



HAL
open science

**Méthode alternative à l'expérimentation animale pour
l'identification de substances chimiques altérant le
développement embryonnaire: développement d'un test
de criblage utilisant les embryons de poisson médaka
*Oryzias latipes***

Émilie Barbeau

► **To cite this version:**

Émilie Barbeau. Méthode alternative à l'expérimentation animale pour l'identification de substances chimiques altérant le développement embryonnaire: développement d'un test de criblage utilisant les embryons de poisson médaka *Oryzias latipes*. Embryologie et organogenèse. École pratique des hautes études - EPHE PARIS, 2015. Français. NNT : 2015EPHE3065 . tel-02099676

HAL Id: tel-02099676

<https://theses.hal.science/tel-02099676>

Submitted on 15 Apr 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



École Pratique
des Hautes Études

Mention « Systèmes intégrés, environnement et biodiversité »

École doctorale de l'École Pratique des Hautes Études
Laboratoire de Reproduction et Développement Comparé, EPHE

Méthode alternative à l'expérimentation animale pour l'identification de substances chimiques altérant le développement embryonnaire

Développement d'un test de criblage utilisant les embryons de poisson médaka *Oryzias latipes*

Par **Émilie BARBEAU**

Thèse de doctorat de Chimie, Environnement et Santé

Sous la direction de :

M. Jean-Marie EXBRAYAT, directeur d'études de l'EPHE
Laboratoire de Reproduction et Développement Comparé, EPHE,
10 Place des Archives, 69 288 Lyon Cedex 02

Soutenue le 3 décembre 2015

Devant un jury composé de :

Jérôme CACHOT, Pr des Universités, Univ. Bordeaux
Xavier COUSIN, Chargé de Recherches, IFREMER
Jean-Marie EXBRAYAT, Directeur d'Études, EPHE
Marc LEONARD, Dr Vét, , L'Oréal
Christophe MINIER, Pr des Universités, ONEMA

Président du jury
Rapporteur
Directeur de thèse
Directeur de Département
Rapporteur



Except where otherwise noted, this work is licensed under
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>

À mes enfants, à mon compagnon et à mes parents.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon employeur L'Oréal de m'avoir permis de réaliser cette thèse tout en continuant mes activités d'ingénieur de recherche ainsi que de l'avoir financée. Je remercie Monsieur Marc Léonard, alors responsable de l'Unité d'Écotoxicologie et actuellement directeur du département de Recherche Environnementale, d'avoir appuyé cette demande de thèse, ainsi que Monsieur Jacques Leclaire, alors directeur des Sciences du Vivant de la Recherche Avancée et actuel directeur scientifique international de la Recherche et Innovation, et Monsieur Stéphane Demarquette, directeur des Ressources Humaines, de l'avoir acceptée.

Je remercie également l'École Pratique des Hautes Études de permettre à des salariés de réaliser des thèses de doctorat sur des durées plus longues. Un merci tout particulier au Professeur Jean-Marie Exbrayat, directeur d'Études EPHE, d'être mon directeur de thèse et de s'être battu pour que je puisse finir ma thèse malgré mes deux interruptions d'activité pour mettre au monde mes trois enfants.

J'adresse mes remerciements aux membres de mon jury de thèse. Merci au Professeur Christophe Minier, directeur adjoint, chargé du développement à l'Office National de l'Eau et des Milieux Aquatiques et au Docteur Xavier Cousin, chargé de Recherches à l'Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer, d'avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse et de passer du temps sur mon manuscrit. Merci au Professeur Jérôme Cachot, de l'Unité Mixte de Recherche Environnements et Paléoenvironnements Océaniques et Continentaux, d'avoir bien voulu être examinateur.

Je voudrais exprimer ma reconnaissance envers mes collègues qui m'ont apporté leur appui moral et intellectuel. Un grand merci à Aline Fosse, qui n'est plus là pour lire ces lignes et à Marc Vanpoucke, qui se bat pour retrouver une vie normale, pour leur aide technique et leurs conseils. Un merci particulier à Jean-Charles Chenèble d'avoir été là du début à la fin de ma thèse. Merci à Noémie De Crozé d'être arrivée au bon moment pour la rédaction de ce manuscrit.

Enfin, j'adresse mes plus sincères remerciements à ma famille : mon compagnon, mes enfants et mes parents, ainsi qu'à mes amis, qui m'ont soutenue et encouragée tout au long de la réalisation de ce manuscrit.

Table des matières

TABLE DES MATIÈRES	7
INTRODUCTION	17
PREMIÈRE PARTIE : CONTEXTE	19
Chapitre 1 : Cas emblématiques d'altérations du développement de l'enfant	21
1. <i>Thalidomide</i>	21
1.1. Historique	22
1.1.1. Découverte de la Thalidomide	22
1.1.2. Commercialisation sous différentes appellations de médicament	23
1.1.3. Apparition des effets secondaires chez l'adulte et de malformations congénitales sévères	24
1.2. Particularités de la Thalidomide	24
1.2.1. Syndrome de la Thalidomide	24
1.2.2. Propriétés pharmacologiques	26
1.2.2.1. Formes énantiomères	26
1.2.2.2. Métabolisation	27
1.2.3. Identification ultérieure d'effets tératogènes chez plusieurs espèces	28
1.2.4. Mécanismes d'action supposés	29
1.3. Les enseignements de la Thalidomide	30
1.3.1. Standardisation de l'évaluation de la toxicité chronique	30
1.3.2. Nouveaux usages de la Thalidomide	30
2. <i>Diéthylstilbestrol</i>	31
2.1. Historique de cet actif de médicament	32
2.2. Apparition des effets secondaires	34
2.2.1. Cancers de l'appareil reproducteur féminin	34
2.2.2. Malformations génitales	35
2.2.3. Dysfonctionnement hormonal	36
2.3. Effet transgénérationnel	37
2.4. DES aujourd'hui	39

3. Méthylmercure	39
3.1. Contaminations de la baie de Minamata et de la rivière d'Agano	40
3.2. Contamination de produits alimentaires en Iraq.....	40
3.3. Bioaccumulation dans la chaîne alimentaire.....	41
3.4. Méthylmercure aujourd'hui.....	42
4. DDT	44
4.1. Historique de ce biocide	44
4.2. Particularités du DDT.....	45
4.2.1. Ubiquiste dans l'environnement	45
4.2.2. Tératogène.....	46
4.2.3. Cancérogène.....	47
4.2.4. Perturbateur endocrinien.....	47
Chapitre 2 : Agent tératogène.....	49
1. Tératogénicité et développement embryonnaire.....	49
1.1. Définitions	49
1.2. Embryogenèse humaine	52
1.2.1. Clivage	52
1.2.2. Gastrulation et mise en place des feuillets embryonnaires	53
1.1.1. Organogénèse.....	54
1.3. Stades critiques du développement embryonnaire	55
2. Malformations congénitales	57
2.1. Aléas spontanés et induits de la grossesse.....	57
2.2. Identification des malformations.....	58
2.3. Classification et enregistrement des malformations.....	60
2.4. Fréquence des malformations chez l'Homme.....	62
3. Particularités des agents tératogènes.....	64
3.1. Fenêtre de sensibilité d'exposition	64
3.2. Spécificité vis-à-vis des espèces.....	65
4. Nature des agents tératogènes.....	66
4.1. Biologique	67
4.1.1. Génétique	67
4.1.1.1. Maladies génétiques monofactorielles.....	67
4.1.1.2. Épigénétisme.....	73
4.1.1.3. Hérité multifactorielle	75

4.1.2. Déficiences maternelles	76
4.1.2.1. Acide folique	76
4.1.2.2. Iode	76
4.1.3. Infections.....	76
4.2. Chimique	77
4.2.1. Médicaments	78
4.2.2. Biocides.....	80
4.2.3. Autres contaminants environnementaux.....	81
5. Voies de signalisation et agents tératogènes	82
Chapitre 3 : Évaluation de la tératogénicité	87
1. Réglementation européenne.....	88
1.1. Règlement Registration Evaluation and Assessment of Chemicals (REACH).....	88
1.1.1. Définition réglementaire d'une substance reprotoxique	91
1.1.2. Protection de l'Homme	91
1.1.3. Protection des organismes aquatiques	92
1.1.4. Limitation du nombre de tests sur animaux vertébrés	93
1.2. Règlement Classification, Labelling and Packaging (CLP).....	94
1.2.1. Protection de l'Homme	94
1.2.2. Protection des organismes aquatiques	96
1.3. Existence de discordances possibles entre les différents étiquetages réglementaires.....	97
1.3.1. Différents niveaux de fiabilité dans les notifications CLP	97
1.3.2. Discordance entre les mentions de danger des notifications CLP et celles du dossier REACH.....	98
1.3.3. Discordance entre les mentions de danger des notifications CLP et celles des FDS	99
2. Particularités de l'industrie cosmétique.....	100
2.1. Réglementation des produits cosmétiques	100
2.2. Directive protection des animaux utilisés à des fins scientifiques	101
3. Sources d'informations de données de reprotoxicité.....	101
3.1. Données épidémiologiques.....	102
3.2. Classifications institutionnelles non européennes.....	102
3.2.1. United States Food and Drug Administration (US FDA).....	102
3.2.2. Australian Therapeutic Goods Administration	103
3.3. Bases de données spécifiques à la reprotoxicité.....	104

4. Tests de reprotoxicité.....	107
4.1. Lignes directrices OCDE.....	107
4.1.1. Protection de l'Homme.....	107
4.1.2. Protection des organismes aquatiques.....	109
4.1.2.1. <i>Daphnia magna</i> essai de reproduction (n°211).....	109
4.1.2.2. Poisson, essai de toxicité aux premiers stades de la vie (n°210). ..	109
4.2. Tests prédictifs des effets tératogènes alternatifs à l'expérimentation animale validés par l'EURL-ECVAM.....	110
4.2.1. Test MicroMass (MM).....	112
4.2.2. Test Whole Embryo Culture (WEC).....	113
4.2.3. Embryonic Stem cell Test (EST).....	115
4.3. Programmes de recherche internationaux intégrant des méthodes alternatives à l'expérimentation animale pour l'évaluation de la reprotoxicité.....	117
4.3.1. ReProTect.....	117
4.3.2. ChemScreen.....	118
4.3.3. ToxCast.....	119
5. Besoins de l'industrie cosmétique.....	120
DEUXIÈME PARTIE : RÉSULTATS.....	123
Chapitre 1 : Démarche de sélection des substances et des organismes de référence ..	123
1. Établissement de la liste de substances de référence.....	124
1.1. Méthode de sélection des substances de référence.....	125
1.1.1. Établissement d'un tableau préparatoire de données.....	125
1.1.2. Hydrosolubilité des substances de référence.....	125
1.1.3. Représentation des alertes de tératogénicité.....	126
1.2. Sélection de 34 substances et recherche d'informations complémentaires.....	126
1.3. Détermination d'une liste de substances de référence.....	127
1.3.1. Première catégorie : substances de référence positives possédant au moins une mention de danger de reprotoxicité.....	127
1.3.2. Deuxième catégorie : substances de référence positives possédant des alertes de tératogénicité.....	130
1.3.3. Troisième catégorie : substances de référence négatives sans alerte de tératogénicité.....	131
2. Sélection des organismes modèles.....	133
2.1. Critères de sélection.....	134

2.2.	Comparaison de trois organismes modèles	137
2.2.1.	Présentation générale	137
2.2.2.	Développement embryonnaire	138
2.3.	Limites des tests de tératogénicité utilisant ces organismes.....	142
2.3.1.	Test Zebrafish Embryo Teratogenicity	142
2.3.2.	Tests de tératogénicité utilisant le médaka	143
2.3.3.	Frog Embryo Teratogenesis Assay Xenopus.....	144
Chapitre 2 : Évaluation des tests de tératogénicité utilisant des embryons de poissons et d'amphibien		147
1.	<i>Méthodes</i>	148
1.1.	Hydrosolubilité des substances de référence.....	148
1.2.	Exposition des embryons.....	150
1.3.	Observation de la létalité et des malformations des embryons	151
1.4.	Calculs de la CL50, de la CE50 et de l'Indice Tératogène de chaque substance de référence.....	153
1.5.	Conditions de validité d'un essai.....	154
1.6.	Test de concordance de chaque test de tératogénicité.....	155
2.	<i>Analyse séparée des tests</i>	157
2.1.	Test utilisant les embryons de poisson zèbre	157
2.2.	Test utilisant les embryons de médaka.....	160
2.3.	Test utilisant les embryons de xénope.....	163
2.4.	Comparaison des tests évalués sur des listes différentes de substances de référence	166
3.	<i>Comparaison des performances des tests avec les mêmes substances de référence</i>	167
3.1.	Comparaison avec une substance de référence	167
3.2.	Comparaison des tests utilisant les trois organismes.....	170
3.3.	Comparaison des tests utilisant les embryons de médaka et de xénope.....	174
4.	<i>Étude de la spécificité du test utilisant les embryons de médaka</i>	180
4.1.	Ajout de substances de référence négatives	180
4.2.	Résultats obtenus sur l'ensemble des substances de référence négatives	182
TROISIÈME PARTIE : DISCUSSION		187
Chapitre 1 : Substance de référence tératogène ou non ?.....		188
1.	<i>Prédictivité des tests utilisant des organismes modèles mammifères d'effets tératogènes chez l'Homme</i>	189
2.	<i>Catégorisation des substances composant la liste de références</i>	193

2.1. Critères de classement d'une substance dans la 1 ^{ère} catégorie de références	193
2.2. Critères de classement d'une substance dans la 2 ^{ème} catégorie de références.....	194
2.3. Critères de classement d'une substance dans la 3 ^{ème} catégorie de références négatives.....	196
3. Paramètres modifiant les résultats de tératogénicité	198
3.1. Conditions expérimentales	199
3.2. Choix et mesure des malformations à identifier.....	203
3.3. Méthode d'interprétation des effets tératogènes	212
Chapitre 2 : Caractéristiques du test de tératogénicité utilisant les embryons de poisson médaka	217
1. Test d'écotoxicité aquatique chronique.....	217
2. Test de criblage alternatif à l'expérimentation animale	219
3. Performances du test utilisant les embryons de médaka	222
Chapitre 3 : Perspectives pour le test de tératogénicité utilisant des embryons de médaka	225
1. Quantification et automatisation des mesures d'effet.....	225
2. Liste élargie de substances de référence pour obtenir une meilleure représentativité des agents tératogènes	230
3. Identification de perturbateurs endocriniens de l'axe stéroïde sexuel.....	231
4. Intégration dans une stratégie d'évaluation de la tératogénicité.....	235
CONCLUSION	241
BIBLIOGRAPHIE.....	243
ANNEXES	259
Annexe I : International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 10th Revision (ICD-10) / Congenital malformations, deformations and chromosomal abnormalities (Q00-Q99).....	261
Annexe II : Évolution des différentes malformations de 5 registres français	289
Annexe III : Poster « Benchmarking a routine physiological-based test to screen thyroid disrupting chemicals	293
Annexe IV : Matériel et Méthodes	295
Annexe V : Poster “Development of a predictive assay of developmental toxicity with medaka fish”	303
Annexe VI : Poster “Development of a predictive assay of developmental toxicity with early life stages medaka fish”	305

Annexe VII : Publication “Optimizing fluorescent protein choice for transgenic embryonic medaka models”	307
Annexe VIII : Poster “Optimizing fluorescent protein choice for transgenic embryonic médaka”	313
TABLE DES ILLUSTRATIONS	315
LISTE DES ACRONYMES.....	323

Avertissement

Les points de vue ou opinions exprimés dans ce manuscrit sont uniquement les miens et ne reflètent pas nécessairement ceux de la société L'Oréal.

Introduction

Le moment de la grossesse est un « heureux évènement » mais aussi une source d'inquiétude pour la santé du futur enfant : « Est-ce que le bébé se développe bien ? N'a-t-il pas d'anomalie génétique ? ». La mère se demande souvent ce qu'elle peut manger ou faire sans risque de lui transmettre une maladie, une bactérie ou un virus. Doit-elle manger « bio » pour éviter les résidus de pesticides ? Comment choisir entre l'eau du robinet ou l'eau minérale en bouteille plastique pour éviter les résidus de médicaments et les fameux perturbateurs endocriniens ? Ses produits du quotidien (ménagers, cosmétiques, médicaments, etc...), son environnement (meubles, peinture et sol de la future chambre de bébé, pollution atmosphérique, etc...) sont-ils sûrs pour son enfant ?

Ces sources d'inquiétude semblent justifiées, nous connaissons malheureusement souvent dans notre entourage des cas de fausses couches, d'interruption médicale de grossesse pour cause de malformations sévères, d'enfants mort-nés, de mort subite du nourrisson, de naissances prématurées, et des enfants présentant des malformations physiques plus ou moins sévères, des malformations fonctionnelles comme l'autisme, des maladies génétiques comme la trisomie, ou des malformations multiples comme le polyhandicapé.

Dans ce manuscrit, il est tout d'abord rappelé différents cas emblématiques d'altérations du développement de l'enfant dus à des médicaments ou à des contaminants environnementaux. Ces cas sont dus à des agents tératogènes : agent responsable de l'apparition de malformations chez les enfants exposés pendant leur développement embryo-foetal. A l'heure actuelle, il n'existe pas de liste consensuelle répertoriant les agents tératogènes chez l'Homme. Dans ce document, leurs particularités, leurs origines et leurs modes d'action sont mis en évidence expliquant ainsi les difficultés à les identifier. La réglementation européenne requiert tout de même l'évaluation de la tératogénicité des substances chimiques pour la protection de l'Homme et des organismes aquatiques. Cette

évaluation nécessite de compiler l'ensemble des données disponibles dont celles issues de tests sur rongeurs. Depuis mars 2013, ces derniers tests sont interdits en Europe pour l'évaluation des produits cosmétiques et de leurs constituants. L'industrie cosmétique peut uniquement avoir recours à des tests alternatifs à l'expérimentation animale. Certaines méthodes alternatives à l'expérimentation animale ont été validées par l'EURL-ECVAM. Cependant elles sont reconnues comme peu prédictives des effets tératogènes et souvent peu compatibles avec de l'évaluation à moyen ou haut débit. Les tests alternatifs à l'expérimentation animale ne peuvent pas utiliser les espèces et les stades de développement définis par la directive 2010/63/UE relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques.

Un réel besoin existe pour le développement de méthodes alternatives à l'expérimentation animale pour l'identification de substances altérant le développement embryonnaire. L'objet de cette étude est de créer un test de criblage alternatif à l'expérimentation animale et prédictif d'effets tératogènes chez l'Homme ou chez les organismes de l'environnement. L'utilisation d'un organisme entier aquatique déjà employé dans l'évaluation environnementale pourrait répondre aux besoins de l'industrie cosmétique. Étant donné la complexité du sujet, une démarche de sélection des substances de référence a été établie pour établir une liste de substances de références la plus pertinente possible. De la même manière, les trois organismes compatibles avec les exigences réglementaires pour l'industrie cosmétique ont été sélectionnés à savoir deux espèces de poisson : le poisson zèbre et le médaka et une espèce d'amphibien : le xénope. Les résultats de cette étude sont l'évaluation de ces trois organismes sur les substances de référence et la sélection de l'organisme le plus performant dans ces conditions : le poisson médaka. L'évaluation du médaka est complétée avec d'autres substances de référence négatives pour préciser la spécificité du test utilisant cet organisme pour ne pas faussement éliminer une substance n'ayant pas d'effets tératogènes chez les Mammifères. Enfin la performance et la pertinence seront discutées et les perspectives du test seront exposées.

Première partie : Contexte

La société a été marquée par les milliers d'enfants victimes de la Thalidomide, mais aussi d'un autre médicament le Diéthylstilbestrol ayant entraîné des malformations sur plusieurs générations. D'autres cas de malformations ont été liés à des contaminations environnementales accidentelles comme dans le cas de Minamata avec un métal lourd (mercure) ou à des expositions volontaires comme dans le cas du pesticide DDT. Dans ces derniers cas, la faune sauvage est également impactée pouvant parfois aller jusqu'à mettre en péril la survie d'espèces d'oiseaux par exemple.

Ces cas emblématiques d'altération du développement de l'enfant ont participé à l'amélioration de la connaissance des agents tératogènes (substances entraînant des malformations congénitales) mais également de l'embryogénèse humaine. Les sources d'exposition aux agents tératogènes s'avèrent multiples : physiques, biologiques et chimiques. Leurs mécanismes d'action sont variés et parfois mal connus.

