

Développement d'une voie de toxicité quantitative prédisant les impacts des PE sur la reproduction du poisson-zèbre : projet GINFIZ

Avril 2025

Dans un contexte où l'omniprésence de perturbateurs endocriniens (PEs) dans l'environnement suscite des préoccupations importantes, comprendre et gérer leurs risques à court et long terme sur les écosystèmes est devenu essentiel. Ces substances, de structures et d'origines variées, ont la capacité de perturber le système endocrinien des organismes, affectant des processus biologiques vitaux, tels que la croissance, le développement, et particulièrement la reproduction. En réponse à ce danger, les réglementations européennes récentes évoluent vers l'identification précise des PEs, par l'établissement d'un lien de causalité entre l'exposition, un mode d'action de type PE et des effets néfastes à des niveaux biologiques pertinents. Aujourd'hui, le défi réside dans le développement d'outils robustes qui, tout en répondant aux exigences réglementaires, respectent également les enjeux éthiques actuels de la recherche.

Un des enjeux se situe dans la traduction des déficits fonctionnels chez les individus en effets au niveau des populations en limitant le recours à l'expérimentation animale. Cette extrapolation des données de toxicité individuelles, à partir des mesures faites en laboratoire, à l'échelle des populations (unité biologique que l'on vise à protéger) pour évaluer les conséquences sur leur viabilité n'est pas triviale. Dans ce contexte, la proposition de voies de toxicité, appelées AOP (« adverse outcome pathway »), reliant les effets aux différentes échelles d'organisation biologique et la modélisation mécaniste multi-échelles apportant une dimension quantitative à ces voies de toxicité (AOP quantitative, qAOP) permettent, d'une part, cette extrapolation des effets néfastes entre niveaux d'organisation biologique et, d'autre part, de mettre en évidence le lien de cause à effet entre un mode d'action et des effets sur les populations.

Le projet GinFiz visait donc à développer et à tester de nouvelles méthodes pour caractériser les effets non-intentionnels des produits phytopharmaceutiques sur les populations de poissons, en particulier les impacts résultant d'atteintes du système endocrinien des individus. Ce projet, financé par le Programme national de recherche Environnement-Santé Travail (PNR EST) de

l'ANSES (Projet EST-2020/01/133), coordonné par l'Ineris, proposait à cette fin le développement et l'amélioration d'une qAOP de l'inhibition de l'aromatase afin de prédire précisément pour les PE, les doses internes accumulées, et leurs liens avec les impacts sur les différents niveaux biologiques, jusqu'aux effets sur les populations. Par ailleurs, dans un contexte réglementaire où l'identification des PE est notamment conditionnée par une démonstration des modes d'action postulés, mais où la méthodologie correspondante (guide ECHA¹ / EFSA²) n'a encore été que peu éprouvée à ce stade, le projet ambitionnait d'explorer les apports de l'intégration d'une qAOP afin d'améliorer l'évaluation des dangers de ces substances.

Pour répondre à ces objectifs, le projet était organisé autour de deux grandes tâches : la première tâche était dédiée à l'acquisition de données, au développement de modèles et à la construction de la qAOP, et la seconde tâche traitait de l'utilisation de la qAOP dans un contexte réglementaire. A cette fin, nous avons sélectionné deux fongicides azolés inhibiteurs de l'aromatase, le prochloraz (PCZ) et l'imazalil (IMZ), pour lesquels des informations mécanistiques et quantitatives sont déjà disponibles et qui présentent des cas d'étude intéressants du point de vue réglementaire.

