

Modélisation de voies de toxicité (AOP) conduisant à une diminution de la fécondité chez le poisson zèbre : de l'événement initiateur aux impacts sur les populations.

Modelling of the Adverse Outcome Pathway (AOP) leading to fecundity inhibition in zebrafish: from initiating events to population impacts.

## Résumé

La traduction des déficits fonctionnels chez les individus en effets au niveau des populations constitue un enjeu pour l'évaluation des risques environnementaux des PE. La proposition de voies de toxicité (dite AOP) reliant les effets aux différentes échelles d'organisation biologiques et la modélisation multi-échelle supportant la paramétrisation de ces voies de toxicité (AOP quantitative) permettent cette extrapolation des effets. Un des mécanismes d'action de perturbation endocrinienne investigué est la perturbation du cytochrome P450 aromatasase au niveau des gonades en raison de son rôle dans la fonction de reproduction. Les données et les modèles mécanistiques mathématiques d'ores et déjà disponibles à l'INERIS chez le poisson zèbre permettent d'envisager le développement et/ou l'amélioration d'AOP quantitative pour les PE conduisant à une diminution de la fécondité du poisson zèbre, médié par une inhibition de l'aromatase A et/ou d'autres évènements moléculaires initiateurs. L'objectif du projet de thèse vise au développement et à l'amélioration de modèles multi-échelles de voies de toxicité permettant une prédiction précise des impacts pour les populations.

## Abstract

The translation of subtle functional deficits within individuals into population-level effects is identified as a main challenge for the hazard and risk assessment of endocrine disruptor (ED) compounds in fish. Data collected at the different biological levels of organization could be integrated into a pathway-based toxicological framework (AOP) using a modelling approach. This implies establishing and modelling functional and quantitative links between a molecular initiating event and population-level effects, with the final goal of supporting regulatory decision-making regarding EDs. One of the mechanisms of action of endocrine disruption often studied is the disruption of the gonadal cytochrome P450 aromatase because of its involvement in the reproductive process. The experimental data and mechanistic models already available at INERIS for the zebrafish could support the development and/or improvement of quantitative AOP for EDs leading to a decrease in the fecundity, mediated by an inhibition of aromatase A or by other molecular initiating events. The objective of the thesis project will therefore be the development and improvement of multi-scale models of toxicity pathways enabling to more accurate predictions of ED impacts on the populations.

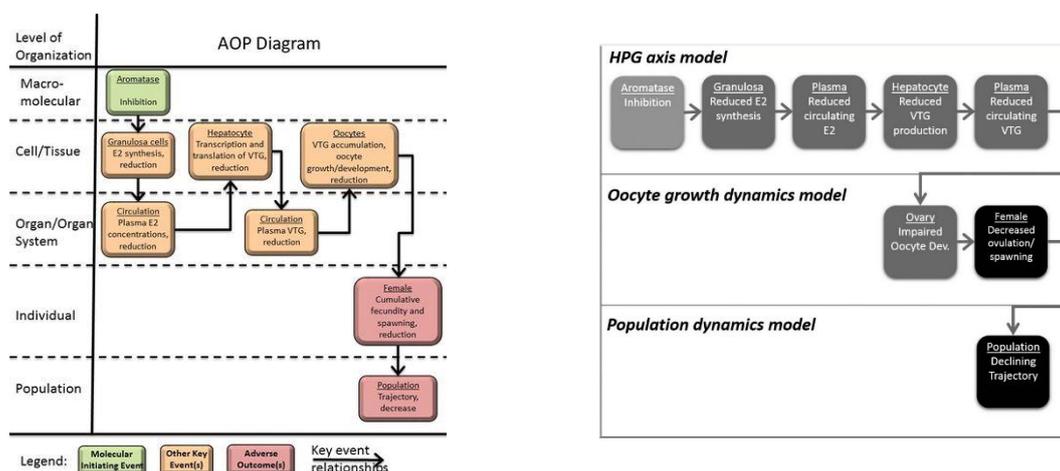
## Descriptif détaillé

Certains composés chimiques possèdent la capacité de perturber le système endocrinien pouvant conduire, par exemple, à des concentrations anormales d'hormones stéroïdes circulantes, entraînant des dysfonctionnements de la reproduction et du développement. Les effets néfastes éventuels sur l'humain et la faune (en particulier les poissons) de ces composés perturbateurs endocriniens (PEs) font l'objet d'une préoccupation croissante. Ainsi, de nouvelles démarches doivent être développées afin de démontrer à la fois un mode d'action de type PE, des effets néfastes à des niveaux d'organisation biologique pertinents pour la gestion du risque et le lien de cause à effets entre les deux. La traduction des déficits fonctionnels chez les individus en effets au niveau des populations constitue donc un enjeu. Cette extrapolation des données de toxicité individuelles, à partir des mesures faites en

laboratoire, à l'échelle des populations pour évaluer les conséquences sur la viabilité des populations (unité biologique que l'on vise à protéger) n'est pas triviale.