Ces incidents ont conduit à l'actuelle démarche réglementaire d'évaluation de la tératogénicité des substances chimiques. La réglementation européenne prévoit ainsi l'évaluation systématique de la reprotoxicité (toxicité de la reproduction dont fait partie la tératogénicité) des substances chimiques en fonction de leur tonnage prévu sur le marché. Elle est destinée à préserver la santé des consommateurs et des travailleurs mais aussi de l'environnement et des espèces sauvages, potentiellement exposées à la substance. Cette évaluation de la reprotoxicité repose sur la collecte et l'analyse des données disponibles mais aussi sur la réalisation de tests *in vivo* sur animaux de laboratoire. L'industrie cosmétique procède aussi à cette évaluation mais en Europe, il lui est interdit depuis 2013 de recourir à des tests sur animaux de laboratoire. Certaines méthodes, alternatives à ces tests sur animaux de laboratoire, ont été développées en partenariat avec les autorités européennes. Cependant, ces méthodes ne répondent pas aux besoins de criblage de l'industrie cosmétique notamment en raison de leur manque de spécificité. En effet, ce manque de spécificité implique que des substances sont incorrectement identifiées comme ayant des effets tératogènes.

L'objet de cette thèse est de développer une méthode alternative à l'expérimentation animale pour la détection spécifique d'agents tératogènes en utilisant un organisme modèle déjà utilisé en évaluation environnementale.

Chapitre 1 : Cas emblématiques d'altérations du développement de l'enfant

Les esprits ont été marqués par le cas de l'exposition *in utero* (pendant la vie embryon-fœtale) aux médicaments contenant de la Thalidomide : dans les années 50, des milliers d'enfants sont nés à travers le monde avec des malformations très sévères notamment des membres. Ce cas a profondément modifié la toxicologie et tout particulièrement l'évaluation de la reprotoxicité en montrant que le placenta ne fait pas barrière contre tous les médicaments. Un deuxième cas emblématique de médicament des années 40 est celui du Diéthylstilbestrol (DES) : c'est seulement dans les années 70 que des malformations essentiellement génitales ont été identifiées chez les adultes exposés *in utero* au DES. Ces malformations ont été transmises à la génération suivante et identifiées dans les années 2000. Le DES a ainsi mis en évidence des effets transgénérationnels. Dans les années 50 au Japon, les cas de contaminations environnementales accidentelles au méthylmercure des eaux de surface et des baies ont alerté sur le phénomène de bioaccumulation de polluants environnementaux dans l'alimentation. La consommation de poissons ayant bioaccumulé du méthylmercure par des femmes enceintes a entraîné des malformations chez leurs enfants. Un autre cas de contamination environnementale cette fois volontaire et mondiale est celui de l'insecticide DDT. À partir de la seconde guerre mondiale, il fut notamment utilisé pour faciliter l'avancée des troupes en traitant les zones insalubres au DDT. Son caractère très persistant et très bioaccumulable dans l'environnement a été mis en évidence au point d'être présent dans les fluides humains de la population mondiale actuelle malgré son interdiction d'utilisation depuis le début des années 70. Il a ainsi entraîné des malformations génitales chez les enfants exposés *in utero*. Cette contamination a également un impact direct sur la survie de nombreuses espèces sauvages dont des oiseaux piscivores.

1. Thalidomide

Dans les années 50, la Thalidomide a été synthétisée à une époque où l'on pensait que le placenta protégeait l'enfant *in utero* de toutes agressions extérieures. Les études toxicologiques de cette période ne testaient les effets *in utero* que si la substance à tester

était susceptible d'agir sur les organes reproducteurs. Les études toxicologiques ont mis en évidence plusieurs effets particulièrement recherchés à ce moment-là comme un effet sédatif. En 1957, s'en est suivi une large campagne publicitaire vantant son utilisation sans danger. La Thalidomide fut déclinée dans plusieurs médicaments à travers le monde. Elle fut même distribuée gratuitement par les médecins aux femmes enceintes pour traiter leurs nausées, dont les effets étaient diminués grâce aux propriétés sédatives de la Thalidomide.

Moins d'un an plus tard, les premiers enfants malformés naquirent avec des malformations structurelles sévères notamment des membres. Le lien entre ces malformations et la Thalidomide ne sera fait qu'en 1961. L'interdiction mondiale de son utilisation n'interviendra qu'en 1962. Des milliers d'enfants exposés *in utero* présentèrent des malformations multiples touchant préférentiellement les membres mais également des malformations du visage, des organes reproducteurs et vitaux. C'est le Syndrome de la Thalidomide.

La Thalidomide fut ensuite activement étudiée. Ces études démontrèrent sa capacité à traverser la barrière placentaire, à n'agir que sur certaines espèces et pendant une fenêtre particulière de la vie embryo-fœtale. La mise en évidence de ces particularités ont conduit à la mise en place de l'évaluation réglementaire systématique de la reprotoxicité des médicaments mais aussi des substances chimiques. Après des dizaines d'années de non usage, la Thalidomide est à nouveau indiquée pour traiter la lèpre mais aussi certains cancers et les symptômes du SIDA.

1.1. Historique

1.1.1. Découverte de la Thalidomide

La Thalidomide a d'abord été synthétisée au début des années 50 en Allemagne de l'Ouest comme anticonvulsivant, antispasmodique et anesthésique local.

En 1954, la société allemande Chemie Grünenthal a obtenu le brevet de la molécule. Les substances pharmaceutiques étaient évaluées par les industries pharmaceutiques selon leur besoin. La Thalidomide a été évaluée selon les tests standards de l'époque à savoir des tests de toxicité chronique sur plusieurs espèces. Les premiers essais cliniques effectués en 1956 chez l'homme n'ont pas été concluants pour ses usages supposés mais des propriétés sédatives furent mises en évidence comparables à celles des barbituriques mais sans conséquences mortelles en cas de surdosage (Vargesson 2015) (Chung et al. 2004). À cette époque, un test multi-génération sur rats a alors été conduit et les critères d'évaluation

portaient principalement sur ces organes reproducteurs et l'incidence de mortalité pour la conception, sans rechercher des malformations chez la progéniture (Stadler 2011).

Le 10 juillet 1956 le Département de la Santé du Ministère de l'Intérieur du Land de Rhénanie-du-Nord - Westphalie donna son autorisation à la commercialisation de la Thalidomide.

1.1.2. Commercialisation sous différentes appellations de médicament

À partir du 1^{er} octobre 1957, Grünenthal commercialisa d'abord en Allemagne la Thalidomide. Celle-ci était accessible sans prescription (donc sans suivi possible), sous l'appellation Contergan en tant qu'hypnotique. Comme pour les autres appellations de médicament contenant également de la Thalidomide, le nom de la molécule n'apparaissait pas sur l'emballage.

En 1958, Grünenthal lança une campagne publicitaire massive. Des échantillons gratuits furent même distribués par les médecins aux femmes enceintes souffrant de nausées matinales. En octobre 1961, Distillers, une société anglaise fera à son tour activement savoir que le Distaval (Figure 1) pouvait sans aucun danger être prescrit à l'ensemble de la population : enfants et adultes (Vargesson 2015).



Figure 1 : Thalidomide vendu sous le nom de Distaval avec mention de ses bienfaits

Source : Vargesson 2015

Au total, la Thalidomide sera commercialisée dans 46 pays à travers plus de 68 marques différentes pour divers usages : Asmaval contre l'asthme, Tensival contre l'hypertension, Valgraine contre la migraine, etc. (Smithells & Newman 1992). La Thalidomide fut alors un grand succès commercial en devenant l'un des médicaments les plus vendus au monde (Vargesson 2015).

Cette distribution large et sans suivi de la Thalidomide rend difficile la détermination du nombre de femmes enceintes exposées.

1.1.3. Apparition des effets secondaires chez l'adulte et de malformations congénitales sévères

Les médecins allemands vont rapporter des cas de neuropathies périphériques non réversibles chez les patients traités à la Thalidomide. Sur la base de ces informations (et non d'effets reprotoxiques), l'United States Food and Drug Administration (US FDA) et la France n'ont pas donné leur approbation pour l'usage de la Thalidomide sur leurs territoires (Kim & Scialli 2011).

En octobre 1960, lors d'un congrès de médecine, deux cas d'enfants avec des malformations des membres plutôt inhabituelles ont été présentés (Figure 2).



Figure 2 : Enfants exposés à la Thalidomide souffrant de phocomélie
Source : Toxipedia

C'est seulement un an après que le lien avec la prise de la Thalidomide sera fait indépendamment par le docteur McBride en Australie et par le docteur Lenz en Allemagne. La Thalidomide a alors été retirée du marché allemand fin 1961 puis des autres pays jusqu'à fin 1962 (Stephens 2009).

1.2. Particularités de la Thalidomide

1.2.1. Syndrome de la Thalidomide

Les malformations présentes chez les enfants exposés *in utero* à la Thalidomide sont tellement variées que l'on parle de Syndrome de la Thalidomide ou encore d'Embryopathie de la Thalidomide. Chacune de ces malformations peuvent être retrouvées chez l'Homme mais elles sont rarement associées (Smithells & Newman 1992).

Les malformations les plus répandues (Tableau 1 et Figure 3) affectent :

- Le squelette et plus précisément les membres : phocomélie (atrophie du membre) voire amélie (absence de membres). Les bras sont plus communément affectés que les jambes. Ces anomalies sont souvent accompagnés de syndactylie (accolement et fusion plus ou moins complète de deux ou plusieurs doigts ou orteils entre eux) ou de polydactylie (doigts ou orteils surnuméraires) ;
- La face (hémangiome, asymétrie, fente labiale, fente palatine), les yeux (microphthalmie, anophthalmie, absence de larmes), les oreilles (microtie, anotie, surdité), les dents (modification de leur nombre et de leur espacement) ;
- Les organes génitaux : absence de testicules, *hypospadias* (ouverture de l'urètre sur la face inférieure du pénis au lieu de son extrémité), malformation de l'utérus ;
- Les organes internes : cœur, reins et système digestif (Smithells & Newman 1992) (Vargesson 2015) (Gilbert-Barness 2010).

Tableau 1 : Malformations liées à l'exposition à la Thalidomide

Source : Gilbert-Barness 2010

Skeletal defects	
Absent radii	
Hand	Limited extension, club hand, hypoplastic or fused phalanges, finger syndactyly, carpal hypoplasia or fusion, radial deviation
Ulna	Short and malformed, unilaterally or bilaterally absent
Humerus	Hypoplastic, absent
Shoulder girdle	Abnormally formed with absent glenoid, fossa and acromion process, hypoplastic scapula and clavicle
Hips	Unilaterally or bilaterally dislocated
Legs	Coxa valga, femoral torsion, tibial torsion, bilateral or unilateral stiff knee, abnormal tibiofibular joint, dislocated patella(e)
Feet	Overriding fifth toe, calcaneovalgus deformity
Ribs	Asymmetric first rib, cervical rib
Spine	Cervical spina bifida, fused cervical spine
Mandibular hypoplasia	
Maxillary hypoplasia	
Cardiac anomalies	Tetralogy of Fallot, atrial septal defect, patent foramen ovale, dextrocardia, congestive heart failure leading to death Systolic murmur, cardiomegaly Suspected congenital heart disease
Other abnormalities	Apparently low-set ears, malformations extending to microtia Urogenital anomalies Micrognathia Meckel diverticulum Uterine anomalies

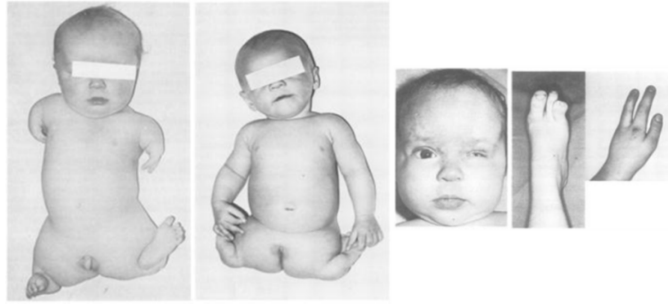


Figure 3 : Exemple de nouveau-nés atteints de Syndrome de la Thalidomide

Source : Smithells & Newman 1992

D'autres malformations fonctionnelles ont également été listées comme l'autisme et des retards mentaux (Miller & Strömmland 2011). Celles-ci ne sont pas toujours accompagnées de malformations structurelles (Kim & Scialli 2011).

La mortalité infantile des enfants nés avec le Syndrome de la Thalidomide était de 40%. Ce fort pourcentage est essentiellement dû à des malformations internes touchant des organes vitaux. Les enfants survivants atteints du Syndrome présentent donc majoritairement des malformations externes (Smithells & Newman 1992).

Les personnes atteintes du Syndrome de la Thalidomide subissent également des désagréments liés à l'âge de manière plus précoce (ostéoarthrite, maladie coronaire, etc ...) (Vargesson 2015).

Le nombre exact d'enfants exposés *in utero* ne peut être connu du fait du nombre élevé de médicaments sans prescription contenant la Thalidomide sans que cela soit explicitement indiqué sur l'emballage. Il est très probable que le taux de fausses-couches et d'enfants mort-nés ait également augmenté pendant la période d'usage de la Thalidomide (Stephens 2009) (Vargesson 2015).

Dans le monde pendant cinq années, 12 000 enfants exposés *in utero* à la Thalidomide sont nés handicapés (Vargesson 2015).

1.2.2. Propriétés pharmacologiques

La Thalidomide a montré ses capacités à passer la barrière placentaire, atteindre l'enfant *in utero* et ainsi provoquer des malformations. D'autres particularités de la Thalidomide ont été mises en évidence comme la différence d'action de ses deux formes d'énantiomères et la grande variété de ses métabolites, qui est spécifique à chaque espèce.

1.2.2.1. Formes énantiomères

La Thalidomide existe sous forme de deux énantiomères (molécules stéréoisomères images l'une de l'autre dans un miroir) avec un carbone asymétrique identifié par un

astérisque dans la Figure 4. L'isomère R+ (rotation horaire de la molécule autour du carbone asymétrique) de la thalidomide a une structure similaire à certains psychotropes et des propriétés anti-inflammatoires. C'est cette forme qui a été évaluée lors des tests toxicologiques. À l'époque, la communauté scientifique pensait qu'un seul des isomères était actif et que l'autre n'avait aucune propriété biologique. Pour des raisons économiques et de facilité, les médicaments étaient synthétisés sous forme racémique (mélange d'isomères). L'isomère S- avec une rotation antihoraire de la molécule autour du carbone asymétrique s'est avéré entraîner le Syndrome de la Thalidomide.

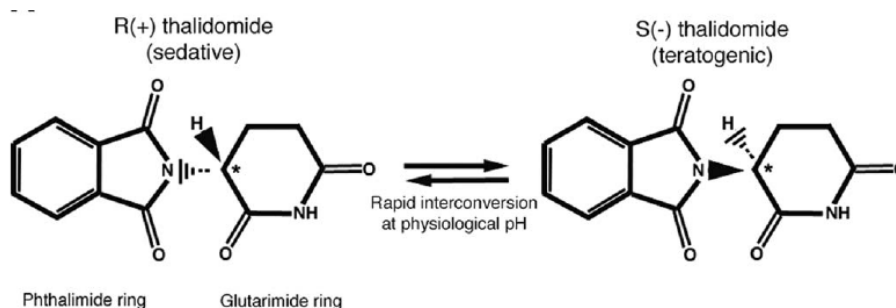


Figure 4 : Formules développées de la Thalidomide

Source : Vargesson 2015

Dans le cas de la Thalidomide, les deux formes d'isomère sont rapidement hydrolysées en l'autre forme dans les conditions physiologiques : même si la Thalidomide avait été vendue uniquement sous l'isomère R+, l'isomère S- aurait été présent dans les tissus et aurait entraîné le Syndrome de la Thalidomide (Vargesson 2015).

1.2.2.2. Métabolisation

La Thalidomide est une molécule très complexe nécessitant une métabolisation pour agir et former plus de 100 sous-produits possibles. Les fonctions majeures de ces sous-produits sont anti-inflammatoires ou antiangiogéniques (Lepper et al. 2006).

Suivant les espèces, des différences considérables ont été observées dans la production de métabolites hydroxylés. Chung (2004) a étudié les capacités métaboliques de patients atteints de myélomes multiples traités avec la Thalidomide et les a comparés à d'autres espèces. L'hydroxylation de la Thalidomide n'est pas détectable chez ces patients alors qu'elle est intensive chez la souris et modérée chez le lapin. Les métabolites hydroxylés et glucuronidés sont beaucoup plus solubles que la molécule mère, ce qui facilite leur élimination par l'organisme. En conséquence, plus le taux de métabolisation de la Thalidomide est important, plus son élimination hors de l'organisme est facilitée. Une production 20 fois plus élevée a été trouvée dans les microsomes du foie de la souris comparés à ceux humains. Les rongeurs auraient donc de meilleures capacités de

détoxification de la Thalidomide que l'Homme. Ceci pourrait en partie expliquer pourquoi la Thalidomide n'est pas tératogène chez cette espèce (Figure 5) (Chung et al. 2004).

Les différences de capacité métabolique des espèces ainsi que la diversité des métabolites pourraient partiellement expliquer la gamme et la diversité des dommages provoqués par la Thalidomide (Vargesson 2015; Lepper et al. 2006). Par exemple, une étude suggère que les effets anti-angiogénique et tératogénique de la Thalidomide sont causés par des métabolites stables (Bauer et al. 1998).

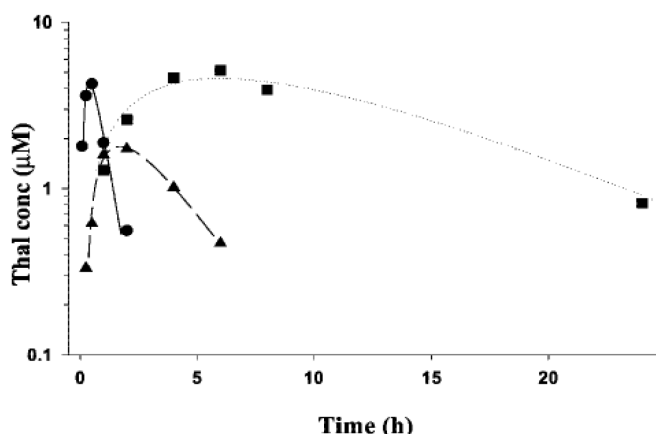


Figure 5 : Comparaison de la pharmacocinétique de la Thalidomide chez la souris, le lapin et chez des patients atteints de myélome multiple

● : 2mg/kg chez la souris ; ▲ : 2mg/kg chez le lapin ; ■ : 200mg chez des patients atteints de myélome multiple, données combinées de 5 individus

Source : Chung et al. 2004

1.2.3. Identification ultérieure d'effets tératogènes chez plusieurs espèces

Afin de comprendre pourquoi les effets toxiques de la Thalidomide n'avaient pas été détectés, d'autres études spécifiques à l'évaluation de la toxicité sur la progéniture ont été poursuivies sur d'autres espèces.

En 1962, la Thalidomide s'est avérée induire des malformations des membres chez le lapin et en 1964, chez le singe (Stephens 2009). Les effets observés chez d'autres espèces de rongeurs, de primates mais aussi de porcs ne furent pas toujours reproductibles (Ito et al. 2011) (Bauer et al. 1998; Stephens 2009). Par exemple, dans le cas des primates non humains, une étude a montré une atteinte des quatre membres, une autre seulement d'un membre et une autre juste une anomalie de la queue (Vargesson 2015).

Seuls l'Homme, certains primates (ouistiti commun et macaque rhésus) et le lapin sont largement reconnus comme sensibles à la Thalidomide (Stephens 2009; Delahunt & Lassen 1964). Les rongeurs, modèles classiques en toxicologie ne permettent pas de détecter les effets toxiques de la Thalidomide.

1.2.4. Mécanismes d'action supposés

Le ou les mécanisme(s) par lesquels la Thalidomide produit des malformations congénitales chez l'Homme, les primates et les lapins ne sont pas encore totalement élucidé(s) et beaucoup d'études sont encore en cours.

En 50 ans, plus de 30 hypothèses différentes ont été proposées. Parmi elles, la Thalidomide aurait un effet mutagène sur l'ADN, perturberait la chondrogenèse (formation du cartilage), l'adhésion cellulaire (essentielle lors du développement embryonnaire) et le développement de la crête neurale (population de cellules multipotentes entre autres à l'origine du système nerveux périphérique ainsi que les os et les cartilages de la face).

Il est vraisemblable que plusieurs modes d'action combinés soient à l'origine du Syndrome de la Thalidomide. Parmi les différentes hypothèses, Vargesson propose une combinaison d'évènements (Figure 6) : la Thalidomide, métabolisée ou non, se fixerait sur des cibles moléculaires (Cereblon, tubuline...), ce qui inhiberait la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. Cet effet anti-angiogénique aboutirait à un phénomène de mort cellulaire par manque d'oxygénation. De plus, ce stress oxydatif entraînerait la formation de dérivés réactifs d'oxygène (ROS). Selon cette hypothèse, l'ensemble de ces mécanismes serait à l'origine des malformations congénitales du Syndrome de la Thalidomide (Vargesson 2015).