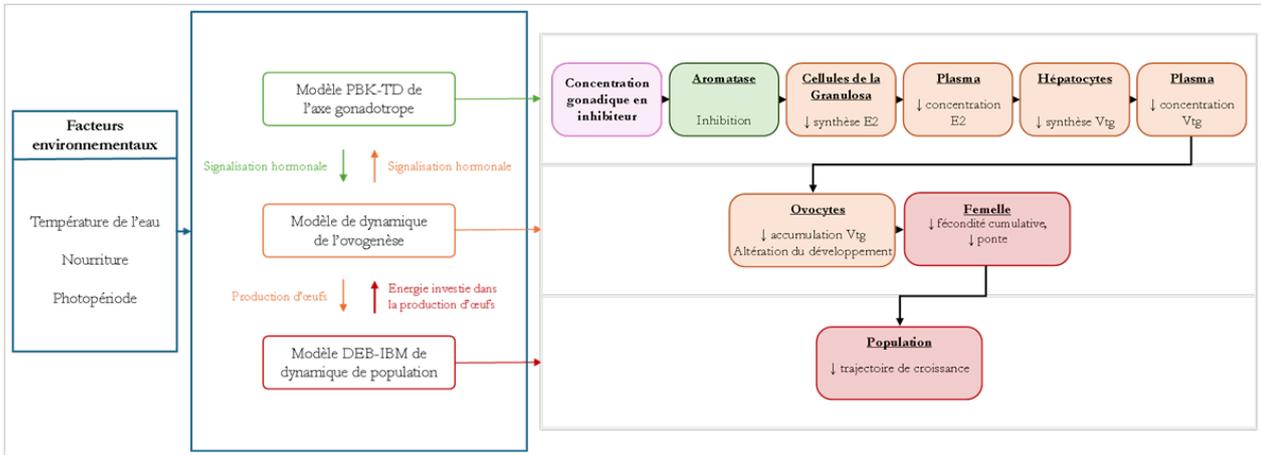


Figure 1 / Schéma de la qAOP de l'inhibition de l'aromatase chez le poisson zèbre.

Le développement de la qAOP pour le poisson zèbre a impliqué l'amélioration et/ou l'adaptation de quatre modèles mathématiques différents (Fig.1) : (i) calibration et application d'un modèle cinétique basé sur la physiologie (PBK) chez le poisson zèbre pour les substances étudiées, (ii) perfectionnement du modèle de dynamique des hormones stéroïdiennes chez le poisson zèbre : modèle de toxicodynamie (TD) de l'axe gonadotrope, représentant l'hypothalamus-hypophyse-gonades (axe HPG), (iii) transcription du modèle de dynamique de développement des ovocytes au poisson zèbre, (iv) modèle de dynamique des populations (basé sur la théorie «Dynamic Energy Budget » DEB, et utilisant une approche individu centrée, IBM). Ces travaux de modélisation se sont appuyés sur la production de données complémentaires générées au cours du projet GinFiz.

La toxicocinétique (TK) des fongicides azolés chez les poissons était peu documentée, en particulier celles du prochloraz (PCZ) et de l'imazailil (IMZ). Un sous objectif du projet était donc de comprendre et de modéliser la TK des deux substances chez le poisson zèbre indépendamment du schéma d'exposition. Pour cela, les données TK de la littérature ont été collectées, incluant différents modes d'exposition (per os et par l'eau) chez différentes espèces de poissons. De plus, deux expériences sur des poissons zèbres exposés, soit à l'IMZ, soit au PCZ, ont été réalisées pour compléter les données. Les travaux de modélisation PBK ont été réalisés à l'Ineris et ils suggèrent fortement que le PCZ et l'IMZ sont activement transportés à travers les branchies en absorption et excrétion, impliquant que la fraction effectivement absorbée par les poissons est faible (Fig. 2). Les résultats du modèle confirment également que les deux molécules sont largement métabolisées par le foie, principalement en des conjugués glucuronides. Dans l'ensemble, les performances du modèle sont bonnes, prédisant précisément les concentrations internes dans plusieurs organes clés chez les mâles et les femelles (Fig. 3). Ainsi, le modèle PBK permet de comprendre les profils cinétiques de l'IMZ et du PCZ en prédisant avec précision les concentrations internes dans différents organes dans trois espèces de poissons différentes, quel que soit le scénario d'exposition (per os et par l'eau) (Ly et al., 2024).

