

# Caractérisation des perturbateurs endocriniens:

Le point de vue d'une société de services et d'innovation

Olivier Foulon, PharmD, PhD, ERT  
Managing Director / Director of Operations  
MNHN, 30 juin 2016



# Réglementation sur les Perturbateurs Endocriniens (ED) dans la Communauté Européenne (EC)

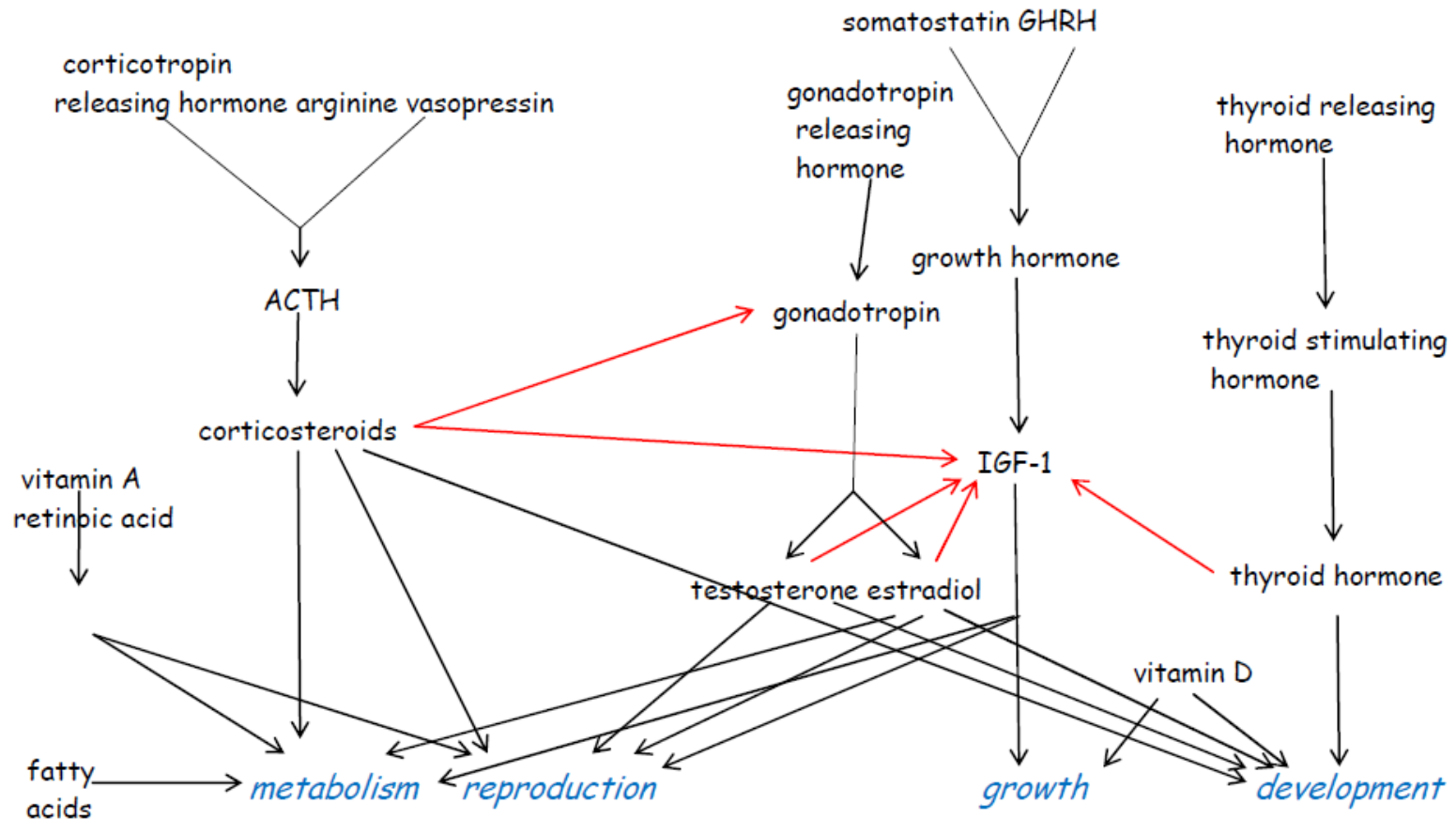
---

- **Définition:**
  - “... substance ou un mélange exogène, possédant des propriétés susceptibles d’induire une perturbation endocrinienne dans un organisme intact, chez ses descendants ou au sein de (sous)- populations..” (WHO/IPCS, 2002)
- **Réglementations:**
  - **Plant Protection Product Regulation (EC) 1107/2009**
  - **Biocidal Product Regulation (EU) 528/2012**
  - REACH
  - Cosmetics
- **Analyse de l’impact:**
  - Définir des critères scientifiques d’identification des ED est une obligation légale dans l’EC
  - Legislative policy solutions under PPP and BP regulations (Options 1-4 and A-C)
- **EDTA:**
  - Endocrine Disruptor Testing and Assessment: International advisory group for cooperation on validation of tests and testing strategies
  - Will incorporate what was learned in US EPA’s Endocrine Disruptor Screening Program

# Cibles potentielles

<b>Organes</b>	<b>Ex. hormone</b>	<b>Ex. Fonction</b>
Epiphyse	Mélatonine	<i>Sommeil</i>
Hypophyse	Somatotropine	<i>Croissance, division cellulaire</i>
	Prolactine	<i>Production de lait, satiété sexuelle</i>