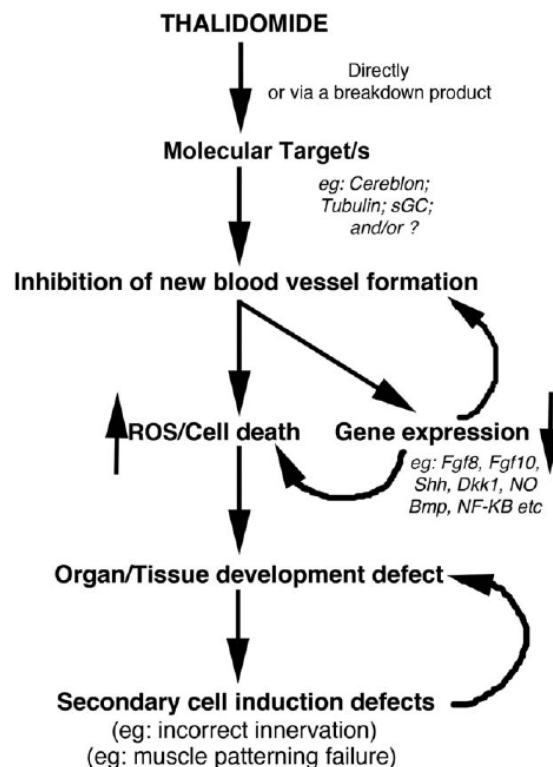


Figure 6 : Mécanismes d'action possibles de la Thalidomide

Source : Vargesson 2015

Malgré la multitude des hypothèses, les modes d'action de la tératogénicité de la Thalidomide ne sont pas clairement identifiés. Par exemple, en 2013, une étude d'un analogue de la Thalidomide, la pomalidomide présentant un pouvoir anti-angiogénique et immunomodulateur plus puissant, a montré que cet analogue est également un inhibiteur plus puissant du Cereblon que la Thalidomide sans pour autant être tératogène (Lopez-Girona et al. 2012) (Mahony et al. 2013). Cet élément est en contradiction avec l'hypothèse de Vargesson décrite ci-dessus.

1.3. Les enseignements de la Thalidomide

Ces différents enseignements ont permis la standardisation de l'évaluation de la toxicité chronique mais aussi une meilleure connaissance des propriétés de la Thalidomide pour lui trouver de nouveaux usages.

1.3.1. Standardisation de l'évaluation de la toxicité chronique

Le cas de la Thalidomide a mis en lumière l'importance d'une évaluation rigoureuse et pertinente des médicaments avant leur mise sur le marché.

Dès 1966, l'US FDA a mis en place une stratégie d'évaluation systématique de la reprotoxicité en intégrant l'évaluation des malformations induites chez la descendance avec des protocoles séparés en 3 segments (Kim & Scialli 2011) :

- Segment I : fertilité et reproduction générale ;
- Segment II : tératogénicité ;
- Segment III : périnatalité.

Ce découpage a été repris par l'International Conference on Harmonisation (ICH) et l'Organisation de Coopération et de Développement Économique (OCDE).

Des protocoles détaillés ont alors été mis en point. Les médicaments doivent être maintenant testés sur deux espèces dont une non-rongeur (le lapin est souvent choisi comme seconde espèce) (Vargesson 2015). Tous les stéréoisomères pouvant être générés par le médicament originel doivent être également testés.

1.3.2. Nouveaux usages de la Thalidomide

Malgré l'interdiction de la Thalidomide en 1961 et les recommandations de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), la Thalidomide est encore utilisée contre la lèpre dans certains pays africains ainsi qu'au Brésil (Kim & Scialli 2011) (Vianna et al. 2015; Kowalski et al. 2015). Dans les zones rurales de ces pays, la Thalidomide est

prescrite à des patients qui eux-mêmes la partagent avec d'autres, qui ne comprennent pas ou ne sont pas informés du danger pour les femmes enceintes. Chaque année, de nouveaux cas de Syndrome de la Thalidomide apparaissent.

Au milieu des années 90, la Thalidomide a de nouveau reçu une approbation de mise sur le marché en Europe et en Amérique du Sud et du Nord sous des conditions très strictes avec notamment une obligation pour les femmes en âge de procréer d'avoir recours à un contraceptif hormonal.

La Thalidomide est actuellement utilisée comme thérapie dans une variété de maladies comme la lèpre, le SIDA, l'ulcère de l'œsophage, le cancer, l'arthrite, la tuberculose et la maladie de Crohn (Hansen & Harris 2004).

Des analogues à la Thalidomide sont activement recherchés. Pour y parvenir, les mécanismes d'action de la Thalidomide doivent être mieux connus afin de synthétiser des analogues conservant ses bénéfiques thérapeutiques sans son pouvoir tératogène.

Les effets de la Thalidomide ont permis d'augmenter la connaissance en toxicologie. Pour la première fois, il y a eu des évidences montrant qu'un médicament peut passer la barrière placentaire et avoir des effets néfastes sur l'enfant à naître. Il peut également induire un spectre large d'anomalies allant de la malformation structurelle sévère en passant par des malformations des organes jusqu'à des malformations fonctionnelles du système nerveux. Par ailleurs, deux isomères peuvent avoir des activités biologiques très différentes. La métabolisation d'un médicament peut être complexe et variée selon les espèces. Enfin, le rongeur n'est pas toujours le meilleur modèle pour prédire un effet chez l'Homme.

A la même période de l'histoire, un autre cas emblématique de médicament a entraîné des altérations du développement mais avec des malformations congénitales différentes de celles de la Thalidomide et selon d'autres modes d'action. Il s'agit du Diéthylstilbestrol.

2. Diéthylstilbestrol

Le Diéthylstilbestrol (DES) a été commercialisé et consommé avant la Thalidomide dans les années 40. Cependant les effets malformatifs et cancérigènes du DES n'ont été visibles que dans les années 70. En effet, les enfants exposés *in utero*, une fois adultes, ont

présenté des malformations essentiellement génitales les rendant stériles et des cancers de l'appareil reproducteur. Dans les années 2000, il a été établi que ces malformations ont été transmises à la génération suivante sans que cette dernière ait été exposée directement. Le DES a ainsi mis en évidence des effets transgénérationnels dus à la prise d'un médicament.

2.1. Historique de cet actif de médicament

Synthétisé au Royaume-Uni en 1938, le Diéthylstilbestrol (DES) est un estrogène de synthèse non stéroïdien (Figure 7). Il fut d'abord commercialisé en tant que médicament sous le nom de Stilbestrol-Borne, puis dans d'autres pays (dont la France) sous le nom de Distilbène. Selon la même démarche que celle de la Thalidomide mais une quinzaine d'années plus tôt, le DES a également été prescrit pour éviter des avortements spontanés à répétition ou des accouchements prématurés (Harris & Waring 2012). Le DES a été encore plus largement commercialisé que la Thalidomide avec plus de 200 médicaments différents en contenant (Tournaire et al. 2014).

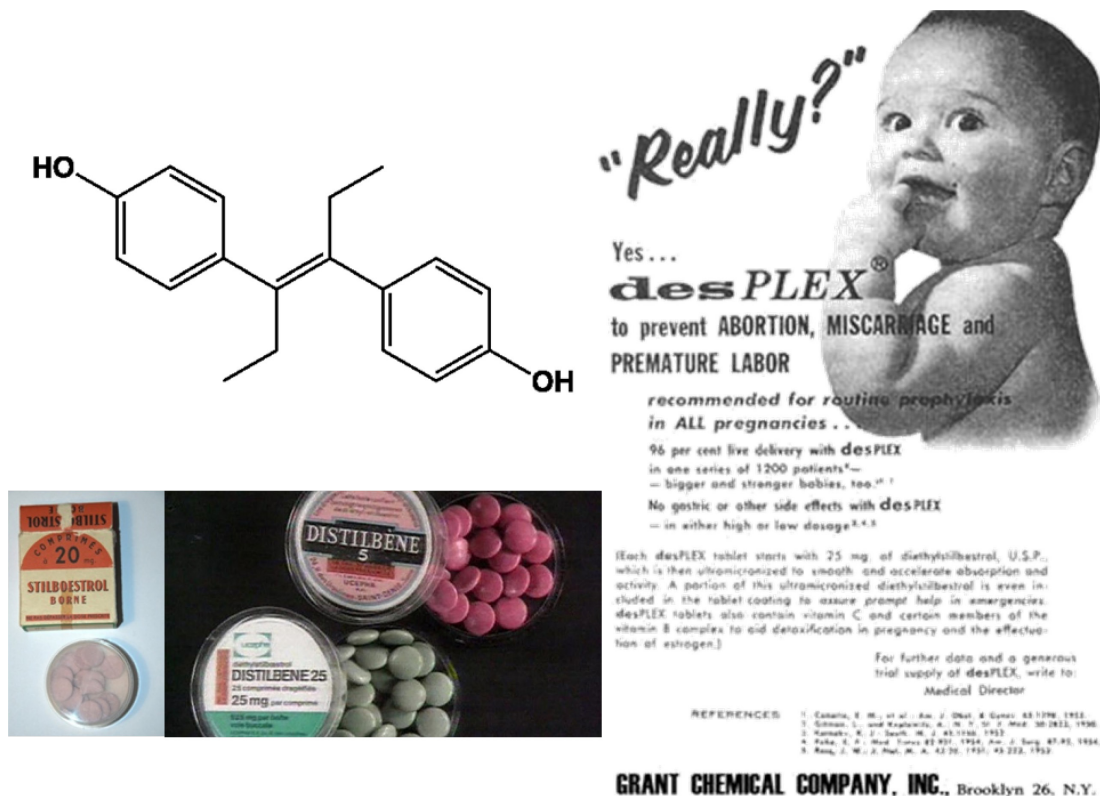


Figure 7 : Formule développée du DES, le Distilbène et la campagne publicitaire du desPLEX pour prévenir notamment des fausses-couches

Source : *DES Daughter / Flickr, DES France*

Dès 1938, une première étude montra une augmentation de l'incidence de cancers mammaires chez des souris mâles adultes après administration de DES (Lacassagne 1938).

Cette incidence fut imputée à l'espèce de souris utilisée dans cette étude sans que cela ne constitue une réelle alerte à ce moment-là.

En 1946, une autre étude sur le rongeur montra que le DES stimule la sécrétion d'œstrogènes et surtout de progestérone par le placenta. Ceci permit d'ajouter l'indication de prévention des avortements spontanés mais aussi des accouchements prématurés, de la pré-éclampsie et des morts *in utero* (Smith et al. 1946).

L'année suivante, l'US FDA autorisa le DES comme traitement contre les menaces d'avortement, les avortements à répétition, la montée de lait, les symptômes de la ménopause et les hémorragies de la grossesse (AFSSAPS 2011). En France, le DES a également été utilisé entre 1950 et 1977 pour prévenir les avortements spontanés, les hémorragies de la grossesse, mais aussi la pré-éclampsie (hypertension artérielle de la grossesse) et le diabète gestationnel (Tournaire et al. 2014; MISSING:AFSSAPS2004DES 2016) (Harris & Waring 2012).

Le DES aurait été prescrit à environ 5 millions de femmes enceintes essentiellement aux USA et d'une manière plus modérée en Europe (Stadler 2011) (Harris & Waring 2012). Les prescriptions ont été faites sur des années différentes en fonction des pays (Tableau 2) (Tournaire et al. 2014) :

Tableau 2 : Traitements par DES en Europe et aux États-Unis

Source : Tournaire et al. 2014

Pays	Période de prescription	Nombre de grossesses
Allemagne	-1977	200 000
Belgique	1950-1965	
Espagne	1953-1977(1983 ?)	25 000
France	1950-1977	200 000
Grande-Bretagne	1940-1971(1973 ?)	7 000 - 8 000
Irlande	1950-1975	
Italie	-1960	
Norvège	1948-1972	
Pays-Bas	1947-1975	189 000 - 378 000
Portugal	1960-1970	
Tchécoslovaquie	1958-1976	63 000
USA	1943-1971	4 millions (2-6)

Par ailleurs, le DES a également été utilisé comme hormone de croissance pour le bétail (vaches, moutons et volailles) entre 1954 et 1979 pour les faire grossir et obtenir une viande maigre (Harris & Waring 2012). Aucun lien n'a été fait entre la consommation de la viande issue des bêtes traitées au DES et l'apparition d'effets caractéristiques du DES chez l'Homme.

2.2. Apparition des effets secondaires

Dès les années 70, le premier effet secondaire du DES fut observé chez les filles exposées *in utero* (« filles DES »). Il s'agissait de l'apparition de cancers rares du col de l'utérus ou du vagin chez des adolescentes. Les autres effets secondaires ont ensuite été observés à partir des années 80 lorsque les « filles DES » ont eu des difficultés à avoir des enfants : certaines présentaient des malformations de l'appareil génital rendant impossible une grossesse. D'autres présentaient un dysfonctionnement hormonal altérant leur fertilité. Dans un troisième temps, les effets sur les garçons exposés *in utero* (« garçons DES ») ont été rapportés avec également des malformations de l'appareil génital. Ce n'est qu'à partir des années 2000 qu'a été observé la transmission de certains effets du DES à la génération suivante, qui n'y a pas été directement exposée. Cet aspect transgénérationnel est une particularité du DES.

2.2.1. *Cancers de l'appareil reproducteur féminin*

En 1971, des médecins américains publièrent un article scientifique sur l'association du traitement au DES commencé pendant le premier trimestre de grossesse et l'apparition de cas rarissimes de cancer du col de l'utérus ou du vagin. Parmi 8 jeunes filles exposées *in utero* au DES, 7 ont développé des adénocarcinomes à cellules claires (ACC) de l'âge de 14 à 22 ans (Herbst et al. 1971). En 2011, l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé (AFSSAPS) estime que la fréquence de survenue des ACC du vagin et du col de l'utérus des « filles DES » serait d'environ 1 cas pour mille (AFSSAPS 2011).

Une revue de 2014 récence d'autres cancers de l'appareil reproducteur féminin des « filles DES » comme la dysplasie du col de l'utérus et le cancer du sein (Tableau 3) (Tournaire et al. 2014).

Dès 1971, l'US FDA a demandé aux médecins américains d'arrêter la prescription du DES aux femmes enceintes, suivi par les pays européens dans les 8 années suivantes (Tableau 2) (AFSSAPS 2011).

Le cas du DES a mis en évidence que l'exposition prénatale à un carcinogène peut entraîner une apparition plus précoce des cancers (Grandjean et al. 2008).

En dehors des cancers de l'appareil reproducteur féminin, un certain nombre de malformations génitales ont également été rapportées chez les « enfants DES ».

Tableau 3 : Anomalies 2^e génération, « filles DES »

Source : Tournaire et al. 2014

ANOMALIES	COMMENTAIRES
Appareil génital	
Adénose : présence de muqueuse glandulaire à l'extérieur du col et sur le vagin	Fréquente, bénigne
Utérus : malformations	Hypoplasie Utérus en forme de T Hypoplasie col de l'utérus
« Trompes »	Trompes de taille réduite
Problèmes de fertilité	
Chez environ 1/3 des « filles DES »	Causes : anomalies de la glaire cervicale, de l'utérus, des trompes
Accidents de grossesse	
Grossesses extra-utérines	Risques relatifs X 10
Fausses-couches précoces	X 1,6 à 2,5 (1 ^{er} trimestre)
Fausses-couches tardives	X 6 à 14 (16-24 semaines)
Prématurité	X 2,2 à 3,2
Cancers	
Adénocarcinome à cellules claires du col de l'utérus ou du vagin	Environ 1 « fille DES » sur 1 000 Âge moyen de survenue 24 ans
Dysplasie du col de l'utérus	Risque X 2
Cancer du sein (?)	États-Unis : risque X 2 après 40 ans Pays-Bas : pas d'augmentation

2.2.2. Malformations génitales

En 1981, Herbst a montré que les femmes exposées au DES pendant leur vie intra-utérine ont un taux d'accidents de grossesses plus élevé que le groupe témoin (Herbst et al. 1981). Les mêmes observations ont été réalisées en France en 1988 (Pons et al. 1988).

Chez les « filles DES », ces troubles de la fertilité ont été expliqués par la présence de malformations congénitales structurelles du vagin, de l'utérus et des trompes de Fallope (Tableau 3). Celles-ci entraînent des grossesses extra-utérines (risque augmenté d'un facteur 5 à 10 selon les études), des fausses couches tardives caractéristiques du DES (risque augmenté d'un facteur 10) et des accouchements prématurés.

Les « fils DES » présentent aussi des malformations congénitales de leur appareil reproducteur comme des sténoses de l'urètre, des kystes de l'épididyme, des *hypospadias*, des cryptorchidies (absence d'un ou des deux testicules dans le scrotum), des hypotrophies testiculaires, des microphallus et des malformations des spermatozoïdes (Tableau 4) altérant également leur fertilité (AFSSAPS 2011; Reed & Fenton 2013; Tournaire et al. 2014).

Tableau 4 : Anomalies 2^e génération, « fils DES »

Source : Tournaire et al. 2014

ANOMALIES	COMMENTAIRES
Kystes de l'épididyme	Bénins
Hypotrophie des testicules	
Cryptorchidie (absence de descente d'un ou deux testicules à la naissance)	Traitement médical ou chirurgical
Hypospadias (orifice urinaire sous la verge)	Traitement chirurgical

Le risque d'atteinte de l'appareil génital par le DES est essentiellement fonction de la période d'exposition au traitement plus que de la durée ou des doses prescrites. La fenêtre de sensibilité d'exposition correspond à la longue mise en place de l'appareil reproducteur entre la 4^{ème} à la 15^{ème} semaine de grossesse (AFSSAPS 2011). Contrairement à la Thalidomide, le spectre des malformations est restreint à l'appareil génital.

Le pourcentage d'accouchements menés à terme est de 84 % dans la population générale, contre 50 % chez l'ensemble des « filles DES », et seulement 33 % chez les « filles DES » présentant une malformation structurelle de l'appareil reproducteur (Tournaire et al. 2014; MISSING:AFSSAPS2004DES 2016).

Les troubles de la fertilité des « enfants DES » ne s'expliquent pas uniquement par les malformations structurelles de leur appareil reproducteur mais aussi par un dysfonctionnement hormonal.

2.2.3. *Dysfonctionnement hormonal*

Le DES s'avère également être un perturbateur endocrinien c'est-à-dire qu'il agit directement sur le système hormonal en mimant les effets d'un œstrogène. Cela provoque des effets néfastes notamment sur la fertilité des « enfants DES ».

Le DES était justement prescrit parce qu'il compensait une déficience en progestérone et contribuait ainsi à éviter des fausses couches, les accouchements prématurés et les hémorragies de la délivrance. Mais en 1940, la communauté scientifique ne savait pas encore que les modifications hormonales (perturbations endocriniennes) pouvaient entraîner des effets néfastes chez les patients ou chez leurs enfants.

Les perturbations hormonales provoquées par le DES entraînent chez les « filles DES » des troubles de l'ovulation, des ménopauses précoces et des taux sanguins augmentés en testostérone. Les « fils DES » présentent également des problèmes de

fertilité avec une diminution de la qualité du sperme (oligospermie) (Reed & Fenton 2013; AFSSAPS 2011).

Pour résumer, le DES agit selon plusieurs modes d'action : cancérigène, tératogène et perturbateur endocrinien. Néanmoins, il a été récemment montré que sa caractéristique principale est d'entraîner des effets transgénérationnels suite à des modifications épigénétiques.

2.3. Effet transgénérationnel

Des effets transgénérationnels ont été mis en évidence avec l'exposition au DES (Tableau 5). Les enfants des « filles DES », qui n'ont jamais été exposés directement au DES, présentent également des anomalies de l'appareil reproducteur.

Les fils des « filles DES » présentent un risque d'*hypospadias* augmenté d'un facteur 5 ainsi qu'une altération de la fertilité, une oligospermie et une diminution de la motilité des spermatozoïdes. Les filles des « filles DES » présentent uniquement un retard de quelques mois de la régularisation des règles, ce qui n'altère pas leur fertilité (Harris & Waring 2012) (Reed & Fenton 2013; Tournaire et al. 2014).