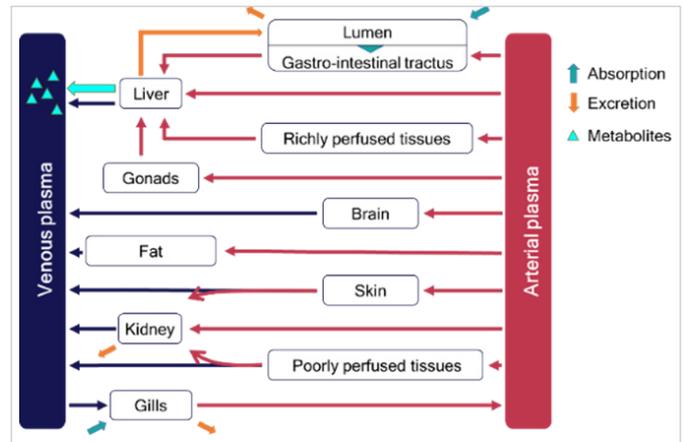


Figure 2 / Schéma du modèle PBK.

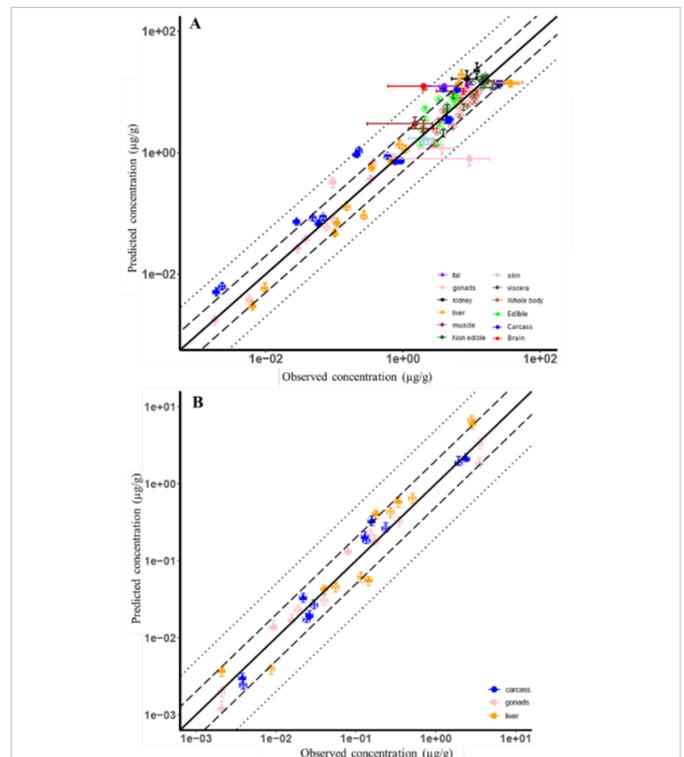


Figure 3 / Comparaison des concentrations mesurées et des simulations du modèle pour les deux fongicides azolés : le prochloraz (A) et l'imazailil (B). Les mâles et les femelles sont représentés respectivement par des points vides et pleins.

Un second modèle représentant l'axe gonadotrope a été développé à l'Ineris afin d'étudier la perturbation du système endocrinien induite par une inhibition de l'aromatase chez le poisson zèbre femelle. Ce second modèle a été combiné au modèle PBK de façon à tenir compte des fluctuations des concentrations internes en contaminant. Ce modèle de l'axe gonadotrope est donc un modèle PBK-TD comprenant l'hormone lutéinisante (LH), la testostérone (T), la 17β -estradiol (E2), la 11-kétotestostérone (11-KT) et la synthèse de la vitellogénine (VTG). Le développement du modèle a été réalisé en deux étapes : (i) modélisation de l'état basal physiologique de l'axe gonadotrope ; (ii) modélisation de la TD de l'IMZ et du PCZ. Deux expériences ont été réalisées permettant la calibration du modèle et de compléter les données produites lors de précédents projets (De Oliveira *et al.* 2020). Dans le modèle, les effets du PCZ et de l'IMZ découlent de l'inhibition compétitive de l'aromatase, compensée partiellement par une induction du gène de l'aromatase. Le modèle reproduit de façon précise le fonctionnement physiologique de l'axe gonadotrope, ainsi que sa perturbation par les deux substances (Fig. 4). Ainsi, l'ensemble de ces résultats expérimentaux ont été prédits par le modèle dans une plage de variation d'un facteur deux pour l'état physiologique et pour les effets sur l'E2, la VTG et l'aromatase. Le modèle calibré a été également capable de prédire des données de la littérature autant sur les niveaux physiologiques des hormones (i.e., sans exposition) qu'à la suite d'une exposition au PCZ chez le poisson zèbre (Ly *et al.*, 2025).