	TSH	<i>Stimulation de la thyroïde / sécrétion T3/T4</i>
	LH	<i>Femelle: ovulation Male: regulation de la production de testostérone</i>
Thyroïde	Thyroxine (T4)	<i>Métabolisme</i>
	Triiodothyronine (T3)	<i>Métabolisme</i>
Surrénales	Glucocorticoïdes	<i>Absorption du glucose</i>
	Adrenaline	<i>Réaction aux situations de stress/défense</i>
Pancréas	Insuline	<i>Regulation de la glycémie</i>
Ovaires	Progestérone	<i>Gestation, relaxation musculaire, ...</i>
	Estrogènes	<i>Croissance, caractères sexuels secondaires</i>
Testicules	Testostérone	<i>Masse musculaire, densité osseuse, maturation sexuelle</i>

# Potential targets



**Figure 1-3. Some examples of neuro-endocrine pathways that are affected by EDCs, resulting in symptoms of metabolic syndrome and disruptions in reproduction, growth, and development.**

Black arrows denote contiguous pathways. Red arrows highlight examples of cross-talk between pathways.

# Types d'études réalisables pour d'évaluation de la sécurité d'une substance sur le système endocrinien

Détection

- Etudes de tri/sélection (screening)
  - *In vitro*
  - *In vivo*
- Etudes réglementaires pour l'enregistrement des produits
  - Protocoles établis à partir des lignes directrices internationales
  - Bonnes Pratiques de Laboratoires (BPL)
- Etudes mécanistiques
  - Tests sur des modèles moléculaires (binding) ou cellulaires (expression)
  - Modèles animaux spéciaux