Tableau 5 : Anomalies 3^e génération, enfants des « filles DES »

Source : Tournaire et al. 2014

ANOMALIES	COMMENTAIRES
Filles	
Retard de régularisation des règles de quelques mois	Sans conséquences pratiques
Garçons	
Hypospadias (orifice urinaire sous la verge)	Risque X 5 - Traitement chirurgical
Filles et garçons	
Atrésie de l'oesophage	Risques augmentés
Naissance prématurée	Risque de handicap psychomoteur

Ces effets transgénérationnels du DES pourraient être expliqués par l'épigénétique. Il s'agit de l'étude des changements de l'activité des gènes, en l'absence de modification de la séquence d'ADN et pouvant être transmis lors des divisions cellulaires. Contrairement aux mutations génétiques qui, elles, affectent la séquence d'ADN, les modifications épigénétiques sont généralement réversibles. Parmi les mécanismes de régulation épigénétiques (Figure 8) se trouvent :

- La méthylation / déméthylation : l'ajout ou la suppression d'un groupement chimique d'un méthyl (CH₃) sur l'ADN peut modifier l'expression des gènes. La

dérégulation de la méthylation de l'ADN est maintenant reconnue comme un facteur important de la carcinogénèse (Hilakivi-Clarke 2014) ;

- La modification des histones (protéines enroulant l'ADN) régule la transcription d'un gène.

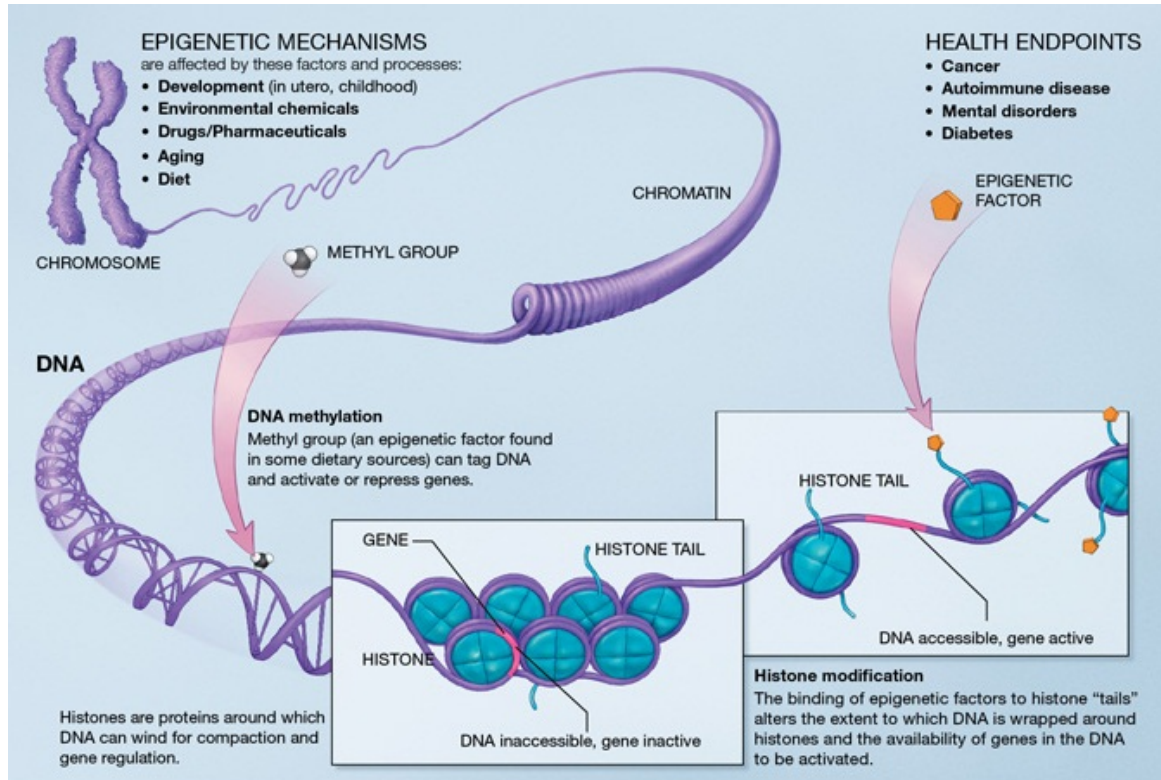


Figure 8 : Exemples de mécanismes épigénétiques

Source : National Institutes of Health

Les ARN non codants (ARN fonctionnel transcrit de l'ADN mais non traduit en protéine) jouent également un rôle dans les régulations épigénétiques. Parmi eux, se trouvent ceux dits courts avec moins de 30 nucléotides (microARN, short interfering ARN et piwi-interacting RNA) et ceux dits longs avec plus de 200 nucléotides (enhancer RNA et long non-coding RNA) (Kaikkonen et al. 2011).

La reprogrammation épigénétique des cellules germinales du fœtus est susceptible de causer des modifications de l'environnement hormonal du fœtus comme c'est le cas avec le DES ou d'autres perturbateurs endocriniens. En conséquence, ces expositions peuvent mener à une empreinte biochimique permanente du génome des cellules de la génération F1 et cette modification peut être transmise aux cellules de la génération F2 par l'intermédiaire des cellules germinales (Harris & Waring 2012).

2.4. DES aujourd'hui

En France, le DES a été mis sur le marché en 1948, ses effets indésirables ont été mis en évidence dans les années 70 et il a été interdit en 1978. Pendant ces 30 années, environ 200 000 femmes ont été traitées au DES pendant leur grossesse avec un pic de prescriptions situé de la fin des années 1960 au début des années 1970. En tenant compte des avortements et de la mortalité fœtale et néonatale, le nombre d'enfants nés de ces grossesses est estimé à 160 000 (AFSSAPS 2011). L'âge de procréer, pour ces enfants, se situe en majeure partie entre 1975 et 2015 : les problèmes génitaux ainsi que les problèmes de stérilité du DES représentent un problème actuel de santé publique.

Le DES est maintenant considéré comme carcinogène, tératogène et perturbateur endocrinien.

Une cohorte internationale (190 pays participants) des « filles DES » et de « fils DES » est actuellement en cours de suivi dans le programme des États-Unis : « Continuation of Follow-up of DES-Exposed Cohorts trial » (ClinicalTrials.gov ID NCT00340600) (Hilakivi-Clarke 2014).

Le DES est toujours commercialisé sous le nom de Distilbène mais son unique indication est désormais le traitement du cancer de la prostate (AFSSAPS 2011).

Le Diéthylstilbestrol (DES) a permis de mettre en évidence des effets transgénérationnels d'un agent tératogène ainsi que l'identification de malformations congénitales uniquement à l'âge adulte. Le cas du DES confirme que des tests spécifiques d'évaluation de la toxicité du développement sont nécessaires avant la mise sur le marché afin d'éviter que des cas similaires ne se reproduisent.

Dans l'histoire récente, d'autres cas ont démontré que des sources environnementales peuvent également être responsables de l'apparition de malformations chez l'Homme.

3. Méthylmercure

Le cas de Minamata avec la contamination des eaux avec du méthylmercure ($\text{H}_3\text{C-Hg}^+$ ou MeHg) est emblématique de contaminations environnementales entraînant des malformations congénitales mais aussi des effets mortels chez l'Homme.

3.1. Contaminations de la baie de Minamata et de la rivière d'Agano

À Minamata, de 1932 à 1966, la société japonaise Chisso productrice d'oxyde de mercure en rejeta de manière non intentionnelle environ 400 tonnes dans ses eaux usées. Ce rejet a entraîné la contamination des eaux aux alentours mais aussi des poissons et des fruits de mer (Eto 1999). Le même scénario se produisit à nouveau au Japon le long de la rivière Agano en 1965.

Les mêmes atteintes neurologiques affectaient les poissons et leurs consommateurs (oiseaux, chats ...).

Suite à cette pollution des eaux et à cause de la consommation de poissons, près de 900 décès furent enregistrés de 1949 à 1965.

En mai 1956, le terme de « Maladie de Minamata » fut défini sans que le lien soit encore établi avec le MeHg. Chez l'adulte, l'exposition au MeHg se traduit par une atteinte neurologique (ataxie c'est-à-dire un manque de coordination des mouvements musculaires, faiblesse musculaire, tremblements, déséquilibre, altération de la parole) et une atteinte des sens (du toucher au niveau des extrémités, réduction bilatérale du champ visuel, mouvement anormal des yeux et altération de l'ouïe) (Eto 1999).

Deux ans plus tard, c'est la « Maladie Fœtale de Minamata », qui est à son tour reconnu : 64 cas ont été recensés. En plus de l'ataxie chez l'adulte, les symptômes chez les enfants exposés *in utero* sont essentiellement des atteintes neurologiques avec un retard mental, des convulsions et une difficulté d'articulation de la parole. Les mères ne présentaient pas de symptôme au moment de leur accouchement (K & M 2011).

De 1955 à 1959, le taux d'enfants mâles a diminué dans la population générale de Minamata. Ceci suggère qu'une exposition à forte dose de MeHg au stade embryonnaire, conduirait à des avortements ou des enfants mort-nés chez les garçons. Son action abortive peut s'expliquer par ses différents modes d'action : il est clastogène (casse les chromosomes) et cytotoxique, il perturbe la synthèse de l'ADN, il lyse les membranes cellulaires, etc... (K & M 2011).

En 2009, 53 ans après la reconnaissance de la maladie en mai 1956, plus de 13 000 malades ont été reconnus par l'entreprise et l'État japonais.

3.2. Contamination de produits alimentaires en Iraq

Un autre cas d'empoisonnement aigu au MeHg eut lieu en Iraq de 1971 à 1972 en raison de la consommation de pains préparés à base de blé traité avec le MeHg utilisé

comme fongicide. Ces graines de blé enrobées de MeHg étaient colorées en rose pour indiquer leur toxicité si elles étaient consommées directement. Or l'Iraq se trouvait en pénurie de nourriture. C'est pourquoi ces graines n'ont pas été plantées mais utilisées pour réaliser du pain, qui s'est avéré très toxique. En effet, environ 40 000 personnes auraient été contaminées avec l'apparition de symptômes similaires à la maladie de Minamata.

Suite à cette contamination, on observa une augmentation du nombre d'enfants mort-nés. Par la suite, une étude a mis en évidence une relation dose-réponse entre les taux de MeHg dans les cheveux maternels et les atteintes neurologiques de leurs enfants (Greenwood 1985).

Ces cas d'empoisonnement au MeHg montrent qu'une des voies de contamination des polluants environnementaux peut être l'alimentation.

3.3. Bioaccumulation dans la chaîne alimentaire

Dans des conditions physiologiques, le mercure se retrouve sous sa forme organique le MeHg. Celui-ci est très lipophile et s'accumule dans les graisses des organismes des différents niveaux trophiques jusqu'à l'Homme (Figure 9). La méthylation du mercure inorganique peut se faire de façon abiotique (en particulier dans les sédiments) ou biotique, grâce à l'action de bactéries ou d'organismes aquatiques (Weber 1993). D'après Slooff et al., 1995, de manière générale, on trouve de 0,01 à 10 % de mercure sous forme méthylée dans l'eau et les sédiments, chez environ 15 % des algues, chez 20 à 50 % des invertébrés aquatiques et chez 80 à 99 % des poissons (Slooff et al. 1995).

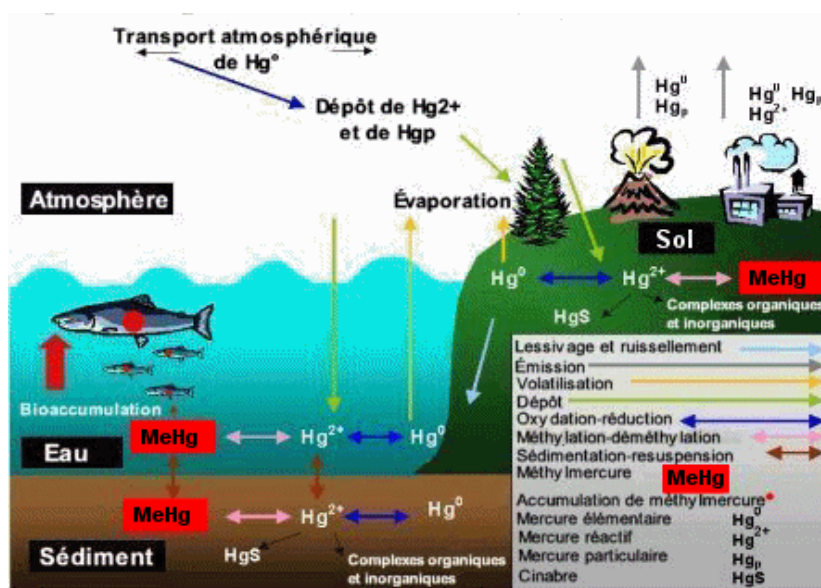


Figure 9 : Cycle biogéochimique conceptuel du mercure
Source : Environnement Canada

Le niveau de mercure dans les poissons de la baie de Minamata dépassait les 10µg/g en 1961 soit 400 fois plus que le taux recommandé actuellement qui est de 0,025 µg/g (INERIS 2010). Un taux allant jusqu'à 25µg/g de mercure total a été mesuré dans les sédiments de la baie de Minamata. Suite à la contamination identifiée au MeHg, la baie a été draguée et les sédiments éliminés pour supprimer la source de contamination au MeHg (Eto 1997).

Ce phénomène de bioaccumulation a également été observé chez l'Homme : des analyses de sang ont montré que les concentrations en MeHg étaient plus élevées dans le cordon ombilical que dans le sang maternel à la naissance (Murata & Sakamoto 2011). Cette observation peut expliquer que les mères étaient asymptomatiques pendant leur grossesse, le MeHg étant moins biodisponible pour elles.

La demi-vie biologique du MeHg chez l'Homme est estimée entre 35 et 189 jours, avec de larges variations interindividuelles (Clarkson 2002). Le MeHg, une fois assimilé, reste près de 6 mois dans l'organisme pour réaliser ses effets.

3.4. Méthylmercure aujourd'hui

Par ses propriétés de solubilité et de bioaccumulation, le MeHg est ubiquiste dans l'environnement : air, eau, sédiments, sols, organismes aquatiques ou terrestres (Figure 10).

La présence de mercure dans l'environnement est à la fois due à des causes naturelles (éruptions volcaniques, feux de forêt, érosion de sols ou de rochers contenant du mercure et l'évaporation d'eau contenant du mercure), et à la fois due à des activités humaines (combustion du charbon, incinération de déchets municipaux et médicaux, orpillage, amalgames dentaires, fongicides). Approximativement 80% du mercure anthropique est du mercure élémentaire relargué dans l'air. Le mercure organique comme le MeHg est dérivé du mercure élémentaire issu de la dégradation par les micro-organismes.

Suite aux cas de la Maladie de Minamata, deux études à long terme ont été menées sur plusieurs cohortes d'enfants. Celle des Iles Féroé a mis en évidence une relation dose réponse entre l'exposition prénatale au MeHg par la consommation de baleines-pilotes (bout de chaîne alimentaire) et l'altération de la mémoire, de l'attention, du langage et de la perception visuospatiale des enfants (Weihe et al. 2012).

A l'heure actuelle, la contamination environnementale au MeHg reste une grande préoccupation de santé publique internationale. En effet, en janvier 2013, la Convention de Minamata sur le Mercure a été signée par 128 pays pour protéger la santé humaine et

l'environnement des effets néfastes du mercure. Leurs principaux axes de travail sont l'interdiction de nouvelles mines de mercure, la fermeture des mines existantes, la réalisation de mesures des émissions aériennes et l'établissement d'une réglementation internationale pour le secteur informel des mines d'or.

Milieu	Concentration
Air	1 à 4 ng.m ⁻³ (1)
Eau	
Mercure total :	
- eaux souterraines	0,5 à 15 ng.L ⁻¹
- lacs	à 12 ng.L ⁻¹
- rivières	0,01 à 6 ng.L ⁻¹
- mers	0,05 à 3 ng.L ⁻¹
Méthylmercure :	
- lacs	0,04 à 0,8 ng.L ⁻¹
- eaux de pluie	< 0,5 à 0,6 ng.L ⁻¹
Sols	0,03 à 0,15 mg.kg ⁻¹ (de poids sec) (1)
Sédiments	< 0,4 mg.kg ⁻¹ (de poids sec) (1)
Poissons	
- d'eau douce	0,2 à 7 mg.kg ⁻¹ (de poids frais) (1)
- de mer	0,01 à 1,5 mg.kg ⁻¹ (de poids frais) (1)
- thon, espadon	0,3 à 7 mg.kg ⁻¹ (de poids frais) (1)
Coquillages, crustacés	0,01 à 1 mg.kg ⁻¹ (de poids frais) (1)
Plantes	< 0,1 mg.kg ⁻¹ (de poids frais) (1)

(1) Mercure total

Figure 10 : Concentrations environnementales du mercure

Source : INERIS 2010

La découverte de la maladie fœtale de Minamata, qui est un empoisonnement congénital au méthylmercure (MeHg), a permis de mettre en évidence que l'exposition intra-utérine à un contaminant environnemental par l'alimentation maternelle peut affecter la descendance. De plus, le fœtus peut être plus sensible que l'adulte à un contaminant environnemental par un phénomène de bioaccumulation dans le cordon ombilical. En effet, les mères empoisonnées au MeHg ne présentaient pas de symptômes. Les fœtus masculins et les fœtus féminins peuvent ne pas avoir la même sensibilité face à un même contaminant environnemental.

Après la présentation de ce cas de contamination environnementale accidentelle, le cas d'une contamination environnementale volontaire massive et mondiale avec le biocide DDT est décrit ci-après.

4. DDT

L'insecticide DDT (1,1,1-trichloro-2,2-bis(p-chlorophényl)éthane) a largement été utilisé à partir de la seconde guerre mondiale notamment pour lutter de manière très efficace contre les agents infectieux des zones insalubres, pour traiter les champs et les habitations. Le DDT s'est avéré très persistant et très bioaccumulable dans l'environnement au point d'être encore actuellement présent dans les fluides humains de la population mondiale malgré son interdiction d'épandage depuis le début des années 70. Ce biocide est responsable de malformations génitales, de cancers et de stérilité chez les personnes exposées *in utero*. De plus, cette contamination a également un impact direct sur la survie d'espèces d'oiseaux et de reptiles.

4.1. Historique de ce biocide

Le DDT est un biocide organochloré synthétisé en 1874 mais dont les propriétés insecticides et acaricides n'ont été découvertes qu'en 1939 par Paul Müller (Figure 11).



Figure 11 : DDT, formule développée et différentes formes de commercialisation
Source : adapté de Smithsonian Legacies

Au début de la Seconde Guerre mondiale, il est rapidement devenu l'insecticide moderne le plus utilisé. Il fut utilisé par les militaires pour faciliter leur avancée en terrains insalubres, par les agriculteurs et la population générale dans les habitations pour lutter contre divers arthropodes vecteurs de maladie (ex : paludisme, typhus exanthématique, peste bubonique) (Bouwman et al. 2013; Cohn et al. 2015).

Le succès fut tel qu'en 1948, le chimiste suisse Paul Müller reçut le prix Nobel de physiologie ou médecine « pour sa découverte de la grande efficacité du DDT en tant que poison contre divers arthropodes ». En effet, le DDT est un puissant insecticide : il tue en ouvrant les canaux sodiques des neurones des insectes, conduisant à des spasmes, puis à la mort quasi instantanée.

Ce n'est qu'en 1962, que la biologiste américaine Rachel Carson publia le livre « Silent Spring » accusant le DDT d'être cancérigène et reprotoxique pour les phoques, les reptiles et les oiseaux (retard de calcification entraînant un amincissement de la coquille des œufs). À partir de cette date, les effets du DDT ont été intensivement étudiés, ce qui a abouti en 1972 à son interdiction pour l'agriculture par l'US FDA (Bouwman et al. 2013).

4.2. Particularités du DDT

4.2.1. Ubiquiste dans l'environnement

La forme commerciale du DDT contenait un mélange de *p,p'*-DDT (~ 85%), *o,p'*-DDT (~15%) et des traces de *o,o'*-DDT. Le dichlorodiphényl-dichloroéthylène (DDE) et le dichlorodiphényl-dichloroéthane (DDD) sont les métabolites du DDT présents dans l'environnement (Figure 12).