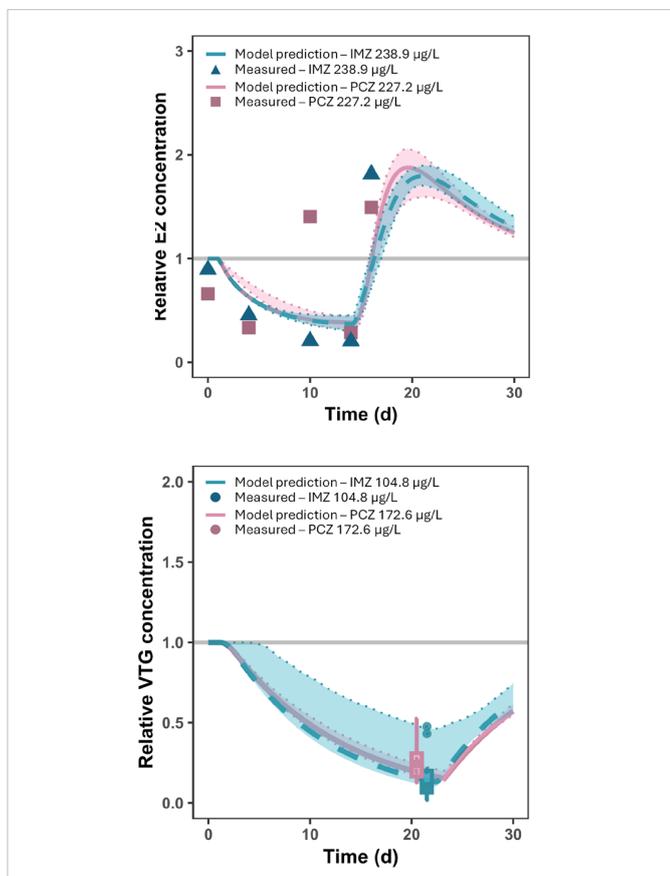


Figure 4 / Observations expérimentales et prédictions du modèle pour les concentrations d'œstradiol (E2) et de vitellogénine (VTG) dans le plasma de poissons zèbres exposés au PCZ et à l'IMZ.

Pour ces deux sous objectifs du projet, l'acquisition de nouvelles données a été réalisée par l'Ineris. En particulier, grâce au protocole de suivi *in vivo* de l'aromatase A dans les gonades de poissons zèbres transgéniques *cyp19a1a-eGFP* développé lors du projet AIDEZ (APR EST ANSES 2016³), la cinétique d'effet de l'IMZ sur l'aromatase gonadique (enzyme clé pour la reproduction) a pu être suivie. Par ailleurs, les dosages des concentrations des deux substances dans l'eau et les tissus ont été réalisés par l'équipe LPTC de l'UMR EPOC (UMR 5805 Université de Bordeaux/CNRS). De plus, une méthodologie de dosage des stéroïdes circulants à partir de très petits volumes de sang par LC-MSMS a été mise au point au cours du projet par ce même partenaire.

Pour développer le modèle d'ovogenèse (troisième modèle de cette qAOP), de nouvelles données ont été acquises sur la perturbation de ce processus par les deux substances d'intérêt, PCZ et IMZ. A l'issue des premières expositions, des analyses histologiques computationnelles (analyses 2D) ont été réalisées sur les coupes d'ovaires de poissons zèbre témoins et de poissons zèbre exposés à la plus forte concentration de chacune des substances en s'appuyant sur l'expertise du Laboratoire de Physiologie et génomique des Poissons (LPGP), INRAE. Ces analyses ont été réalisées par une approche couplant des marquages cellulaires et une imagerie fine des coupes histologiques (scanner de lames), suivie d'une analyse automatique des ovocytes (nombre et taille). L'analyse des images 2D a été réalisée à l'aide d'un pipeline basé sur l'utilisation d'outils de Deep-Learning open source, Noise2Void (Krull *et al.* 2019) et Cellpose (Stringer *et al.* 2021).

