseau trophique
 - Impact à long terme sur la dynamique et la vulnérabilité des populations
- ❑ Des méthodes et outils à développer
 - Outils de détection in situ (biomarqueurs)
 - Identification des causes de PE (couplage chimie-biologie)
 - Élaboration de NQE