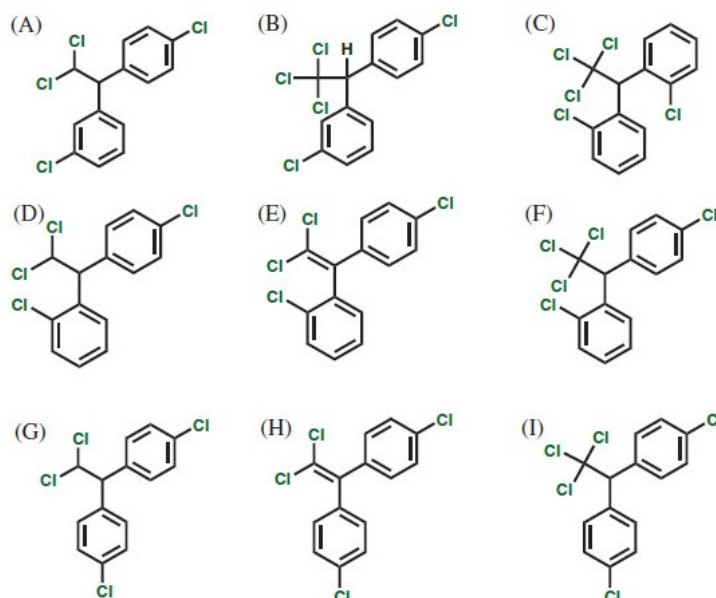


Figure 12 : Formules des différentes formes du DDT et de ses métabolites
 (A) *m,p'*-DDD, (B) *m,p'*-DDT, (C) *o,o'*-DDT, (D) *o,p'*-DDD, (E) *o,p'*-DDE, (F) *o,p'*-DDT, (G) *p,p'*-DDD, (H) *p,p'*-DDE and (I) *p,p'*-DDT.

Source : Montes-Grajales et al. 2013

La demi-vie du DDT est d'environ 7 ans, celle du DDE est supérieure à 7 ans et celle du DDD est inférieure à 7 ans. Ces longues demi-vies en font des molécules très persistantes dans l'environnement (Montes-Grajales et al. 2013). Le DDT est un POP (Polluant Organique Persistant) et fait partie de la liste des pesticides identifiés comme les « dirty dozen » par la Convention de Stockholm, qui veut fortement restreindre leur utilisation voire les interdire.

Le DDT est également bioaccumulable dans les tissus des organismes, dans l'eau et dans les sédiments (Byard et al. 2015; Bouwman et al. 2013).

Par ses caractères très persistant et très bioaccumulable du DDT ainsi que de ses métabolites, la population générale y serait virtuellement exposée (Burns et al. 2013). De plus, le DDT est encore utilisé pour lutter contre le paludisme comme en Afrique subsaharienne ou en Inde où il est alors pulvérisé sur les murs intérieurs et les plafonds (Cohn et al. 2015).

4.2.2. Tératogène

Le caractère tératogène du DDT a d'abord été identifié dans la faune. En effet, le DDT a été associé à la diminution de la taille des pénis d'alligators les rendant ainsi stériles (Guillette et al. 1999). Il a également été incriminé dans le retard de calcification de la coquille des œufs des ovipares (oiseaux et reptiles), ce qui rend l'œuf fragile et vulnérable aux infections (Fry & Toone 1981; Gray et al. 2001).

Chez l'Homme, le DDT a également été associé à des malformations de l'appareil reproducteur mâle (*hypospadias* et cryptorchidisme) dans les villages où il est utilisé pour lutter contre le paludisme (Bornman et al. 2010; Lubick 2010).

Le DDT, biocide organochloré, est reconnu comme neurotoxique du développement chez les nuisibles mais aussi chez les rongeurs (Substances & (ATSDR) 2002). Il serait également un neurotoxique du développement chez l'Homme. En effet, en 2006, Ribas-Fito *et al.* ont mis en évidence un retard du développement cognitif (compétences verbales, de mémoire et de perception) chez les enfants ayant un taux sanguin élevé en DDT de leur cordon ombilical (Ribas-Fito et al. 2006). Sagiv *et al.* ont trouvé une corrélation entre la concentration prénatale en DDE (métabolite du DDT) et l'apparition de trouble du déficit de l'attention avec hyperactivité chez les enfants (Bouwman et al. 2013; Sagiv et al. 2010).

4.2.3. Cancérogène

Les femmes exposées au DDT *in utero* ou avant l'âge de 14 ans présentent un risque d'un cancer du sein augmenté d'un facteur 5 (Cohn et al. 2015).

Le DDT est également suspecté de provoquer chez l'adulte des cancers de l'endomètre ainsi que des tumeurs des cellules germinales des testicules (Bouwman et al. 2013).

4.2.4. Perturbateur endocrinien

Chez le rat exposé *in utero*, le DDT ou le DDE entraînent le développement excessif de tissus ovariens modifiant ainsi l'implantation de l'embryon (Substances & (ATSDR) 2002).

Chez l'Homme, dans les zones traitées contre le paludisme, le DDT et ses métabolites diminueraient la qualité et l'ADN du sperme de l'Homme (Aneck-Hahn et al. 2007; Jager et al. 2006), raccourciraient la durée des cycles menstruels (Ouyang et al. 2005) et réduiraient les taux de progestérone et d'œstrogènes (Perry et al. 2006). Ils provoqueraient également une augmentation du taux de fausses couches (Bouwman et al. 2013).

<p>L'insecticide DDT est persistant, bioaccumulable, cancérigène, perturbateur endocrinien ainsi que tératogène. Ses effets sont néfastes aussi bien chez l'Homme que chez les espèces animales dans leur milieu naturel.</p>

En conclusion, ce chapitre présente plusieurs cas emblématiques d'altération du développement de l'enfant liée à la prise volontaire d'un médicament ou à une exposition à un contaminant environnemental.

Dans le cas de la Thalidomide, la stratégie d'évaluation toxicologique de l'époque n'était pas adaptée aux propriétés particulières d'un agent tératogène : la communauté scientifique pensait alors à tort que le fœtus était protégé par le placenta. L'évaluation de la reprotoxicité n'était pas systématique et elle n'était pratiquée que si le médicament était censé agir sur le système hormonal. Un autre apprentissage de la Thalidomide est que deux stéréoisomères peuvent avoir des propriétés biologiques différentes. Enfin, ce cas a mis en évidence que le rongeur n'était pas toujours l'espèce la plus adaptée pour prédire des effets sur l'Homme. Des études postérieures ont également mis en évidence les différentes fenêtres de sensibilité d'exposition entraînant les malformations variées du Syndrome de la Thalidomide.

Le cas du médicament Diéthylstilbestrol a mis en évidence que certaines malformations peuvent n'être détectées qu'à l'âge adulte et que d'autres effets peuvent être transmis à la génération suivante.

Le cas de la contamination environnementale au méthylmercure (MeHg) a lui mis en évidence qu'au moment de la grossesse, la consommation d'aliments contaminés par la mère peut être une voie de contamination des polluants environnementaux. Le fœtus s'avère plus sensible que l'adulte aux effets toxiques du MeHg. D'autre part, les fœtus masculins et féminins peuvent être affectés différemment par un même contaminant. Le dernier exemple de contamination environnementale est celui de l'insecticide DDT où l'exposition initiale est volontaire. Le DDT est très persistant et très bioaccumulable dans l'environnement et dans les organismes, ce qui peut entraîner des effets du DDT retardés de plusieurs années par rapport à la contamination initiale. En plus des malformations chez l'Homme, le DDT met également en péril la survie d'espèces animales sauvages telles que celles d'oiseaux ou de reptiles.

De chacun de ces cas, la toxicologie, l'écotoxicologie mais aussi la réglementation en ont tiré des enseignements. Pour éviter que des cas similaires ne se reproduisent, des outils ont été créés et continuent à être développés pour identifier les substances altérant le développement de l'enfant.

Chapitre 2 : Agent tératogène

La tératogénèse signifie la « création de monstres ». La Thalidomide, le DES, le MeHg et le DDT sont des agents tératogènes.

Afin de réaliser l'évaluation de la tératogénicité, il est nécessaire de connaître les différentes étapes de l'embryogénèse humaine. Elles sont complexes et non encore complètement connues. Il faut également savoir reconnaître et répertorier les malformations et déterminer s'il s'agit de l'action d'un agent tératogène ou non. Enfin, il est nécessaire de prendre en compte les particularités des agents tératogènes, leurs sources d'exposition ainsi que leur mécanisme d'action, lorsque cela est possible.

1. Tératogénicité et développement embryonnaire

De manière générale, les définitions en toxicologie manquent d'harmonisation et beaucoup de publications en font le constat. Ceci est également vrai pour la définition d'un agent tératogène (Ferrario et al. 2014; Agzarian & Foster 2004; Spranger & others 1983).

1.1. Définitions

La tératogénicité fait partie de la reprotoxicité, qui étudie l'ensemble des étapes de la reproduction.

La reproduction est un ensemble de processus permettant la perpétuation d'une espèce par la transmission d'un patrimoine génétique d'une génération à une autre. La reproduction sexuée forme un cycle. Celle des Mammifères est représentée dans la Figure 13.

Tout commence avec la formation des gamètes : la gamétogénèse, processus qui aboutit suite à la méiose à la formation des cellules reproductrices haploïdes (1 seule copie de chaque gène) : les gamètes mâles (spermatozoïdes via la spermatogénèse) et femelles (ovocytes via l'ovogénèse). L'ovulation permet la libération par l'ovaire d'un ovocyte prêt pour la fécondation. L'accouplement va ensuite permettre la mise en contact des gamètes. Cette étape nécessite toujours des organes sexuels fonctionnels. La fécondation consiste en la fusion de deux cellules haploïdes (gamètes) pour obtenir une cellule diploïde (zygote possédant 1 copie du gène issue de l'ovocyte et 1 copie issue du spermatozoïde). Le zygote

va migrer des trompes jusqu'à l'utérus pour s'implanter dans l'endomètre. Le placenta se met alors en place pour connecter le zygote à la mère. Toute cette partie de la reproduction constitue le segment I défini par l'ICH pour l'évaluation de la fertilité et du développement embryonnaire précoce. Ce segment peut être altéré lors de la maturation sexuelle, de la gamétogenèse, du comportement sexuel et de l'implantation.

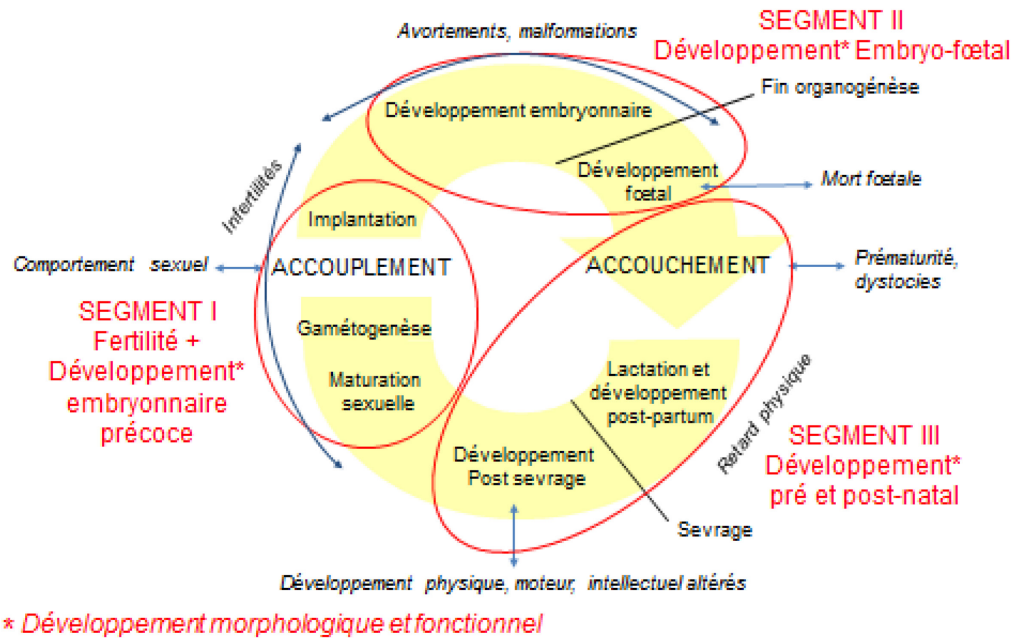


Figure 13 : Cycle de reproduction des Mammifères intégrant les segments ICH

Une fois le zygote implanté, la formation des différents organes (embryogénèse) se poursuit. Pendant le développement fœtal, le fœtus croît et les organes continuent leur maturation. Il s'agit du segment II défini par l'ICH : le développement dit embryofœtal où il peut y avoir des avortements, des malformations et des morts fœtales.

Une fois le fœtus formé, l'accouchement a lieu et marque le début de l'existence en dehors de l'organisme maternel. Le nouveau-né va ensuite être nourri par le lait de sa mère jusqu'au sevrage. Il va ensuite continuer sa croissance jusqu'à l'apparition de caractères sexuels secondaires. Il s'agit du segment III défini par l'ICH : le développement pré- et post-natal où il peut y avoir de la prématurité, des retards physiques mais aussi un développement physique, moteur et intellectuel altéré.

Selon l'Agence européenne des produits chimiques (ECHA), la reprotoxicité (ECHA 2015) couvre à la fois : la toxicité de la fertilité et la toxicité du développement (Figure 14). La toxicité de la fertilité est l'altération des fonctions ou des capacités reproductives mâles ou femelles, du déclenchement de la puberté, de la production et du transport des gamètes, de la menstruation, du comportement sexuel ou encore de la senescence reproductive prématurée. La toxicité du développement est l'induction non

héréditaire d'effets néfastes sur la descendance avant ou pendant le développement embryofœtal, l'allaitement et jusqu'à la puberté. Ces effets peuvent se manifester à n'importe quel moment du cycle de vie de l'organisme. Les manifestations majeures sont la mort de l'organisme en développement, les anomalies structurelles, l'altération de la croissance et les déficiences fonctionnelles (OECD 2008).

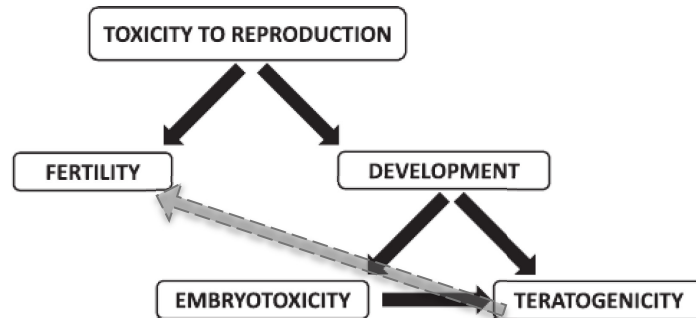


Figure 14 : Relations entre la toxicité de la reproduction (reprotoxicité), la fertilité, la toxicité du développement, l'embryotoxicité et la tératogénicité

Source : adapté de Sogorb et al. 2014

Une substance reprotoxique peut donc altérer la fertilité et/ou le développement pré- et post-natal. Dans le domaine de la reprotoxicité, un perturbateur endocrinien va essentiellement être toxique pour la fertilité (Stadler 2011).

Un agent tératogène est un agent reprotoxique entraînant de manière irrémédiable à la fois des anomalies morphologiques et/ ou fonctionnelles.

Certains scientifiques vont également intégrer dans la définition d'un agent tératogène les morts embryonnaire ou fœtale. Il s'agit alors d'un agent embryotoxique. D'autres chercheurs ajoutent également les retards de croissance (Gilbert-Barness 2010), ce qui revient à la définition d'une substance reprotoxique altérant uniquement le développement.

Les anomalies structurelles liées à une condition génétique sont parfois exclues de la définition d'une malformation congénitale. Les anomalies structurelles sont définies différemment en fonction de leur origine :

- malformation : formation pauvre en tissu ;
- déformation : contrainte inhabituelle d'un tissu normal ;
- perturbation : détérioration d'un tissu normal ;
- dysplasie : organisation anormale des cellules d'un tissu (Jones et al. 2013).

Ces anomalies peuvent provoquer des avortements spontanés et la naissance d'enfants mort-nés. Elles sont également une cause importante, mais méconnue, de mortalité infantile et d'incapacités développées jusqu'aux cinq ans de l'enfant (OMS 2010).

De manière indirecte, les effets tératogènes peuvent également provoquer l'infertilité (Gilbert-Barness 2010) suite à une malformation des organes reproducteurs, empêchant l'accouplement ou l'implantation du zygote.

Un agent tératogène est un agent reprotoxique entraînant uniquement des malformations morphologiques et/ ou fonctionnelles et ce, de manière irrémédiable au cours du développement embryofœtal. Cette définition exclue les agents embryotoxiques entraînant la mort aux stades embryofœtaux. Comme dans le cas du DES, ces effets peuvent n'être identifiables qu'à l'âge adulte, altérer la fertilité et être transmis à la génération suivante.

1.2. Embryogenèse humaine

Lorsque le spermatozoïde féconde l'ovocyte, il y a alors fusion des deux pronucléus et le développement du zygote en être humain commence. Celui-ci se découpe en plusieurs étapes : le clivage, la gastrulation, la neurulation et l'organogénèse.

1.2.1. Clivage

Au cours du clivage (du 1^{er} au 4^{ème} jour de grossesse), le zygote subit une série de divisions mitotiques rapides sans phase de croissance cellulaire. Cette étape est caractérisée par des cycles de division cellulaire constitués uniquement par une phase S (phase de réplication de l'ADN) qui s'enchaîne directement avec la phase M (phase de division cellulaire). Les phases G1 et G2 (phase de croissance cellulaire) sont escamotées (Figure 15).

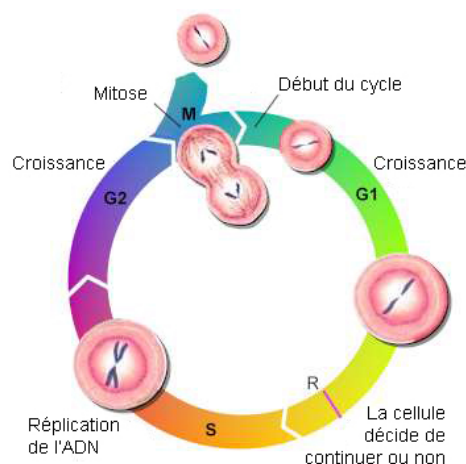


Figure 15 : Mitose classique
Source : David Darling

En conséquence, la taille des cellules diminuent progressivement alors que le zygote reste de taille constante (Figure 16). A la fin du clivage, le zygote a quitté la trompe et se trouve dans l'utérus.

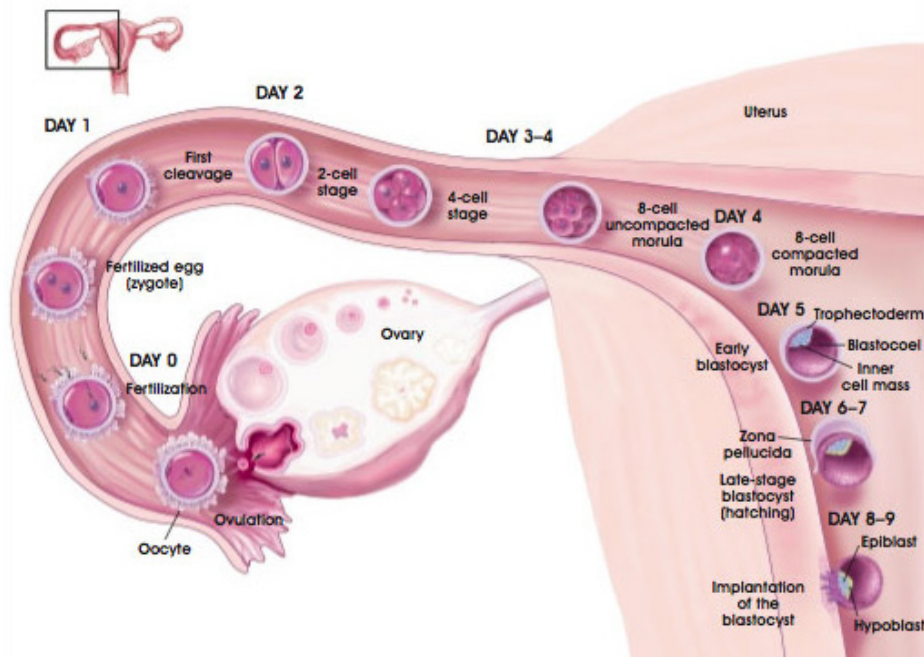


Figure 16 : De la maturation ovarienne à l'implantation chez l'Homme
 Source : National Institutes of Health

1.2.2. Gastrulation et mise en place des feuilletts embryonnaires

Six à sept jours après la fécondation, la différenciation cellulaire s'amorce et une cavité interne se forme : c'est le stade *blastula* (Figure 17).