De plus, les échantillons récoltés lors de l'expérience de suivi du cycle de l'ovogenèse chez les poissons non exposés (réalisée à l'Ineris) ont permis de tester, chez le poisson zèbre, une méthode d'histologie 3D des ovaires utilisant des outils de deep learning pour une analyse fiable d'images 3D complexes d'ovaires (Fig 5). Cette méthodologie, développée par le partenaire LPGP, a ensuite été utilisée pour analyser finement les effets de l'IMZ sur l'ovogénèse à partir des échantillons chez des poissons transgéniques *cyp19a1a-GFP* et a permis de confirmer les effets obtenus avec les analyses 2D (proportions plus élevées d'ovocytes de grande taille au détriment des ovocytes de petite taille, en comparaison des témoins).

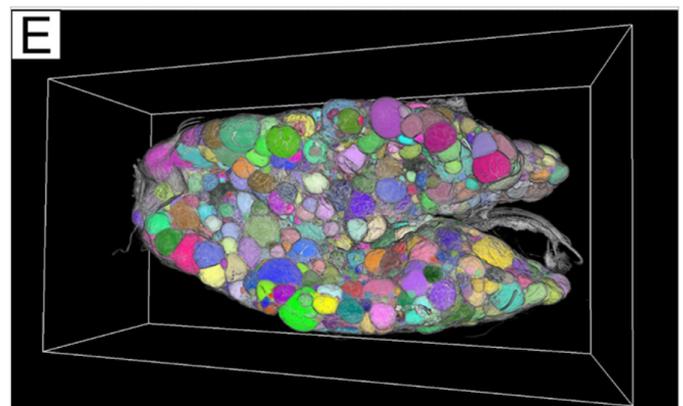


Figure 5 / Reconstruction 3D d'un ovaire de poisson zèbre (imagerie par microscopie confocale) fusionnée avec la détection automatique des ovocytes au sein de l'ovaire (analyse par le pipeline développé dans Lesage *et al.* (2023)).

A partir de l'ensemble de ces données, l'équipe MUSCA (MULTISCALE population dynamics for physiological systems, CNRS-INRAE-INRIA) a proposé un modèle mathématique générique de dynamique de population ovocytaire chez le poisson zèbre simulant une population d'ovocytes structurée en taille (diamètre) au sein de l'ovaire (système d'équations aux dérivées partielles de type transport) et prenant en compte les principales régulations de nature hormonale chez le poisson zèbre (Clément *et al.*, 2024). Ce modèle a démontré sa capacité à reproduire correctement les effectifs et distributions de taille des ovocytes pour quelques poissons zèbres non exposés et exposés à l'IMZ. Ce modèle suggère que la vitesse de croissance des ovocytes en vitellogenèse est significativement plus lente chez les poissons zèbres exposés à l'IMZ, et ainsi, fournit un résultat cohérent avec un effet inhibiteur de l'IMZ sur la synthèse de vitellogénine, en lien avec l'inhibition de l'aromatase.

Cette première tâche qui consistait à développer les modèles composant la qAOP, reliant les concentrations d'exposition à des effets au niveau de la population, a été finalisée par la prédiction des conséquences de la perturbation de l'axe gonadotrope et de l'ovogénèse sur le cycle de vie des individus et la dynamique de population. Cette étape a été réalisée en utilisant un modèle précédemment développé à l'Ineris et dont le comportement en situations écologiques a été évalué et validé (Beaudouin *et al.*, 2015). Afin d'intégrer les effets du PCZ à ce modèle et prédire son impact à long terme sur les populations, les sorties des modèles des niveaux inférieurs ont été intégrées. De plus, en se basant sur la littérature, des effets dose-dépendants additionnels ont été ajoutés sur les paramètres. Plusieurs scénarios d'exposition ont été simulés sur la base de concentrations sélectionnées par l'équipe en charge de la tâche sur l'évaluation du risque (Ineris). Chaque scénario a été simulé pour 300 populations pour estimer la variabilité inter-populations. Dès 24,9 µg/L, le PCZ entraîne une baisse de l'effectif des adultes et des juvéniles au sein d'une population de poissons zèbres et une modification du sex-ratio des populations (Fig. 6). Cependant, lorsque l'exposition cesse, le