Caractérisation

# Studies requested for endocrine-related safety testing

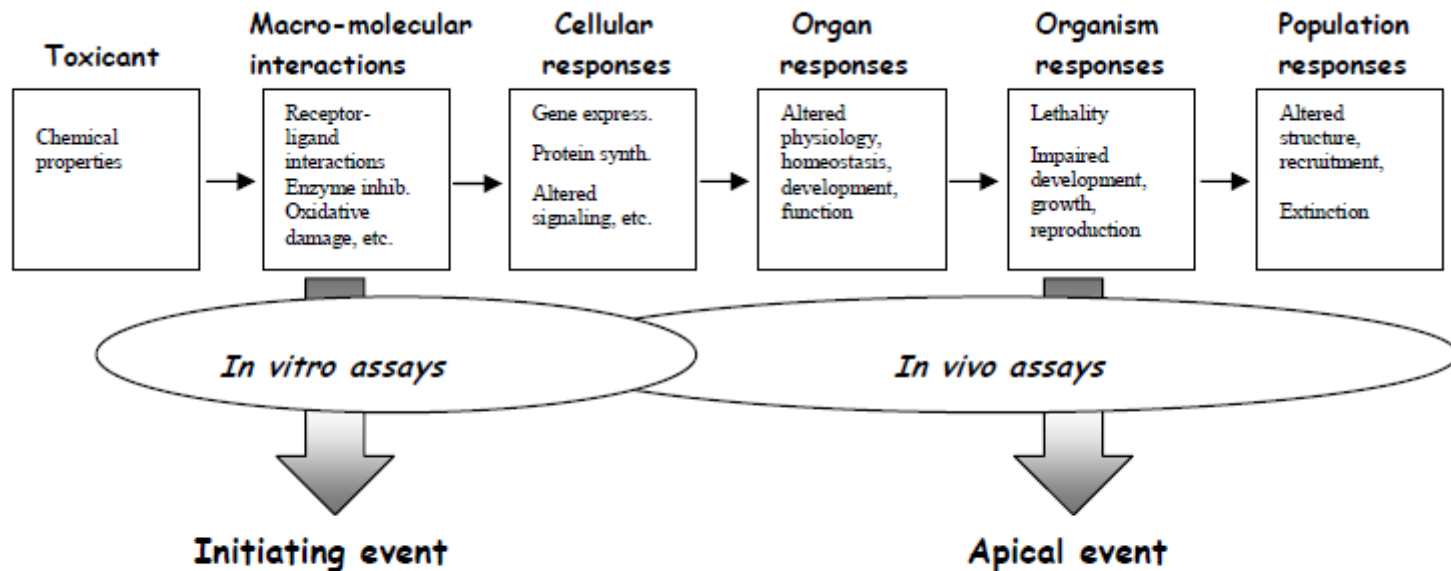


Figure 1-1 Adverse outcome pathway structure depicting the realms of *in vitro* and *in vivo* assays, site of initial interaction with toxicant (initiating event), and site of the typical initial adverse outcome (Adapted from Ankley et al.<sup>4</sup>)

# Evaluation des perturbateurs endocriniens

- L'OCDE a établi une liste de méthodes disponibles pour l'évaluation des produits chimiques en ce qui concerne la perturbation endocrinienne.
- Ce cadre n'a pas l'ambition de présenter une stratégie d'évaluation mais catégorise les tests disponibles en 5 niveaux:



- Niveau 1: bilan des données existantes (hors tests)
- Niveau 2: tests *in vitro* à visée mécanistique (screening)
- Niveau 3: tests 'court-termes' *in vivo* sur certains effets endocriniens
- Niveau 4: essais *in vivo* fournissant des données sur des effets adverses sur des paramètres endocriniens
- Niveau 5: essais *in vivo* fournissant des données plus complètes sur les effets adverses sur le système endocrinien impliquant le cycle de vie de l'organisme.

1

2

3

4

5

<http://alttox.org/mapp/toxicity-endpoints-tests/endocrine-disruptors/>

<http://www.oecd.org/fr/env/ess/essais/oecdworkrelatedtoendocrinedisrupters.htm>

## Niveau 1: Données existantes (hors tests)

*Level 1: Existing Data and Non-Test Information*

---

- Propriétés physico-chimiques (ex.: MW, réactivité, volatilité, biodégradabilité)
- Toutes données écotoxicologiques obtenues à partir de tests standardisés ou non;
- 'Read across' / 'famille chimique', relations structures/activités (QSARS et autres prédictions *in silico*), modélisation ADME, etc...