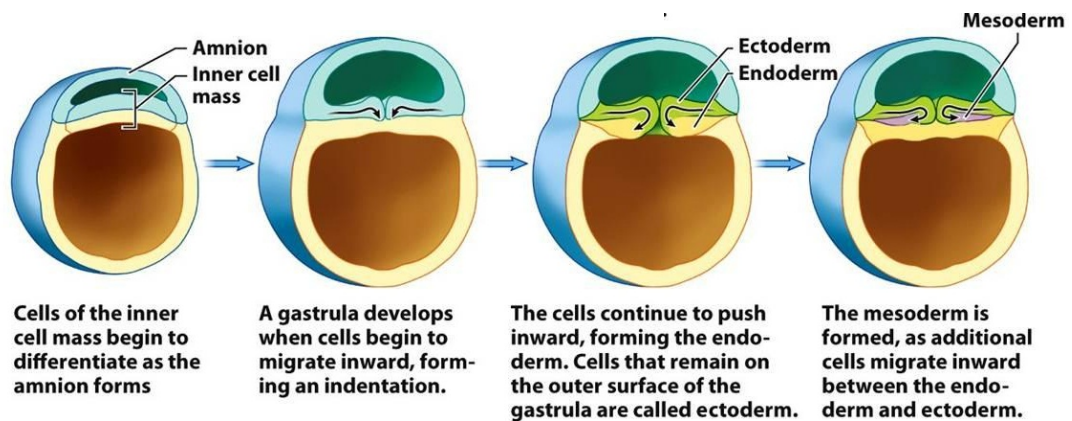


Figure 17 : Mise en place des feuilletts embryonnaires lors de la gastrulation
 Source : What Is Life ? A Guide To Biology ©2011 W.H. Freeman and Company

Après 2 à 3 jours de vie libre, le stade *blastula* se sépare de sa zone pellucide (une coque glycoprotéique sulfatée qui entoure l'ovocyte), entre directement en contact avec les cellules de l'endomètre et entame son implantation.

Les blastomères perdent alors leur totipotence pour n'être plus que pluripotents et commencent à se différencier progressivement. Des cellules embryonnaires s'invaginent pour aboutir à la formation des trois feuillets embryonnaires : l'endoderme (feuillet embryonnaire interne), le mésoderme (feuillet embryonnaire intermédiaire) et l'ectoderme (feuillet embryonnaire externe). Ce sont les étapes de la gastrulation.

A l'issue de la gastrulation, les mouvements morphogénétiques des trois feuillets embryonnaires se poursuivent pour conduire à la formation du système nerveux : c'est la neurulation (Figure 18). Au 19^{ème} jour de développement, la plaque neurale se forme par un épaissement de l'ectoblaste. La plaque neurale est large à l'extrémité céphalique où elle est à l'origine du futur cerveau, et étroite dans la portion caudale, qui est dévolue à la formation de la moelle épinière. Au cours de la 3^{ème} semaine de développement, les bords de la plaque neurale se surélèvent, formant des bourrelets neuraux qui délimitent la gouttière neurale. Les bords de cette dernière vont se rapprocher dès le 25^{ème} jour puis fusionner ce qui aboutit à la formation du tube neural. Au moment de la fermeture du tube neural, des amas de cellules (les crêtes neurales) se détachent de la plaque neurale et commence leur migration. Le stade de développement est la *neurula* et l'embryon mesure un peu plus de 2 millimètres.

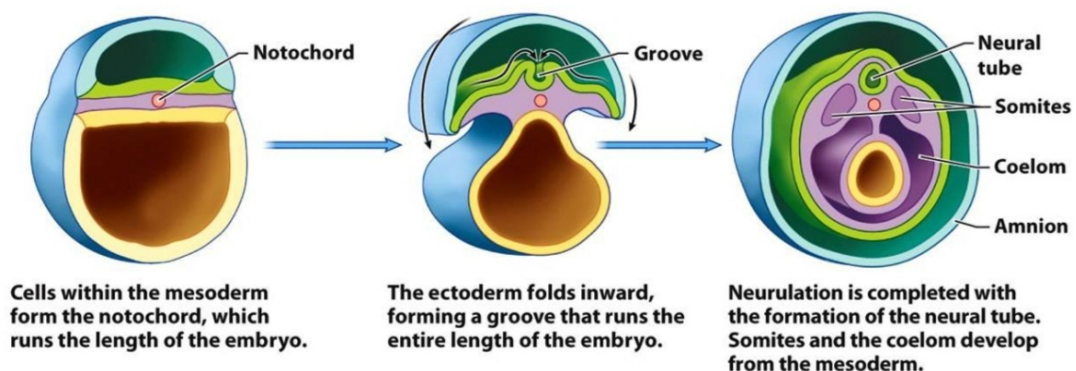


Figure 18 : Migration des différents feuillets embryonnaires pendant la neurulation

Source : *What Is Life ? A Guide To Biology* ©2011 W.H. Freeman and Company

L'embryon a maintenant une organisation antéro-postérieure et dorso-ventrale.

1.1.1. Organogénèse

Les trois feuillets embryonnaires se différencient en différents organes et tissus de l'organisme :

- l'endoderme, à l'origine du système digestif et pulmonaire ;
- le mésoderme, à l'origine du tissu conjonctif, des muscles, des os, des gonades et du système cardio-vasculaire ;

- l'ectoderme, à l'origine de l'épiderme et du système nerveux.

Les différents organes vont se développer selon un ordre bien précis et souvent en parallèle les uns des autres avec des durées plus ou moins longues (Figure 19). Le premier organe à se développer est le cœur avec ses premiers battements au 21^{ème} jour de développement. S'en suit le développement du système digestif, des membres, des yeux, des oreilles, des dents, du palais, des organes génitaux, etc...

A la fin de l'organogénèse, commence la vie fœtale correspondant à la croissance et à la maturation des différents organes notamment celui du cerveau et du système reproducteur, qui se poursuivront même après la naissance.

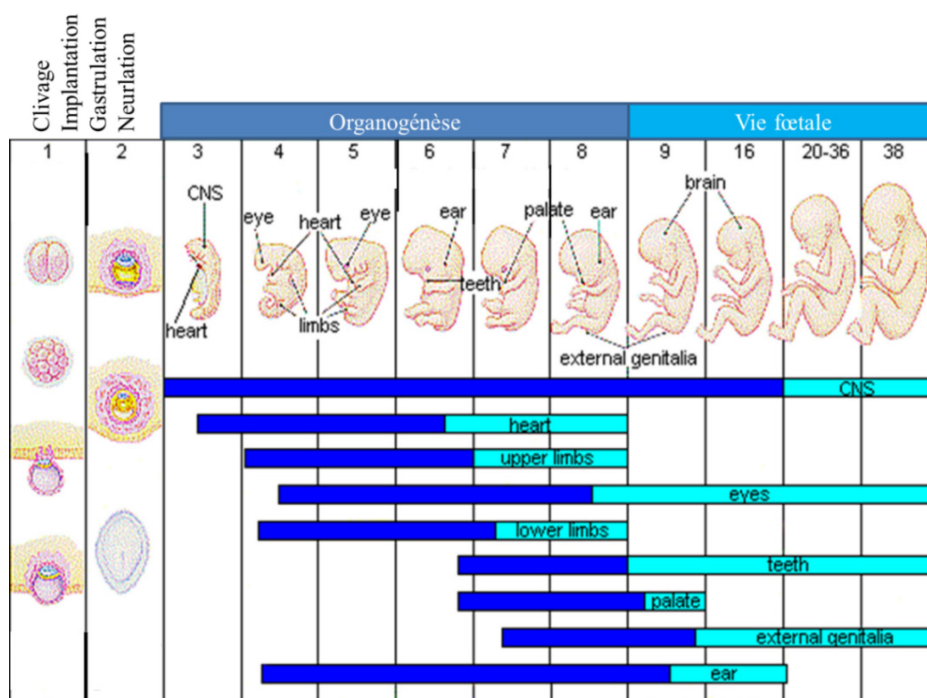


Figure 19 : Développement embryono-fœtal en semaines et mise en place des différents organes

Source : adapté de University of Pennsylvania Health System

Une multitude d'étapes est nécessaire au développement embryonnaire et à chaque étape peut se produire une altération du développement.

1.3. Stades critiques du développement embryonnaire

Comme évoqué précédemment, le placenta ne protège pas le fœtus et l'embryon de tous les pathogènes ou toxiques de l'environnement qui sont présents dans le corps de la mère. En 2008, une étude commandée par une ONG nord-américaine (Environmental Working Group) a trouvé 232 substances chimiques exogènes dans le sang de cordons ombilicaux. En moyenne, 200 de ces substances ont été trouvées par enfant. Parmi les

substances retrouvées, 208 sont susceptibles, à partir de certaines doses, d'induire des malformations chez l'animal comme le MeHg ou le Bisphénol A (BPA) (MISSING:environmental2009pollution 2016). Par conséquent, l'enfant peut être en contact avec un ou plusieurs agents tératogènes déjà présents chez la mère à un moment donné de son développement embryofœtal.

La première partie du développement jusqu'à l'implantation fait l'objet de nombreux avortements spontanés, qui passent souvent inaperçus et ne sont pas cliniquement détectables. A cette période, les échanges avec la mère sont limités et les blastomères sont encore pluripotents. Plusieurs scientifiques (Polifka & Friedman 1999) (Gilbert-Barness 2010) soutiennent la théorie du « tout-ou-rien » : des dommages sévères à cette période par un agent tératogène entraînent soit l'arrêt du développement et un avortement, soit les dommages causés pourraient être compensés grâce à la pluripotence des blastomères et permettre la poursuite normale du développement. Pendant cette période, une substance chimique serait plutôt responsable d'embryolétalité que de malformations. Il est difficile de distinguer les avortements spontanés de ceux provoqués par l'exposition à un agent tératogène.

L'organogénèse est une période particulièrement critique pour l'apparition de malformations structurelles (Gilbert-Barness 2010). Par exemple, un défaut de fermeture du tube neural entraîne une malformation sévère appelée *spina bifida* (fermeture incomplète de la colonne vertébrale avec possible sortie des méninges), alors que l'absence de fermeture du neuropore antérieur est responsable d'une autre malformation sévère : l'anencéphalie (absence de cerveau).

Durant la période fœtale, les organes sont mis en place mais certains continuent leur maturation comme pour le système urogénital et le système nerveux central. Un agent tératogène peut quand même entraîner des malformations sur ces deux systèmes ainsi que des déformations ou destruction d'organes ou d'une partie du corps (Spranger & others 1983). La plupart des malformations pendant cette période sont des retards de croissance intra-utérine (RCIU) et des malformations mineures comme le repli épicanthique (repli cutané au-dessus de l'œil formant comme une troisième paupière) ou une clinodactylie (déviation latérale des doigts ou des orteils) (Frias & Carey 1995). Des effets fœtotoxiques donneront soit une hypotrophie, soit une malformation fonctionnelle du fœtus (Orgogozo & Loiseau 1977).

Un agent tératogène est un agent reprotoxique entraînant de manière irrémédiable des malformations morphologiques et/ ou fonctionnelles. Ces effets peuvent n'être identifiables qu'à l'âge adulte, altérer la fertilité et être transmis à la génération suivante. Un agent tératogène peut agir à n'importe quelle étape du développement embryofœtal (gastrulation, neurulation, organogénèse et vie fœtale). Cependant chaque agent tératogène agit à un ou des stade(s) de développement embryofœtal spécifiques à la ou les malformation(s) qu'il induit.

2. Malformations congénitales

Plus de 7 000 types d'altérations du développement sont connus chez l'Homme (Weinhold 2009). Pour autant, les malformations congénitales n'en sont pas la cause majoritaire.

2.1. Aléas spontanés et induits de la grossesse

En dehors de toute action d'un agent tératogène, il existe une incidence naturelle mais significative d'effets délétères sur la grossesse dont voici les proportions approximatives dans la population mondiale :

- 50% à 60% des grossesses ne se développent pas en une grossesse cliniquement détectable (avant l'apparition des premiers symptômes) à cause d'un défaut d'implantation ou d'aberrations chromosomiques ;
- 10 à 20% des grossesses identifiées finissent en avortement spontané, principalement pendant le premier trimestre de la grossesse ;
- après la vingtième semaine de grossesse, 1% à 4% de toutes les grossesses se terminent par une fausse couche ;
- environ 2% des nouveau-nés présentent une malformation majeure auxquels s'ajoute 1% d'enfants avec une malformation majeure détectable pendant les cinq premières années de vie (Stadler 2011) ;
- 10 à 20% des nouveau-nés présentent une malformation mineure ((US) 2000).

Par ailleurs, il subsiste de grandes incertitudes quant à l'incidence et à la mortalité imputables aux troubles congénitaux, en particulier dans les pays qui ne disposent pas d'un système suffisant d'enregistrement des décès. Ces taux fluctuent en fonction du niveau économique de chaque pays : plus le niveau économique du pays est élevé, plus le taux de

mortalité infantile baisse et plus cette mortalité est due à une malformation congénitale (Figure 20). Dans la zone européenne, 25 % des décès néonataux sont attribués aux malformations congénitales pour 6% de mortalité infantile alors que 3% le sont au Maroc où la mortalité infantile est de 54% (OMS 2010).

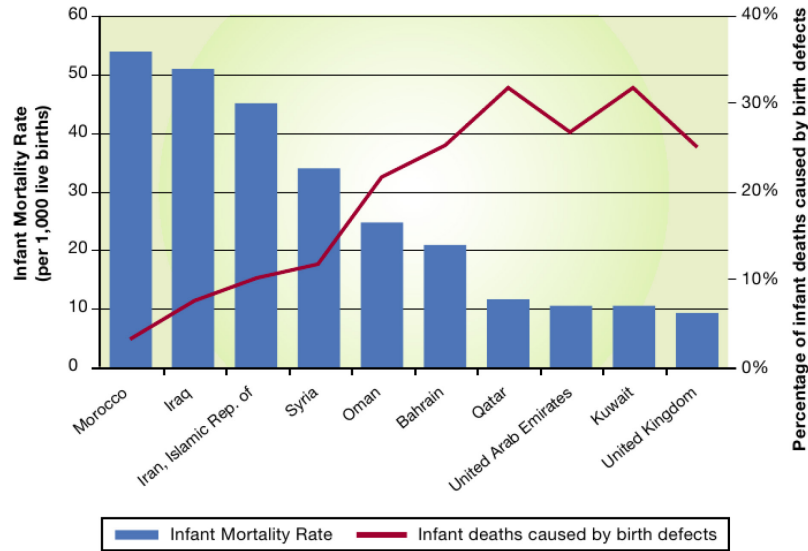


Figure 20 : Relation entre le taux de mortalité infantile et le pourcentage d'enfants morts à cause d'une malformation congénitale par pays

Source : Christianson et al. 2006

Selon les chiffres de l'OMS, en 2004, 7% des décès néonataux mondiaux aurait été dû à des malformations congénitales (OMS 2010).

2.2. Identification des malformations

Les malformations congénitales sont traditionnellement divisées en deux catégories : les « majeures » et les « mineures ». Il n'existe pas de définitions ou de listes permettant la distinction stricte entre ces deux catégories, cela relève du jugement d'experts en fonction des données historiques du laboratoire. Comme l'illustre les données historiques sur rongeurs d'un laboratoire représentées dans la Figure 21, le taux de malformations congénitales d'une certaine catégorie de malformation (ici les vertèbres) peut varier en fonction des années. Par exemple, les vertèbres fusionnées de rongeurs ont représenté en moyenne près de 0,8% des embryons malformés l'année 2 pour devenir quasi nulle l'année 6. Ces valeurs sont prises en compte pour déterminer si la substance testée entraîne réellement une augmentation du phénomène. Néanmoins, il est communément admis que les malformations majeures ont un effet néfaste pour la santé et la vie sociale de l'individu alors que les mineures auront un impact limité (Mylchreest & Harris 2013; Stadler 2011).

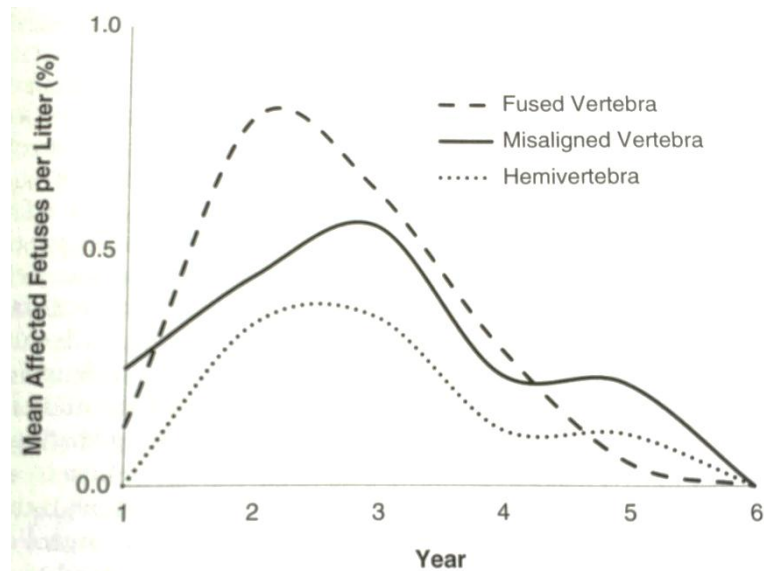


Figure 21 : Évolution des données historiques des malformations congénitales observées chez des rongeurs d'un laboratoire

Source : Mylchreest & Harris 2013

Lorsqu'une malformation congénitale se manifeste seule, cela peut indiquer qu'il s'agit d'un évènement isolé et la malformation congénitale peut être suspectée d'avoir comme origine une mutation génétique. Si la malformation est associée à d'autres, cela peut indiquer qu'il s'agit de l'effet d'un agent tératogène, qui lui a généralement plusieurs modes d'action comme présenté dans le chapitre précédent (Barton 2013).

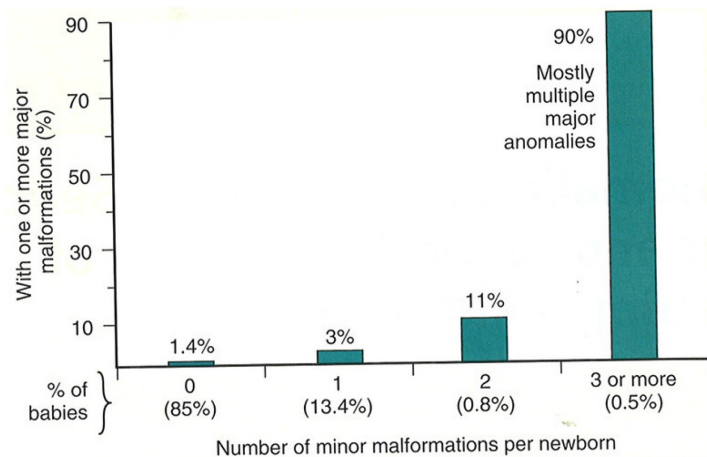


Figure 22 : Fréquence des malformations congénitales majeures en relation avec le nombre de malformations congénitales mineures chez l'Homme

Source : Jones et al. 2013

La présence de malformations mineures externes (donc visibles) comme une sténose de l'oreille externe peut aussi indiquer la présence de malformations majeures internes comme une agénésie rénale (cas du Syndrome branchio-oto-rénal) (Figure 22). À partir de 3 malformations mineures, il est très probable qu'il existe également des

malformations majeures. Si elles ne sont pas visibles, il faut approfondir le diagnostic en recherchant des malformations internes.

2.3. Classification et enregistrement des malformations

L'OMS a établi une classification internationale des malformations congénitales, des déformations et des anomalies chromosomiques : « International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 10th Revision (ICD-10) Chapter XVII: Congenital malformations, deformations and chromosomal abnormalities ». Cette classification ne fait pas la distinction entre les malformations majeures et mineures. Elle regroupe les malformations par organe cible (Tableau 6 et Annexe I) :

Tableau 6 : Classification internationale des malformations congénitales et des anomalies chromosomiques (ICD-10)

Source : OMS

Nomenclature	Organe cible	Exemple de malformation
Q00-Q07	système nerveux	encéphalocèle (hernie du cerveau hors de la boîte crânienne)
Q10-Q18	yeux, oreille, face, cou	Microphtalmie, microtie
Q20-Q28	système circulatoire	Tétralogie de Fallot (communication interventriculaire + sténose de la voie d'éjection du ventricule droit)
Q30-Q34	système respiratoire	nez fissuré
Q35-Q45	système digestif	fente labiale, fente palatine
Q50-Q56	organes génitaux	utérus bicorne, <i>hypospadia</i>
Q60-Q64	système urinaire	agénésie rénale
Q65-Q79	système musculosquelettique	polydactylie
Q80-Q89	autres	alopécie congénitale
Q90-Q99	chromosome	trisomie

Cette classification internationale permet une harmonisation de l'identification des malformations et l'établissement de statistiques pour détecter leur occurrence chez l'Homme.

Les registres internationaux de malformations comme l'Organisation internationale de Surveillance et de Recherche concernant les Anomalies congénitales (ICBDSR) et la Surveillance Européenne des Malformations Congénitales (EUROCAT) utilise l'ICD-10.

En 2013, l'ICBDSR a fait le bilan des malformations congénitales répertoriées de 1980 à 2011 dans 31 pays à travers le monde (MISSING:Annual Report 2013 2016). Les malformations cardiaques sont les malformations congénitales les plus fréquentes suivies des sténoses du système urinaire et des hydrocéphalies.