modèle prédit une certaine résilience avec une ré-augmentation des effectifs. Il est important de noter que la modélisation des effets (relation doses-réponse) repose essentiellement sur des données mesurées après 21 jours d'exposition. Lors d'une exposition continue plus longue et/ou en présence d'autres facteurs écologiques de stress, une aggravation des effets est probable, pouvant in fine conduire à la disparition des populations (pas de données disponibles pour étendre le domaine d'application du modèle).

La seconde grande tâche du projet était l'application de la qAOP développée dans un contexte réglementaire pour évaluer son apport sur l'évaluation du caractère PE du PCZ. Globalement, les travaux réalisés dans le projet GinFiz, à savoir les expérimentations et leur exploitation dans le cadre de la qAOP, confortent le poids de l'évidence concernant les effets PE du PCZ.

Premièrement, compte tenu de l'ensemble des preuves d'effets disponibles chez le poisson, il est considéré que les impacts sur la stéroïdogénèse sont suffisamment étudiés pour conclure sur cette modalité (composante des modalités EATS, *i.e.*, estrogène, androgène, thyroïde et stéroïdogénèse, qui sont des voies hormonales clés, en particulier pour les PE). La méthodologie d'identification des PE (ECHA/EFSA, 2018) indique qu'un lien biologiquement plausible entre l'impact sur la stéroïdogénèse (mode d'action endocrinien) et l'effet adverse doit être établi. Dans le cas du PCZ, toutes les études disponibles examinant le sex-ratio (effet adverse) ont conclu à un effet positif sur ce paramètre qui est sous contrôle de la stéroïdogénèse. Par conséquent, même si le présent travail ne prend pas en compte l'ensemble des données disponibles (mammifères et amphibiens en plus des poissons), le support empirique des données disponibles sur les poissons est robuste. En d'autres termes, il existe des preuves suffisamment solides pour démontrer, dans un contexte réglementaire la plausibilité biologique du lien entre le mode d'action endocrinien de l'inhibition de l'aromatase gonadique et l'inhibition de la fécondité pouvant conduire à un déclin de la population de pois-