1

2

3

4

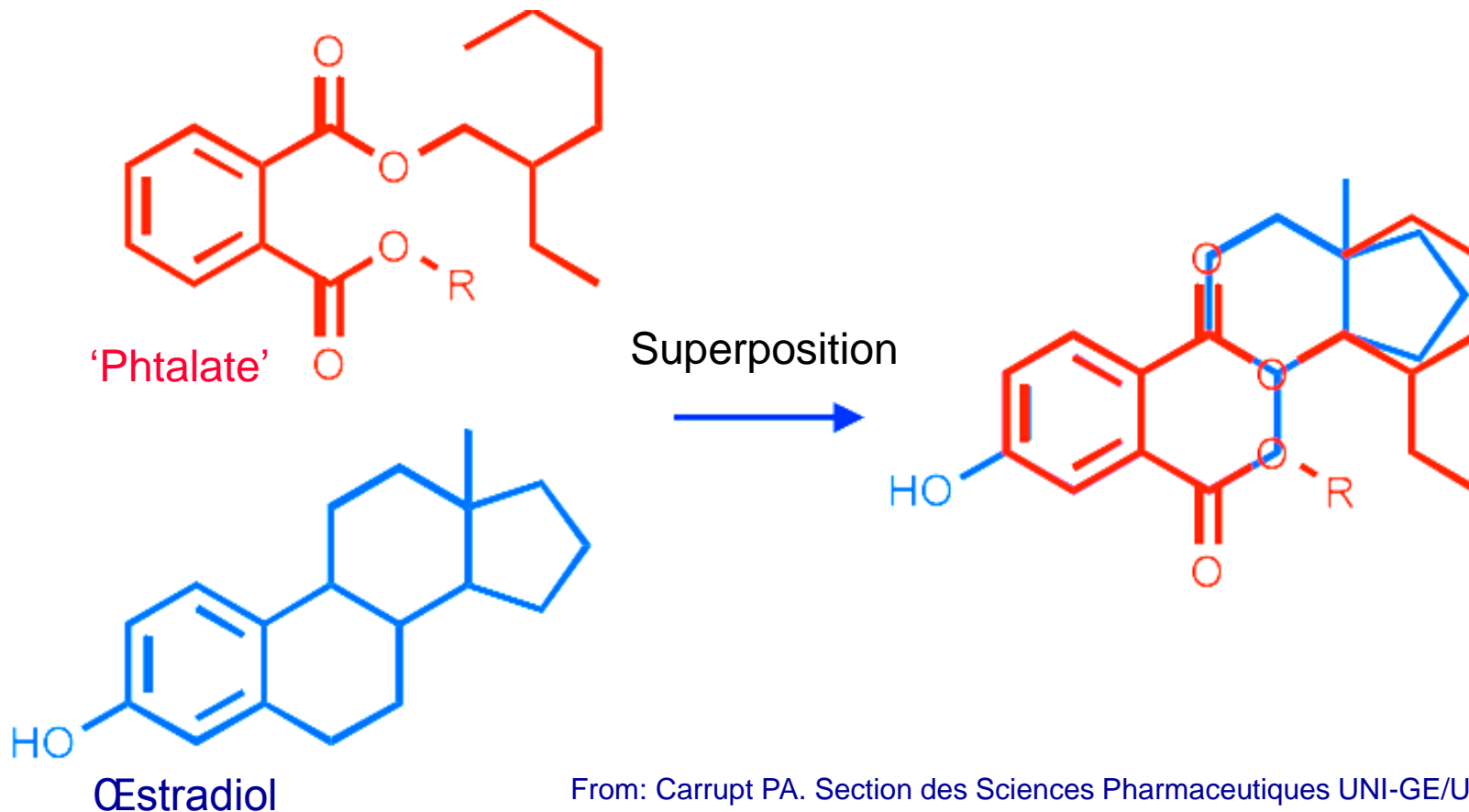
5



# Niveau 1: Données existantes (hors tests)

Level 1: Existing Data and Non-Test Information

QSAR; Identification de structure(s) à risque (toxicophores)



From: Carrupt PA. Section des Sciences Pharmaceutiques UNI-GE/UNIL

1

2

3

4

5

## Niveau 2: tests *in vitro* à visée mécanistique

Level 2: *In vitro* assays providing data about selected endocrine mechanism(s) / pathways(s).

- AR: Androgen Receptor / CALUX: Chemical Activated LUciferase gene eXpression (not yet validated by OECD)
  - Human osteosarcoma cell line (U2-OS) transfected with cDNA for human androgen receptor androgen responsive reporter gene (3 x ARE TATA luc)
  - Measure transactivation of a reporter gene controlled by an hormone response element (AR: Androgen Receptor)
    - *Androgenic compounds (agonists) bind specifically to the androgen receptor and increase the production of luciferase in a concentration dependent manner.*
    - *Anti-androgenic compounds (antagonists) bind to the receptor, but do not lead to production of luciferase.*
- European validation project organised by ECVAM
  - CiToxLAB France participation as official member of EU-NETVAL laboratory