Les registres français de l'EUROCAT indiquent eux aussi que les malformations les plus répandues sont celles du système cardiovasculaire. Le détail des différentes malformations observées en France sont présentées en Annexe II. Contrairement aux données de l'ICBDSR, les malformations suivantes sont celles des membres, du système urinaire, les atteintes génétiques et du système nerveux (Figure 23) (EUROCAT 2015). Le plus grand nombre d'atteintes génétiques observées en Europe pourrait être expliqué par les grossesses de plus en plus tardives et au recours à la procréation médicalement assistée, là aussi chez des femmes de plus en plus âgées.

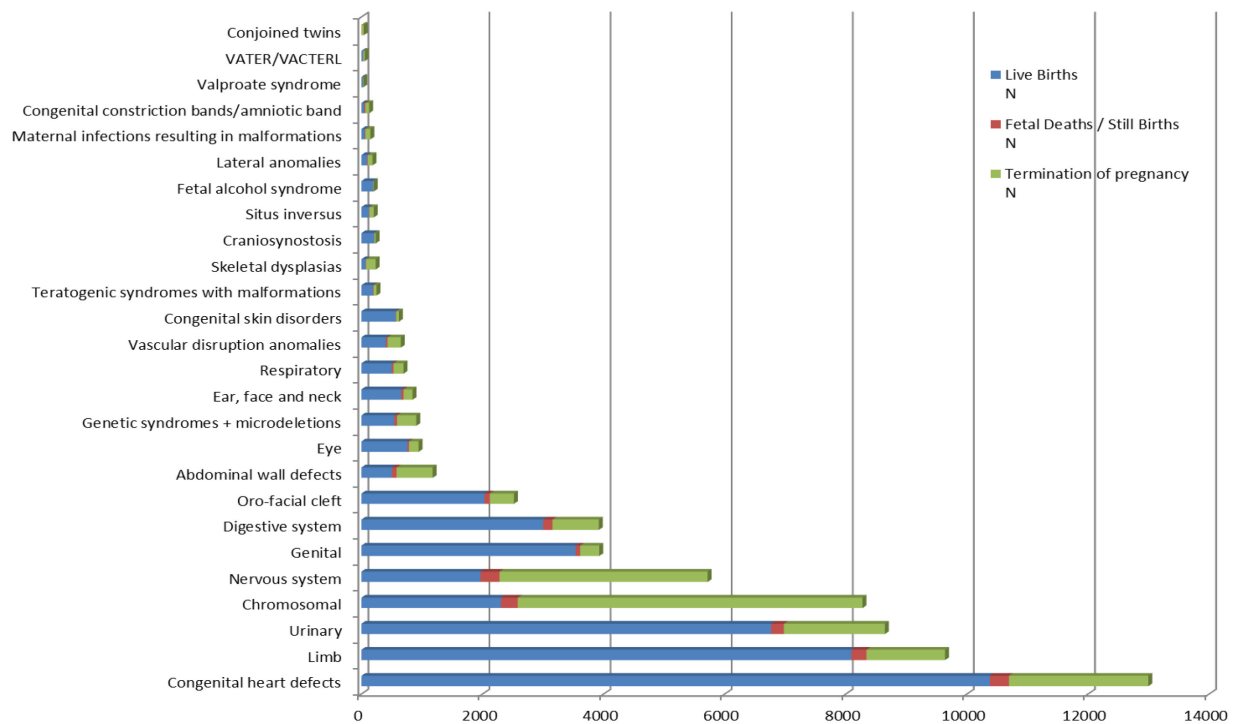


Figure 23 : Nombre de malformations congénitales de 5 registres français (Paris, Strasbourg, Ile de la Réunion, les Antilles et Auvergne) de 1980 à 2012

Source: EUROCAT Website Database: <http://www.eurocat-network.eu/ACCESSPREVALENCEDATA/PrevalenceTables> (data uploaded 06/01/2015)

Les malformations congénitales peuvent avoir des répartitions différentes en fonction du genre (Figure 24) par exemple la dislocation congénitale de la hanche apparait très majoritairement chez les filles.

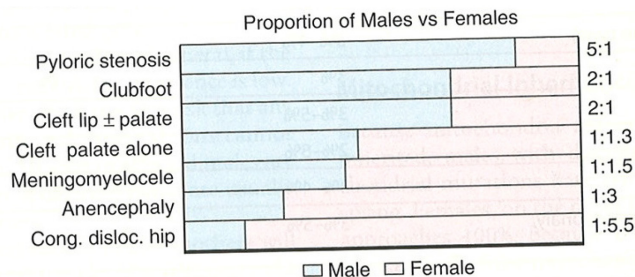


Figure 24 : Incidence de malformations congénitales uniques relative au genre

Source : Jones et al. 2013

Ces dernières années, de nombreuses publications relayées dans les médias alertent sur l'augmentation de malformations. L'exposition à des agents tératogènes entrainerait des malformations de l'appareil reproducteur entraînant l'infertilité de l'Homme (*hypospadias*, malformation de l'utérus, etc...). Cependant, la prévalence des malformations en France est restée relativement stable sur les 20 dernières années (Figure 25).

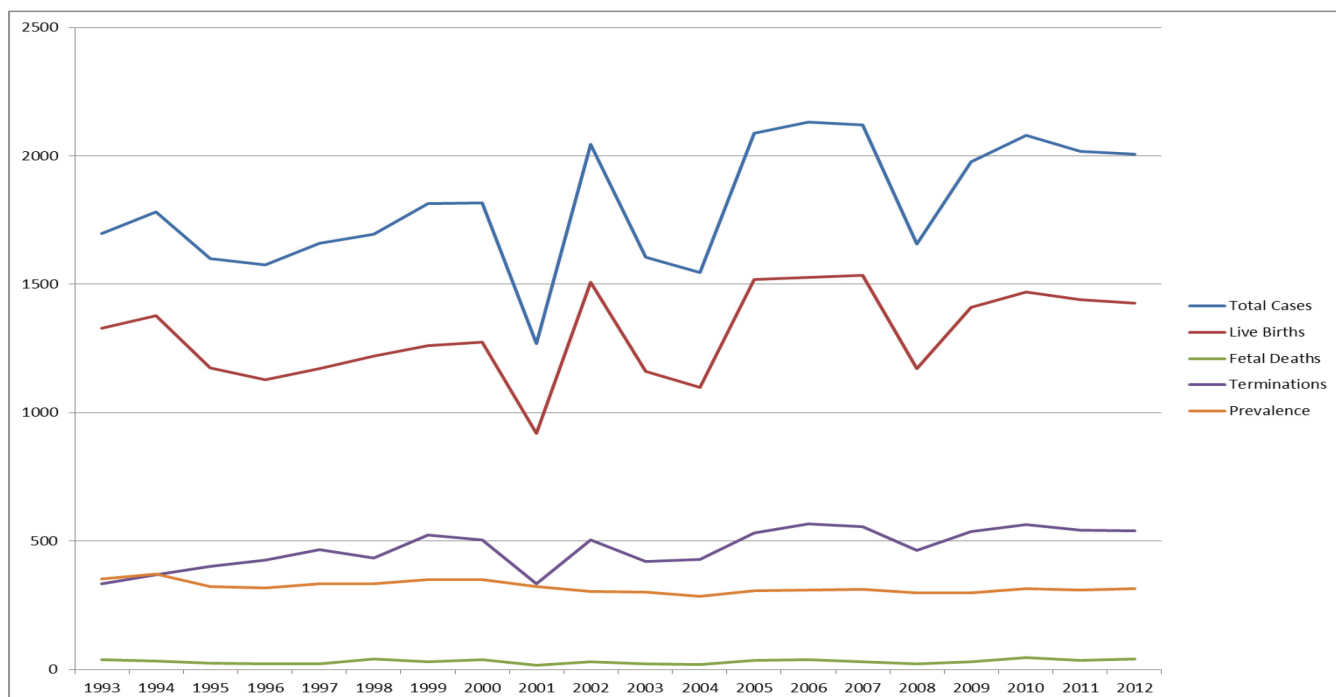


Figure 25 : Évolution du nombre et de la prévalence de malformations congénitales de 5 registres français de 1993 à 2012

Source: EUROCAT Website Database: <http://www.eurocat-network.eu/ACCESSPREVALENCEDATA/PrevalenceTables> (data uploaded 06/01/2015)

2.4. Fréquence des malformations chez l'Homme

Il est communément admis qu'environ 3 % des nouveau-nés humains présentent une malformation congénitale majeure nécessitant une attention médicale (les données varient entre 2 à 5% en fonction des sources d'informations). Approximativement un tiers de ces malformations congénitales mettent la vie de ces enfants en péril (Shepard 2010; NRC US 2000). Les malformations congénitales mineures et les malformations fonctionnelles (problèmes neurologiques, comportementaux) peuvent n'être détectés que pendant l'enfance voire à l'âge adulte. Généralement, le pourcentage de malformations ne les intègre pas car leur identification est éloignée de la naissance et parfois difficile à évaluer. Cependant, leur prise en compte dans un pourcentage global de malformations

congénitales augmenterait de manière conséquente le pourcentage de malformations majeures (NRC US 2000).

Ces 3% de malformations congénitales majeures seraient associées à environ :

- 25% à des hérédités multifactorielles (exposition d'individus génétiquement prédisposés à des agents tératogènes) ;
- 5 % à des aberrations chromosomiques ;
- 3 à 10% à des agents tératogènes (Shepard 2010; NRC US 2000).

Les 60 autres % ont une origine encore inconnue (NRC US 2000).

Là aussi, ces estimations varient en fonction des sources d'informations mais restent dans le même ordre de grandeur.

Les malformations congénitales ne sont pas les seuls aléas de la grossesse : plus d'une grossesse sur deux aboutit à un avortement spontané (non cliniquement décelé) à cause d'un défaut d'implantation ou d'aberrations chromosomiques, ou à une fausse-couche. Parmi les enfants nés vivants, environ 3 % présentent une malformation majeure portant atteinte à sa santé ou à sa vie sociale. Les malformations peuvent être détectées dans les 5 premières années de vie de l'enfant. Entre 10 à 20 % des enfants nés vivants présentent des malformations mineures. Plus le niveau économique du pays est élevé, plus les malformations sont à l'origine de la mortalité infantile.

Les malformations congénitales font l'objet d'une classification internationale en fonction de l'organe touché. Elles peuvent être répertoriées dans des registres nationaux et internationaux. Ces enregistrements permettent de connaître la fréquence des différents types de malformation. Par exemple, dans le monde, les malformations cardiaques sont les plus répandues suivies des sténoses du système urinaire, puis celles liées aux maladies génétiques, suivies des malformations du système nerveux. Néanmoins, les enregistrements du nombre de malformations ne semblent pas avoir augmenté au cours des dernières années.

Parmi les 3% de malformations congénitales majeures, 25% seraient dus aux hérédités multifactorielles, 5% aux aberrations chromosomiques et 3 à 10% à des agents tératogènes. Le reste des malformations ont une origine pour l'instant inconnue.

3. Particularités des agents tératogènes

Les toxicologues suivent la loi de Paracelse (XVI^{ème} siècle) : « Toutes les choses sont poison, et rien n'est sans poison ; seule la dose détermine ce qui n'est pas un poison ». Cette loi s'applique également à un agent tératogène mais elle nécessite d'être adaptée pour tenir compte de leurs particularités.

Cependant, comme l'ont montré les cas emblématiques, un agent tératogène a des particularités bien différentes d'une substance toxique classique. Il va agir pendant une fenêtre particulière de sensibilité d'exposition au cours du développement embryonnaire chez certaines espèces.

3.1. Fenêtre de sensibilité d'exposition

Une fenêtre de sensibilité d'exposition correspond à une période spécifique du développement embryo-fœtale pendant laquelle un agent tératogène induira des malformations congénitales.

Cette fenêtre de sensibilité peut être une période de l'organogénèse correspondant à la formation d'un ou plusieurs organes. Elle peut être courte ou longue en fonction de l'agent tératogène mais aussi en fonction de l'organe cible dont la formation peut-être plus ou moins lente (Figure 19) (Frias & Gilbert-Barness 2008; Vargesson 2015). Par exemple, la fenêtre de sensibilité d'exposition de la Thalidomide est assez courte avec 16 jours (Figure 26). Les fameuses phocomélie apparaissent uniquement lors de la prise de la Thalidomide entre le 24^{ème} et le 34^{ème} jour de grossesse. La fenêtre de sensibilité d'exposition est encore plus courte pour les colobomes oculaires : entre le 24^{ème} et le 26^{ème} jour de grossesse.

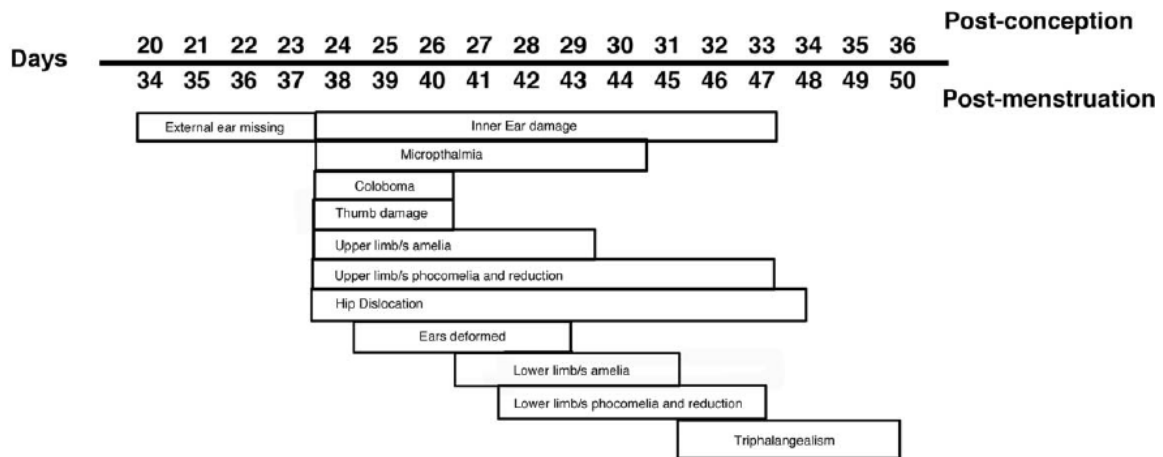


Figure 26 : Fenêtre de sensibilité d'exposition à la Thalidomide

Source : Vargesson 2015

Si l'exposition à un agent tératogène a lieu en dehors de sa fenêtre de sensibilité d'exposition, il n'induit pas de malformation. Ainsi, un agent tératogène ne peut plus interférer avec la mise en place d'un organe si celle-ci a déjà eu lieu.

Des agents tératogènes actifs pendant la même fenêtre de sensibilité ne conduisent pas forcément aux mêmes malformations. Ceci peut s'expliquer si cette fenêtre de sensibilité correspond à la formation de plusieurs organes en parallèle et si les agents tératogènes agissent selon des modes d'action différents.

Un agent tératogène peut également être actif pendant plusieurs fenêtres d'exposition et donner tout un spectre de malformations congénitales.

Ces fenêtres de sensibilité sont bien définies pour plusieurs substances chimiques et médicaments. C'est le cas notamment de la Thalidomide et du DES (Tableau 7). Dans le cas de la rubéole, une exposition lors des deux premiers mois de grossesse entraîne majoritairement une cataracte ou des malformations cardiaques alors qu'une exposition pendant les deux mois suivants entraîne une surdité.

Tableau 7 : Impact de la période d'exposition de quelques tératogènes humains sur l'apparition de malformations

Source : Gilbert-Barnes 2010

Teratogen	Fertilization Age (days)	Malformation
Rubella virus	0-60	Cataract or heart diseases more likely
	0->129	Deafness
Thalidomide	21-40	Reduction defects of extremities
Hyperthermia	18-30	Anencephaly
Male hormones (androgens)	<90	Clitoral hypertrophy and labial fusion
	>90	Clitoral hypertrophy
Warfarin (coumadin)	<100	Hypoplasia of nose and stippling of epiphyses
Diethylstilbestrol	>100	Possible mental retardation
	>14	50% vaginal adenosis
	>98	30% vaginal adenosis
	>126	10% vaginal adenosis
Radioiodine therapy	>65-70	Fetal thyroidectomy
Goitrogens and iodides	>180	Fetal goiter
Tetracycline	>120	Dental enamel staining of primary teeth
	>150	Staining of crowns of permanent teeth

Dans le cas d'un agent tératogène, la loi de Paracelse doit être complétée : un agent tératogène agit à une gamme de concentrations particulière et selon des fenêtres de sensibilité d'exposition.

3.2. Spécificité vis-à-vis des espèces

Une deuxième particularité des agents tératogènes est leur spécificité à certaines espèces. La Thalidomide en est l'archétype : elle n'est pas tératogène chez les rongeurs (espèces classiques d'études toxicologiques), mais elle est tératogène chez les primates et

le lapin (lagomorphe). Une des hypothèses expliquant cette différence est que la souris métabolise plus rapidement la Thalidomide que l'Homme, ce qui accélérerait son élimination. Si une substance s'avère non tératogène chez une espèce animale, cela ne signifie pas qu'elle ne le sera pas chez l'Homme.

Cependant, il est estimé que plus de 80% des agents tératogènes humains causent également des malformations congénitales chez au moins une espèce d'animal de laboratoire (NRC US 2000). Ceci s'explique par l'existence de similitudes dans le contrôle des grandes étapes du développement embryonnaire (clivage, gastrulation, neurulation et organogénèse) chez les vertébrés.

Les agents tératogènes répondent à la loi de Karnofsky : « Un agent tératogène est actif pour une espèce donnée, une fenêtre d'exposition donnée et une dose donnée » (Frias & Gilbert-Barness 2008; Shanks et al. 2009; Grandjean et al. 2008). Brent va encore un peu plus loin dans la définition d'un agent tératogène : il doit être caractérisé par sa dose, sa voie d'administration, le stade de la grossesse, la durée d'exposition, la susceptibilité génétique de la mère et de l'embryon ou fœtus ainsi que l'existence et la nature d'expositions concomitantes (Brent 2010; Brent 2001). Cette loi est très précise et juste mais difficilement applicable.

4. Nature des agents tératogènes

Un agent tératogène peut être de nature très variée : physique, biologique ou chimique. L'exposition à un agent tératogène peut avoir lieu pré-conception (le parent est exposé, devient porteur et transmet l'effet à l'enfant lors de la conception) ou post-conception (l'enfant est directement exposé *in utero* à l'agent tératogène).

La 13^{ème} édition du « Catalog of teratogenic agents » du Dr Shepard liste plus de 1 500 agents pouvant induire des malformations congénitales chez l'animal. Seulement une quarantaine d'entre eux sont connus pour induire également des malformations chez l'Homme (Shepard 2010).

Dans cette partie, ne seront cités que les agents tératogènes reconnus chez l'Homme dans au moins 2 des 3 sources de référence suivantes :

- "Catalog of teratogenic agents" 13^{ème} édition de Shepard (2010) ;
- "The cause and prevention of human birth defects: What have we learned in the past 50 years?" de Brent (2001) ;

- “Developmental and reproductive toxicology” de Stadler (2011).

Le risque physique des rayons ionisants avérés tératogènes chez l’Homme ne sera pas traité dans ce manuscrit car cette nature d’agent tératogène est trop éloigné de notre thématique.

4.1. Biologique

L’origine biologique des agents tératogènes est la plus évidente : les parents transmettent à l’enfant leur patrimoine génétique. L’enfant peut alors hériter d’une maladie génétique, il peut également y avoir un mauvais remaniement des chromosomes ou bien une mutation génétique ou encore des modifications épigénétiques. L’état de santé de la mère peut également altérer le développement de l’enfant ainsi que les infections qu’elle pourrait lui transmettre.

4.1.1. Génétique

Chaque année, 7,9 millions d’enfants (6 % des naissances mondiales) naissent avec une malformation congénitale ayant une origine génétique ou partiellement génétique (Christianson et al. 2006).

4.1.1.1. Maladies génétiques monofactorielles

Chez les organismes diploïdes comme les vertébrés (dont l’Homme), chaque cellule du corps contient deux copies du génome (Figure 27). C’est-à-dire que chaque cellule somatique contient deux copies de chaque chromosome et deux copies de chaque gène. L’exception à cette règle sont les chromosomes sexuels : l’homme possède un chromosome X et un chromosome Y (XY) et la femme possède deux chromosomes (XX). Les paires de chromosomes n’intervenant pas dans la détermination du sexe sont dits autosomes. L’Homme possède 46 chromosomes : 22 paires d’autosomes et une paire de chromosomes sexuels (X et Y).