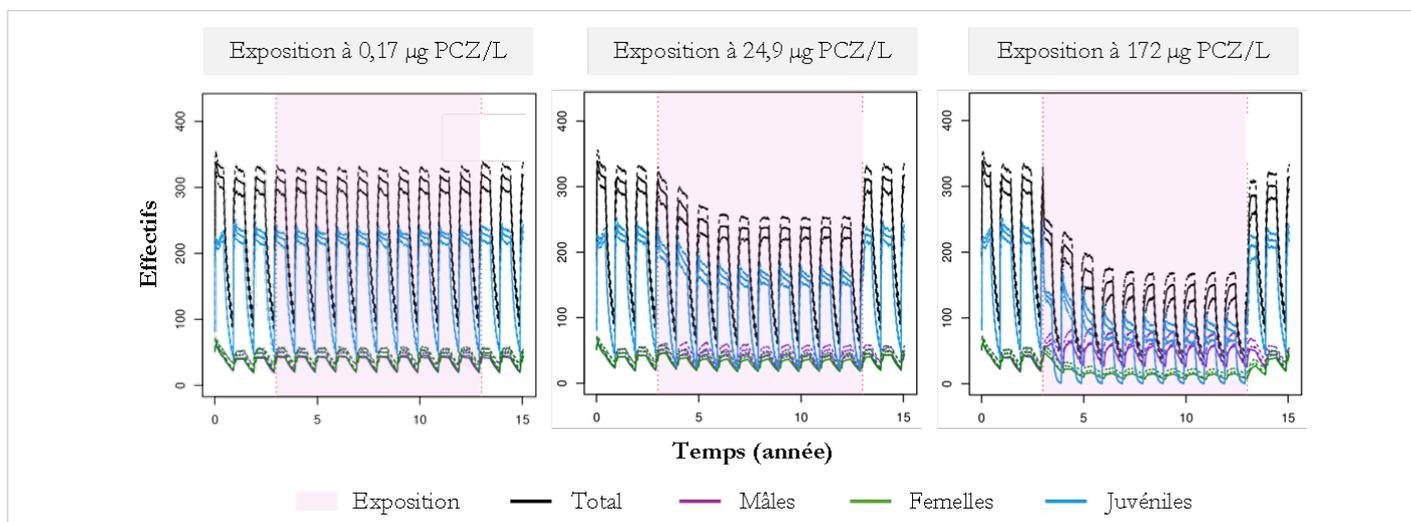


Figure 6 / Effectifs prédits lors d'une exposition de dix ans au PCZ précédée et suivie de trois ans de non-exposition ou récupération. Les intervalles de confiance à 95 % sont matérialisés par les lignes pointillées. Les lignes pointillées verticales rouges correspondent de gauche à droite au début de la période d'exposition et à la fin de l'exposition.

sons (support empirique solide (doses-réponses), effet systématique sur le sex-ratio dans toutes les études sur ce paramètre).

Deuxièmement, pour l'identification des PE agissant sur les écosystèmes, le guide recommande qu'une démonstration soit faite de la répercussion des effets au niveau populationnel. Les modèles développés dans le cadre du projet GinFiz, assemblés dans la qAOP et appliqués au PCZ, remplissent cette fonction. Les travaux réalisés apportent notamment une conclusion fondamentale selon laquelle les effectifs des populations sont susceptibles de s'effondrer à des concentrations d'exposition en deçà des concentrations démontrées comme affectant la fécondité (Fig. 6).

De façon notable, les conclusions apportées sur la base des modèles développés dans le cadre du projet GinFiz, assemblés dans la qAOP et appliqués au PCZ, apportent en outre une preuve supplémentaire à l'identification du fongicide PCZ comme PE pour l'environnement, en démontrant la pertinence des effets au niveau populationnel dans l'approche poids de la preuve que la réglementation des pesticides recommande d'appliquer. Les résultats du projet confirment ainsi la pertinence de l'application des modèles et du développement de qAOPs pour la réglementation PE dans le cas des pesticides. A ce jour, l'utilisation de tels modèles ne se fait pas en routine dans le cadre des dossiers réglementaires d'évaluation des risques car les évaluateurs manquent de modèles standardisés et validés pour leur utilisation en évaluation des risques réglementaire. Les résultats obtenus dans le cadre du projet GinFiz et leur communication doivent permettre d'encourager la standardisation et la

validation de tels modèles pour leur usage en évaluation des risques.

Références bibliographiques

- / Beaudouin, R., Goussen, B., Piccini, B., Augustine, S., Devillers, J., Brion, F., Pery, A.R., 2015. An individual-based model of zebrafish population dynamics accounting for energy dynamics. *PLoS One* 10, e0125841.
- / Clément, F., Fostier, L., Yvinec, R., 2024. Well-posedness and bifurcation analysis of a size-structured population model: Application to female gametes dynamics.
- / Lesage, M., Thomas, M., Pécot, T., Ly, T.K., Hinfray, N., Beaudouin, R., Neumann, M., Lovell-Badge, R., Bugeon, J., Thermes, V., 2023. An end-to-end pipeline based on open source deep learning tools for reliable analysis of complex 3D images of ovaries. *Development* 150, 1185-1185.
- / Ly, T.-K., Chadili, E., Le Menach, K., Budzinski, H., Tebby, C., Hinfray, N., Beaudouin, R., 2025. Integrating the Gonadotropic Axis in a PBK-TD Model: A Case Study on Azole Fungicides. *Aquat Toxicol* Submitted.
- / Ly, T.-K., De Oliveira, J., Chadili, E., Le Menach, K., Budzinski, H., James, A., Hinfray, N., Beaudouin, R., 2024. Imazalil and prochloraz toxicokinetics in fish probed by a physiologically based kinetic (PBK) model. *Environmental Science and Pollution Research* 31, 52758-52773.

¹ European Chemicals Agency

² European Food Safety Authority

³ Projet EST-2016/1/189, <https://www.anses.fr/fr/system/files/APR2016Resume.pdf>