Dans ce contexte, la proposition de voies de toxicité (dite AOP) reliant les effets aux différentes échelles d'organisation biologiques et la modélisation multi-échelle 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 effets entre un mode d'action et des effets sur les populations. En effet, les modèles mathématiques sont des outils adaptés pour intégrer différentes échelles biologiques, différents types d'observations et les relations entre ces variables. Ainsi, la modélisation multi-échelle des voies de toxicité vise à développer des outils de modélisation mécanistique ou statistique pour en permettre une utilisation dans un contexte réglementaire. Dans ce but, des modèles mathématiques mécanistiques couvrant les différents niveaux biologiques ont été développés chez le poisson zèbre à l'INERIS : un modèle pharmacocinétique à fondement physiologique (PBPK) générique pour les perturbateurs endocriniens (Pery et al., 2014 ; Grech et al., 2019), un modèle de dynamique des hormones stéroïdiennes (projet PNRPE « MOZAIC ») et un modèle multi-agent pour simuler la dynamique des populations et sa perturbation due à l'exposition aux PE (Beaudouin et al., 2015).

Un des mécanismes d'action de perturbation endocrinienne souvent étudié, en raison de son lien direct avec la reproduction, est la perturbation du cytochrome P450 aromatase au niveau des gonades (Aromatase A, codée par le gène *cyp19a1a*). Les conséquences de l'inhibition de cette aromatase gonadique ont d'ailleurs permis de définir une AOP (Villeneuve, 2016 ; Fig 1). A partir de ces travaux, Conolly et al. (2017) ont proposé une version quantitative de cette AOP (Fig. 1) pour le vairon à tête-de-boule (*Pimephales promelas*) et ont effectué une application sur un fongicide PE, le fadrozole. De plus, les relations quantitatives existantes entre chaque évènement semblent pouvoir être transposées chez d'autres espèces, le poisson zèbre et le medaka (Doering et al., 2019). Cependant, cette première qAOP présente certaines limites : les modèles n'intègrent ni les contraintes écologiques, ni les phénomènes de régulation, et les prédictions des impacts sur les populations peuvent être améliorées.



**Figure 1.** Schéma de l'AOP (à gauche ; Villeneuve, 2016) et de l'AOP quantitatif (à droite ; Conolly et al. 2017) de la perturbation du cytochrome P450 aromatase au niveau des gonades chez le fathead minnows.

En se basant sur cette AOP, des données originales ont déjà été produites chez le poisson zèbre à l'INERIS pour différents PE d'intérêt environnemental : le prochloraz, l'imazalil, le clotrimazole, le gestodène et la noréthindrone (projet ANSES AIDEZ APR EST 2016). En effet, pour ces différentes substances des données de fécondité et/ou de concentrations en E2 et VTG circulantes et d'expression du gène *cyp19a1a* ont été obtenues à l'aide d'une lignée de poissons zèbres transgéniques *cyp19a1a-eGFP*. De plus, certaines molécules testées entraînent des perturbations de la reproduction, en particulier une baisse de la fécondité, qui ne semblent pas être médiées par une perturbation de l'aromatase, mais résulter d'une autre voie de toxicité (voie de signalisation des progestatifs).

Ainsi, les données et les modèles mécanistiques mathématiques d'ores et déjà disponibles au laboratoire chez le poisson zèbre permettent d'envisager le développement et / ou l'amélioration de qAOP pour les PE conduisant à une diminution de la fécondité du poisson zèbre, médié ou non par une inhibition de l'aromatase A.

L'objectif du projet de thèse sera donc le développement et l'amélioration de modèles multi-échelles de voies de toxicité aboutissant à une prédiction précise des impacts pour les populations.

## Méthodologie

L'AOP quantitative développée reposera sur la structure de celle proposée pour le vairon à tête-de-boule (Fig. 1), en y ajoutant des spécificités du poisson zèbre et intégrera les facteurs écologiques (température et disponibilité de la nourriture principalement) et le plus possible les phénomènes de rétrocontrôle entre les événements de l'AOP.

La stratégie de recherche sera articulée autour de quatre grandes étapes : (i) application du modèle PBPK poisson zèbre aux substances étudiées, (ii) perfectionnement du modèle de dynamique des hormones stéroïdiennes (modèle de l'axe HPG), (iii) transcription du modèle de dynamique des ovocytes utilisé par Conolly et al. (2017) au poisson zèbre, (iv) prédiction des impacts sur la dynamique de population.