1

2

3

4

5

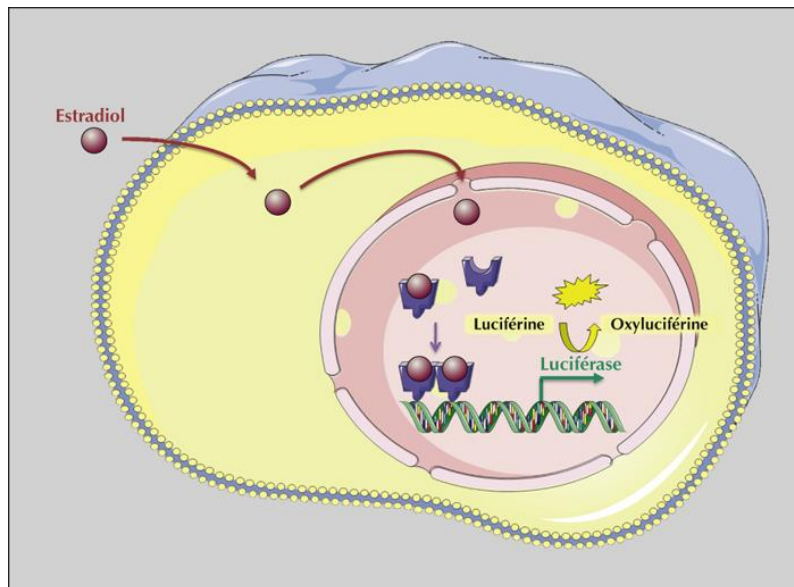
## Niveau 2: tests *in vitro* à visée mécanistique

Level 2: *In vitro* assays providing data about selected endocrine mechanism(s) / pathways(s).

- 3 OECD guidelines adopted for *in vitro* test for endocrine disruptor evaluation:

These tests provide data about selected endocrine mechanism(s) / pathways(s) only (*In vitro* transactivation test with stable transfection)

- OECD 455 (July 2015): Detection of estrogen-receptor agonists and antagonists
- OECD 456 (2011): H295R Steroidogenesis assay
- OECD 493 (July 2015): Human-recombinant estrogen-receptor binding assay



### Test de transactivation de récepteur.

Ex: l'estradiol pénètre passivement dans la cellule et se lie à son récepteur spécifique. Le complexe hormone-récepteur se dimérise et se fixe à son élément de réponse sur la construction gène-rapporteur, ce qui résulte en la transcription de la luciférase, qui a la capacité de cliver la luciférine en oxyluciférine en libérant un photon.

Quignot et al. (2011); DOI : 10.1684/ers.2011.0498

1

2

3

4

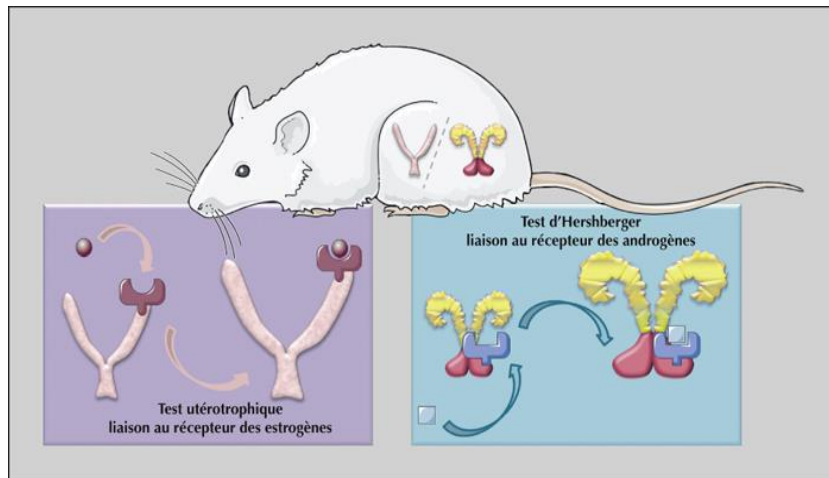
5

# Niveau 3: Tests 'court-termes' *in vivo* sur certains effets endocriniens.

Level 3: *In vivo* assays providing data about selected endocrine mechanism(s) / pathway(s)

## ■ Mammalian toxicology

- Uterotrophic bioassay in rodents (OECD 440; OCSP 890.1600)
- Hershberger bioassay in rodents (OECD 441; OCSP 890.1400)



### Tests d'utérotrrophique et d'Hershberger.

Ces tests sont basés sur le principe que des composés se liant aux récepteurs des estrogènes chez les femelles ou des androgènes chez les mâles peuvent induire des variations de poids des organes estrogéno- et androgéno-dépendants, à savoir, l'utérus chez la femelle et la prostate ventrale et les vésicules séminales chez le mâle.

Quignot et al. (2011); DOI : 10.1684/ers.2011.0498

1

2

3

4

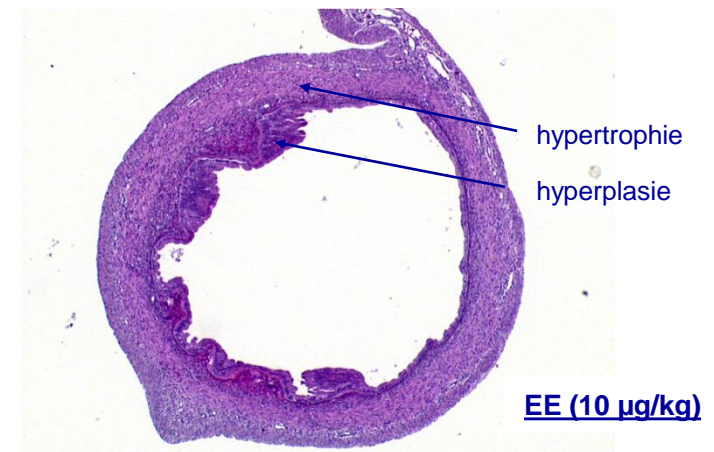
5

# Uterotrophic bioassay in rodents (OECD 440)

*Bio-essai utéro-trophique chez les rongeurs: essai de dépistage à court terme des propriétés oestrogéniques*



- Action de l'éthinylestradiol (EE)
  - Macro.: hypertrophie et contenu liquidien
  - Micro.: hypertrophie et hyperplasie



1

2

3

4

5

## Niveau 3: Tests 'court-termes' *in vivo* sur certains effets endocriniens.

Level 3: *In vivo* assays providing data about selected endocrine mechanism(s) / pathway(s)

### ■ Non-mammalian toxicology

- Fish Short Term Reproduction Assay (OECD 229; OCSP 890.1350)

- 21-day Fish Assay (OECD 230)



- Amphibian metamorphosis assay (OECD 231; OCSP 890.1100)

- Test en cours de développement (no TG already available)

- *Xenopus* embryo thyroid signalling assay

1

2

3

4

5

## Niveau 4: essais *in vivo* fournissant des données sur des effets adverses sur des paramètres endocriniens

Level 4: *In vivo* assays providing data on adverse effects on endocrine relevant endpoints

**GLP CERTIFIED**

- Mammalian toxicology
  - Repeated dose 28-day study (OECD 407; OCSPP 870.3050)
  - Repeated dose 90-day study (OECD 408; OCSPP 870.3100)
  - 1-generation reproduction toxicity study (OECD 415)
  - Male pubertal assay (see OECD 150, Chapter C4.3; OCSPP 890.1500)
  - Female pubertal assay (see OECD 150, Chapter C4.4; OCSPP 890.1450)
  - Intact adult male endocrine screening assay (see OECD 150, Chapter Annex 2.5)
  - Prenatal developmental toxicity study (OECD 414; OCSPP 870.3700)
  - Chronic toxicity and carcinogenicity studies (OECD 451-3; OCSPP 870.4100-300)
  - Reproductive screening test (enhanced OECD 421; OCSPP 870.3550)
  - Combined 28-day/reproductive screening assay (enhanced OECD 422; OCSPP 870.3650)
  - Developmental neurotoxicity (OECD 426; OCSPP 870.6300)

1

2

3

4

5

## Niveau 4: essais *in vivo* fournissant des données sur des effets adverses sur des paramètres endocriniens

*Level 4: In vivo assays providing data on adverse effects on endocrine relevant endpoints*

- Non-mammalian toxicology
  - Avian Reproduction Assay (OECD 206)
  - Daphnia Reproduction Test (with male induction) (OECD 211)
  - Chironomid Toxicity Test (OECD 218-219)
  - Enchytraeid Reproduction Test (OECD 220)
  - Earthworm Reproduction Test (OECD 222)
  - Sediment Water Lumbriculus Toxicity Test Using Spiked Sediment (OECD 225)
  - Predatory mite reproduction test in soil (OECD 226)
  - Collembolan Reproduction Test in Soil (OECD 232)
  - Fish sexual development test (OECD 234)
  
- Test en cours de développement (no TG already available)
  - Fish reproduction partial lifecycle test
  - Mollusc partial lifecycle test