Pour la première étape, la paramétrisation du modèle PBPK s'appuiera sur les modèles QSARs (Pery et al., 2014) et les prédictions seront évaluées et améliorées en utilisant les données de la littérature et les données de concentrations internes dans le poisson entier et les gonades en cours d'acquisition dans le projet AIDEZ. Le modèle de l'axe HPG de régulation hormonale repose sur le modèle PBPK que nous avons construit pour le poisson zèbre, en particulier s'agissant des paramètres physiologiques (volumes des organes, flux sanguins) (Pery et al., 2014). Pour supporter le perfectionnement du modèle de l'axe HPG des dosages des stéroïdes circulants seront réalisés lors de la thèse en collaboration avec le laboratoire de l'Université de Bordeaux I (UMR CNRS 5805 EPOC). Ces expériences seront supportées par le projet Gin-Fiz (APR PNRPE 12/2020 – 04/2024). Le plan d'expérience sera optimisé en se basant sur la ré-analyse des premières expériences conduites lors du projet MOZAIC (APR PNRPE). Enfin, des données sur différents événements de l'AOP (fécondité des femelles et/ou concentrations en E2 et VTG circulantes ainsi que l'expression du gène *cyp19a1a* dans les gonades) ont été acquises dans le cadre du projet AIDEZ pour différentes substances (prochloraz, imazalil, clotrimazole, gestodène, noéthindrone) et seront complétées lors du projet Gin-Fiz.

La qAOP du poisson zèbre sera réalisée en s'appuyant sur les compétences de l'unité METO (modèle pour l'écotoxicologie et la toxicologie) en modélisation de la toxicocinétique/toxicodynamique. L'unité METO dispose d'outils (logiciel McSim et serveur de calcul) permettant de réaliser le développement de modèles complexes, et peut si nécessaire accéder au supercalculateur du CEA pour les plans de simulations les plus coûteux en temps de calcul.

Les expérimentations in vivo sur le modèle poisson zèbre, seront menées en collaboration avec l'unité d'écotoxicologie in vitro et in vivo de l'INERIS. Cette unité qui appartient à la même direction que l'unité METO, dispose d'infrastructures expérimentales performantes pour permettre l'élevage et l'exposition des poissons zèbres. L'unité a collaboré de manière active avec l'unité METO pour le développement de modèles PBPK et IBM chez cette espèce modèle dans le cadre du projet MOZAIC.

## Résultats attendus et perspectives

Le développement de nouveaux outils tels qu'une qAOP permettra d'explorer différents scénarii d'exposition dans différents milieux ou écosystèmes, et d'intégrer l'ensemble des informations toxicologiques disponibles sur une substance pour prédire à différents niveaux d'organisation biologique les effets. En particulier, la thèse permettra de proposer un modèle de l'axe HPG pour le poisson zèbre mâle et femelle. A terme, le présent projet ambitionne de participer à l'amélioration de la méthodologie de caractérisation des dangers pour l'évaluation des risques, en particulier PE.

Il est prévu l'application de la qAOP sur deux molécules pour lesquelles nous aurions le plus de données disponibles (données propres à l'INERIS et issues de la littérature). En fonction de l'avancé des travaux, un seul cas d'étude pourrait être effectué pour augmenter la faisabilité du projet de thèse en 3 ans.

Ainsi, à la sortie de cette thèse, le jeune chercheur pourra viser une insertion professionnelle vers les métiers de la recherche ou en lien avec la réglementation des substances chimiques (évaluation/gestion des risques).

## Profil

Ecole d'ingénieur ou Master II

- Toxicologie et/ou santé environnement (pharmacien, biologiste)
- Biostatisticien / Biomathématicien avec de bonnes connaissances en physiologie / toxicologie.

Le candidat devra avoir un goût prononcé pour la programmation informatique.

## Laboratoire d'accueil

La thèse se déroulera au sein de l'unité METO (Modèles pour l'Ecotoxicologie et la Toxicologie) de l'INERIS (Verneuil-en-Halatte, à 60 km de Paris Nord) en collaboration avec l'unité ECOT (Ecotoxicologie *in vitro* et *in vivo*).

L'INERIS dispose de l'intégralité des plateformes techniques nécessaires à la réalisation de ce projet de thèse.

## Financement

La thèse est financée sur fonds propres de l'Ineris.

## Modalités de candidature

Pour postuler les candidats doivent envoyer par mail à [remy.beaudouin@ineris.fr](mailto:remy.beaudouin@ineris.fr) et [nathalie.hinfray@ineris.fr](mailto:nathalie.hinfray@ineris.fr) avant le **15 Septembre 2021** :

- un CV
- une lettre de motivation
- au moins une lettre de recommandation de la part d'un responsable de formation ou de précédents encadrants
- un relevé de notes de Master ou équivalent