**GLP CERTIFIED**

1
2
3
4
5



**Level 5: *In vivo* assays providing more comprehensive data on adverse effects on endocrine relevant endpoints over more extensive parts of the life cycle of the organism**

*Niveau 5: essais in vivo fournissant des données plus complètes sur les effets néfastes sur le système endocrinien impliquant des des parties plus importantes du cycle de vie de l'organisme*

- Mammalian toxicology
  - 2-Generation reproduction toxicity study (OECD 416 most recent update)
  - Extended one-generation reproductive toxicity study (OECD 443)
- Non-mammalian toxicology
  - Fish life cycle toxicity test (OCSPP 850.1500)
  - Medaka multi-generation test (OCSPP 890.2200 for Medaka extended one-generation reproduction test)
  - Avian two-generation reproductive toxicity assay (OCSPP 890.2100)
  - Sediment water chironomid lifecycle toxicity test (OECD 233)
- Test en cours de développement (no TG already available)
  - Mysid lifecycle toxicity test
  - Copepod reproduction and developmental test



1
2
3
4
5



# Conclusion à partir d'une étude?

Forte dose  
Effets ....adverse

?

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

Particularités des PE

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

Faible dose  
Dose sans effet : NOEL

/ par ex par un  
facteur de 100

Niveau de sécurité pour  
l'Homme et La faune

Non utilisée  
seule

?

Testée  
en mélange

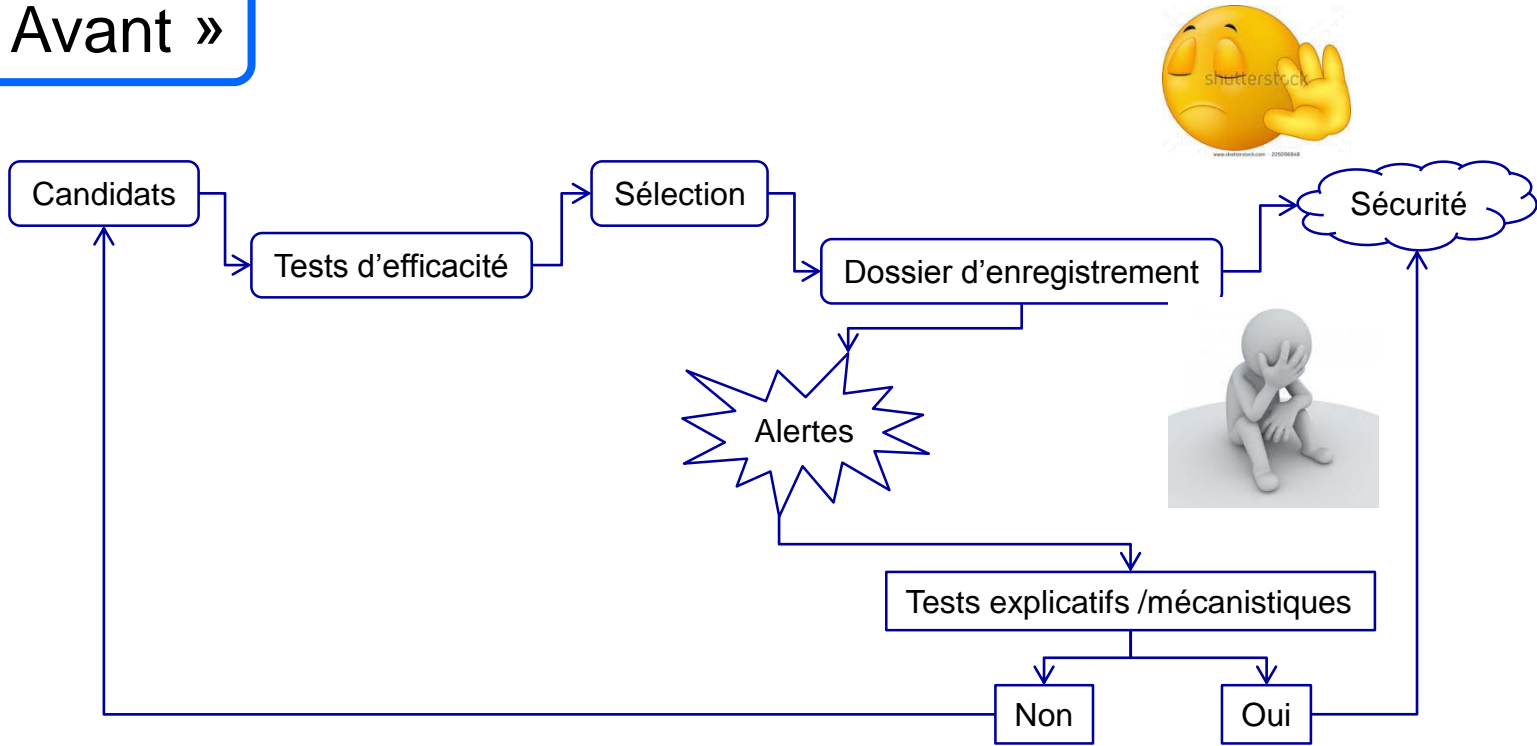
?

# Conclusion

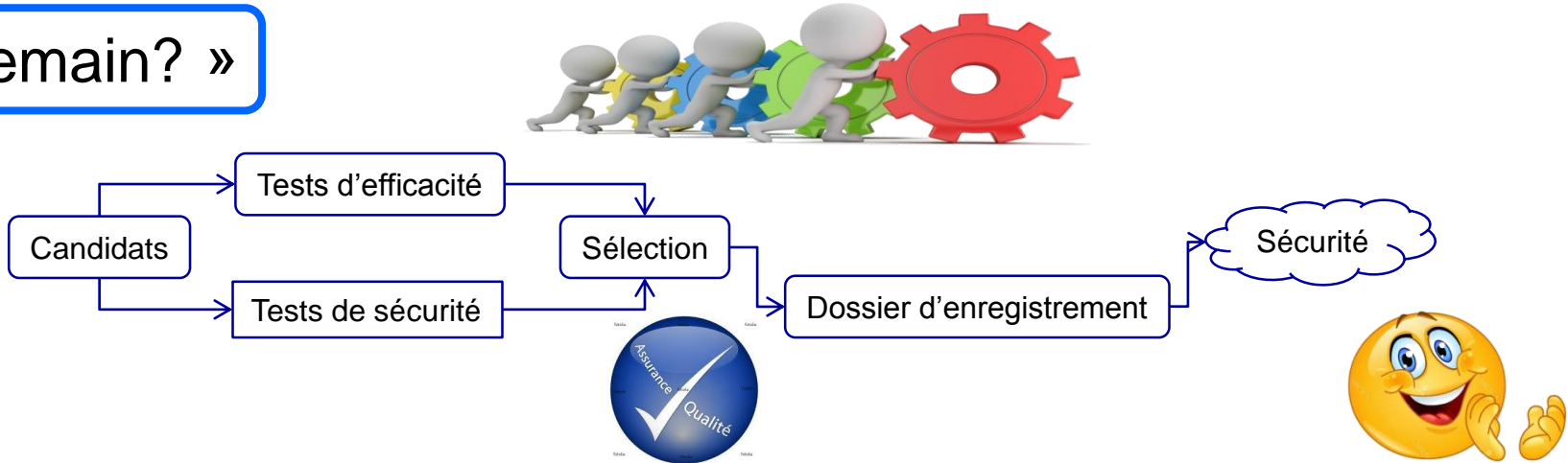
---

- Plusieurs tests (certains sont peu utilisés)
  - La plupart des perturbateurs endocriniens connus sont déjà réglementés, pour des raisons autres que leur activité hormonale (toxicité générale, cancérogénicité, toxicité sur la reproduction).
- Effets retards potentiels mal appréhendés (troubles de l'homéostasie, vieillissement, ...)
- Comment caractériser les effets des mélanges complexes et les effets après exposition à différentes périodes critiques de la vie?
  - La multiplicité des cibles des PE accentue le besoin d'une stratégie intégrative (approche multi-cibles): besoin de tests pour plusieurs cibles potentielles
- L'interaction seule d'une substance avec le système endocrinien n'est pas une condition suffisante pour la considérer comme une PE: l'effet est-il adverse?.
  - Avons-nous les moyens (connaissances, savoir-faire et expertises) pour interpréter la relevance des observations/résultats (acquis *in vitro* et *in vivo*) ?

# « Avant »



# « Demain? »



**Merci pour votre attention  
et  
Merci aux  
Dr Pramila Singh  
Dr François Spezia  
pour leur aide**