Les gènes se trouvent à un endroit spécifique du chromosome : le locus. Pour un même gène, il existe plusieurs séquences : les allèles. Les organismes diploïdes possèdent donc deux allèles de chaque gène situé sur les autosomes : un hérité de la mère, un hérité du père.

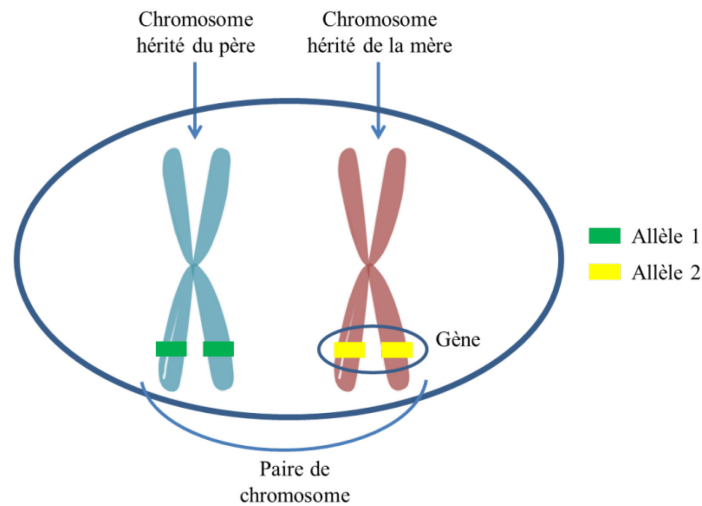


Figure 27 : Chromosomes d'une cellule somatique diploïde

Un individu possédant deux copies identiques d'un même allèle est homozygote pour cet allèle. S'il possède deux copies différentes, il est hétérozygote pour cet allèle. Lors de la transmission du génome, le mode de transmission génétique sera différent en fonction de sa localisation ou non sur un autosome mais aussi en fonction de son caractère dominant ou récessif.

C'est cette transmission du patrimoine génétique, qui va entraîner des maladies génétiques monofactorielles pouvant entraîner des malformations congénitales. Ces maladies suivent les lois de Mendel. Les malformations résultant de ces maladies ne représentent que moins d'un tiers des cas de malformations congénitales. Ces maladies peuvent être transmises de différentes manières en fonction des configurations génétiques (Figure 28).

Les maladies génétiques autosomiques dominantes sont transmises avec une probabilité de 50% aux enfants si le parent « responsable » de la maladie est hétérozygote pour l'allèle de la maladie. La probabilité de transmission est de 100% si le parent « responsable » de la maladie est homozygote pour cet allèle. Dans ce cas, l'allèle responsable de la maladie est dominant : même si un enfant porteur de cet allèle est hétérozygote, la maladie s'exprimera. Un exemple de maladie génétique autosomique dominante est l'achondroplasie. Il s'agit d'une maladie constitutionnelle de l'os donnant la forme la plus commune de nanisme. L'achondroplasie est caractérisée par une rhizomélie (racine des membres raccourcie), avec humérus (épaule, bras) et fémur (hanche, cuisse) relativement plus courts que l'extrémité du membre (avant-bras, main et jambe, pied). La croissance des os de la face est également perturbée.

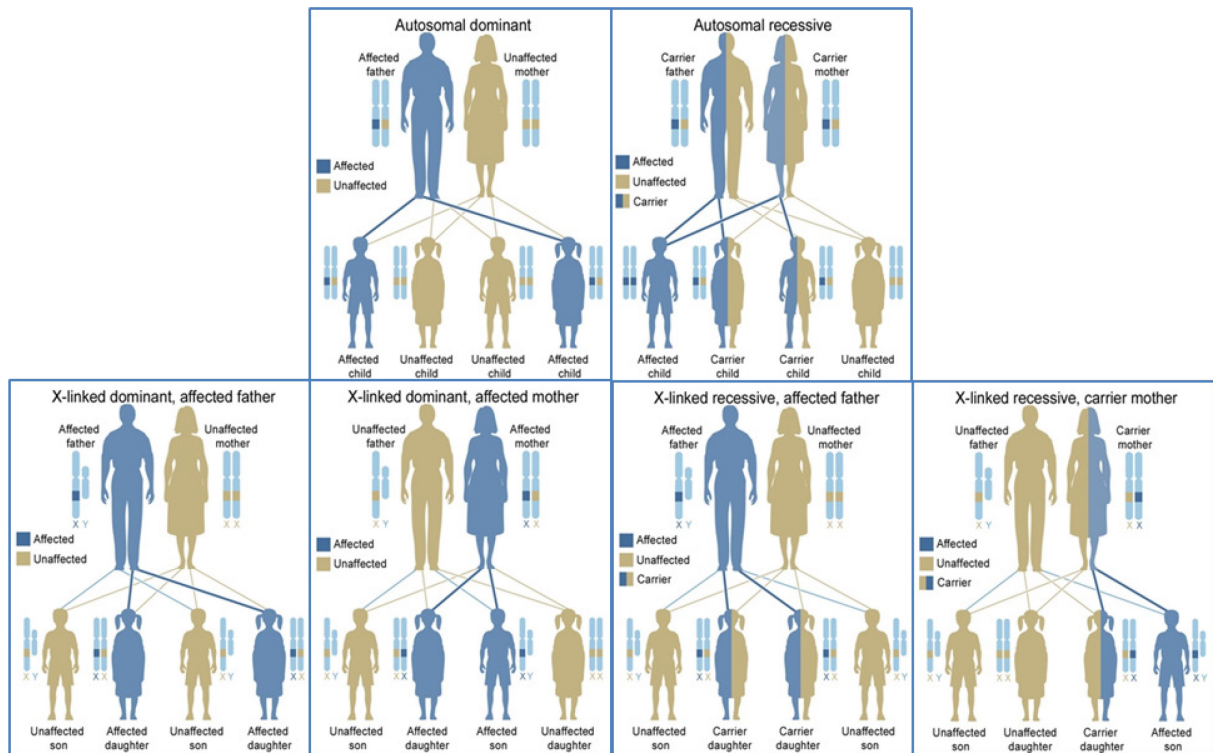


Figure 28 : Différents types d'héritages génétiques suivant la loi de Mendel

Source : adapté de U.S. National Library of Medicine

Les maladies génétiques autosomiques récessives sont transmises avec une probabilité de 25% aux enfants. Dans ce cas, pour développer la maladie, l'enfant doit être homozygote pour l'allèle mis en cause. 50% des enfants seront porteurs sains de la maladie. Un exemple de maladie génétique autosomique récessive est la phénylcétonurie. Cette maladie entraîne un dysfonctionnement de la phénylalanine hydroxylase. En conséquence, la phénylalanine s'accumule dans le sang et entraîne une arriération mentale (oligophrénie phénylpyruvique) progressive, une microcéphalie, un Retard de Croissance Intra-Utérine (RCIU) et une dislocation des hanches (Shepard 2010).

Les maladies génétiques dominantes liées au chromosome X touchent plus souvent les femmes que les hommes : un père porteur de la maladie la transmettra à toutes ses filles, une mère atteinte aura 50% de risque de transmettre la maladie à ses enfants. Le Syndrome du X fragile fait partie des quelques maladies concernées. Il se traduit par un retard mental plus ou moins sévère, de l'autisme et de gros testicules (macro-orchidie) chez les garçons.

Les maladies génétiques récessives liées au chromosome X touchent plus souvent les hommes que les femmes : un père atteint le transmettra à toutes ses filles, celles-ci seront porteuses saines. Une mère atteinte aura 50% de risque de transmettre l'allèle morbide à sa fille, celle-ci sera porteuse saine. La mère atteinte aura également 50% de risque de transmettre la maladie à son fils. Le Syndrome de Lowe fait partie de ce type de

maladie génétique. Il se traduit par des atteintes des yeux (glaucome, strabisme et lésion de la cornée), des reins et du cerveau (retard du développement psychomoteur, troubles du comportement, épilepsie, hypotonie musculaire et retard de croissance).

Les maladies génétiques monofactorielles peuvent également avoir pour origine les aberrations chromosomiques. Elles peuvent se produire avant, pendant, ou après la conception. Elles sont généralement dues à un mauvais arrangement des chromosomes chez les gamètes de l'un des deux parents avant la conception.

Les aberrations chromosomiques peuvent altérer le nombre de chromosomes (Figure 29). La perte d'un chromosome entier conduit à une monosomie et la duplication d'un chromosome amènent à une trisomie. Ces deux formes d'anomalies chromosomiques conduisent à un nombre aberrant de chromosomes, qu'on décrit aussi comme aneuploïdie. Elles résultent d'une non-disjonction survenue au cours de la méiose durant l'ovogenèse ou la spermatogenèse. Comme la méiose se déroule en 2 étapes, une anomalie de la ségrégation des chromosomes peut avoir lieu lors de la première division, mais aussi lors de la seconde division.

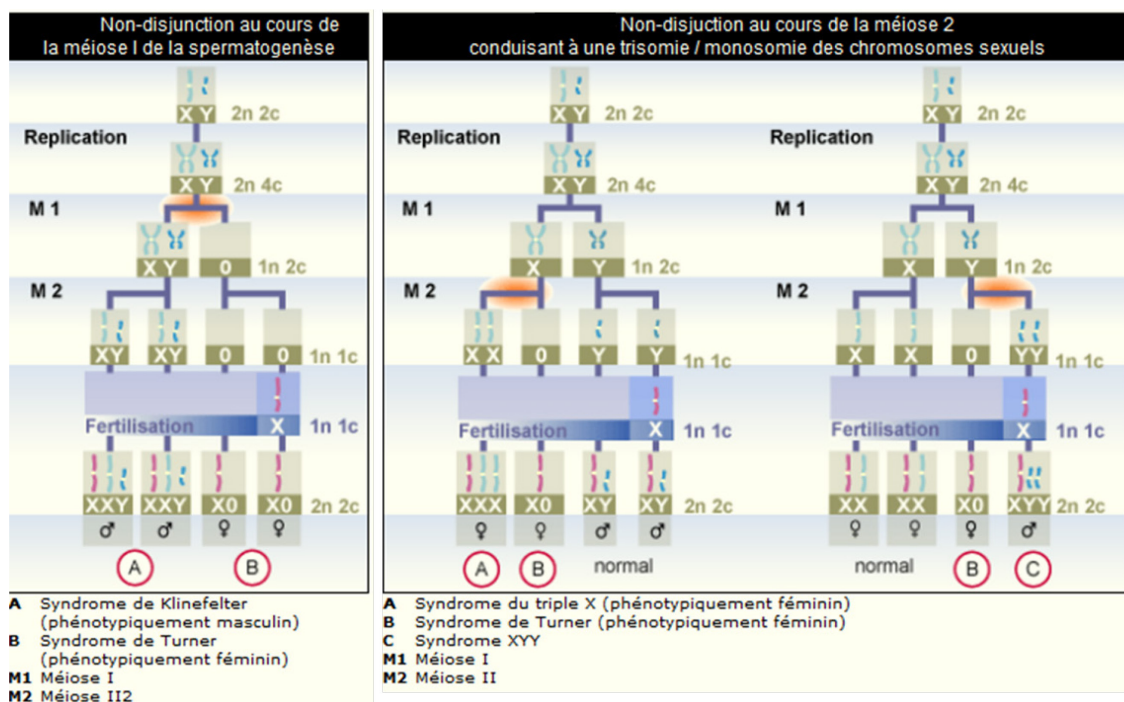


Figure 29 : Exemples de mécanismes d'altération du nombre de chromosomes au cours de la méiose

Source : Campus Virtuel Suisse

Les trisomies les plus courantes concernent les chromosomes 13, 18 et 21. Ces trisomies se caractérisent par une microcéphalie, une microphthalmie avec colobome, une fente palatine, une polydactylie ainsi que des malformations du cœur et des reins. Le taux de mortalité est de 80-90 % durant la 1ère année. Les trisomies partielles des chromosomes

sexuels sont relativement fréquentes (XXX, XXY ou XYY) et sont viables. Les monosomies sont en général létales, exception faite du syndrome de Turner (Figure 31).

La deuxième aberration chromosomique concerne leur structure. Les anomalies de structure sont le résultat de cassures des chromosomes durant la méiose (Figure 30). Une délétion, une duplication ou la formation d'un isochromosome (chromosome ayant perdu un de ses bras remplacé par l'exacte copie de l'autre) se traduiront par un phénotype anormal, tandis que l'insertion, l'inversion, ainsi que la translocation peuvent être équilibrées. Ceci signifie que les porteurs de ces anomalies de structure peuvent être phénotypiquement sains, car la totalité du matériel génétique est présente.

Une délétion peut avoir lieu dans n'importe quel chromosome et peut atteindre n'importe quelle grandeur. Les conséquences d'une délétion dépendent de sa longueur et des gènes qui sont amputés. Une délétion partielle du bras court du chromosome 5 est responsable de la maladie du Cri du chat. Cette maladie est caractérisée par une microcéphalie, un retard mental et psychomoteur sévère ainsi qu'une déficience cardiaque.

Une duplication désigne un fragment chromosomique dédoublé. La duplication est parfois décrite comme une "trisomie partielle". Lorsqu'il y a duplication, la personne possède 3 copies du gène qui se trouve dans le segment touché. Une duplication peut aboutir au Syndrome de l'X fragile.

Une inversion résulte de la cassure d'un fragment de chromosome, suivie d'une rotation de 180° de ce même fragment, puis de sa réintégration dans le même chromosome. Le phénotype associé à ce type de réarrangement est souvent invisible, étant donné qu'aucune information n'a été perdue. Lorsque la région touchée inclut le centromère, on parle de duplication péricentrique, par opposition à la duplication paracentrique.

Une insertion résulte de l'intégration d'un fragment de chromosome à un autre endroit que son lieu d'origine. Les porteurs d'une insertion peuvent être phénotypiquement sains, car aucune information n'a été perdue.

La formation d'un isochromosome est une malformation chromosomique relativement fréquente au niveau du chromosome X. Elle résulte de la division transversale et non pas longitudinale. L'isochromosome ainsi constitué a soit 2 bras courts, soit 2 bras longs. Les personnes qui présentent cette anomalie du chromosome X ont le même phénotype que les patients atteints du syndrome de Turner (45, X0). Ceci est dû au fait qu'un bras du chromosome X est manquant.

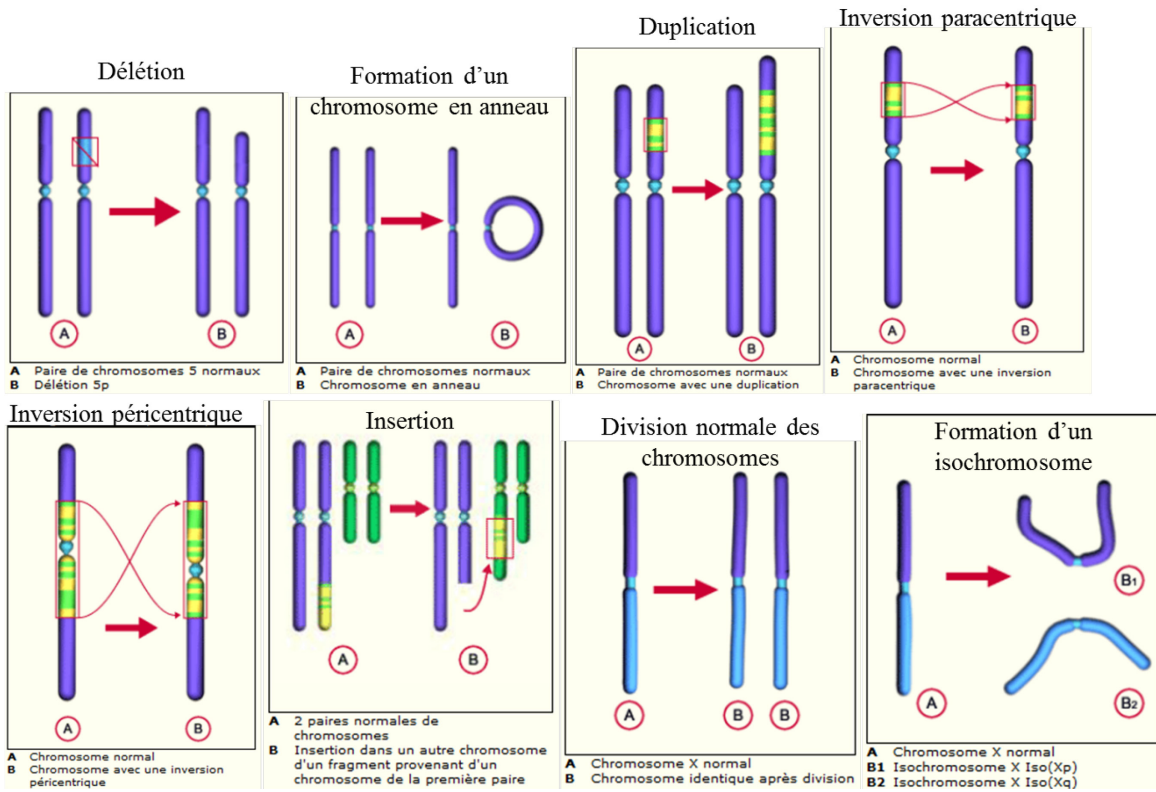


Figure 30 : Exemples de mécanismes altération la structure des chromosomes

Source : Campus Virtuel Suisse

Pour résumer, les enfants souffrant d'aberrations chromosomiques présentent souvent de multiples malformations généralement associées à un retard mental. Par ailleurs, la grande majorité des aberrations chromosomiques entraîne des avortements spontanés (Figure 31).

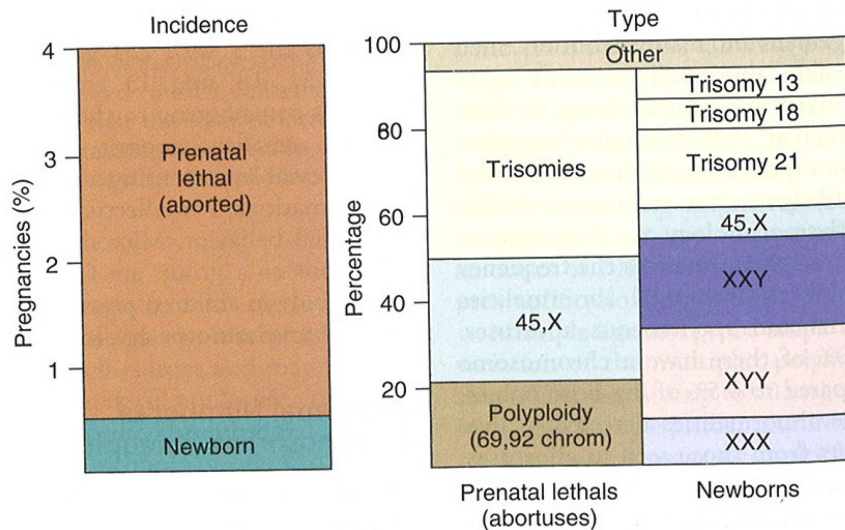


Figure 31 : Incidence et types d'anomalies chromosomiques

Source : Jones et al. 2013

Dans sa 13^{ème} édition du Catalog of teratogenic agents, Shepard liste plus de 400 gènes dans les formes mutées sont associées des malformations congénitales (Shepard 2010). On peut citer le gène *Pax3*, un gène crucial pour la fermeture du tube neural et la formation de la crête neurale. Il est notamment impliqué dans le Syndrome de Waardenburg (maladie génétique de transmission autosomique dominante) associant une surdité avec des anomalies de la pigmentation de la peau, des cheveux ou de l'iris. Le gène Sox11 est aussi list  : il est également impliqué dans le développement du système nerveux et est responsable du Syndrome de Coffin-Siris caractérisé par une microcéphalie, un retard de croissance, une hypotonie, une hyperlaxité ligamentaire et une hypertrichose.

L'expression des gènes peut être altérée par des mutations (modification de la séquence d'ADN) mais aussi par des modifications de la structure de l'ADN. L'ensemble de ces modifications de l'expression des gènes peuvent être transmises à la génération suivante. Dans le deuxième cas, on parle alors d'empreinte épigénétique.

4.1.1.2.  pig n tisme

Comme cela a déjà été évoqué, certains agents tératogènes comme le DES peuvent entraîner des modifications épigénétiques.

L' pig n tisme est l'étude des changements réversibles de l'activité des gènes, en l'absence de modification de la séquence d'ADN par la méthylation / déméthylation, la modification des histones ou encore l'expression d'ARN non codants.

Un agent tératogène peut modifier la structure de l'ADN par des mécanismes épigénétiques et ainsi entraîner le dysfonctionnement d'organes ou de tissus et augmenter la prédisposition aux maladies. Ces modifications épigénétiques peuvent également être transmises aux générations successives par le phénomène d'empreinte parentale (Figure 32).

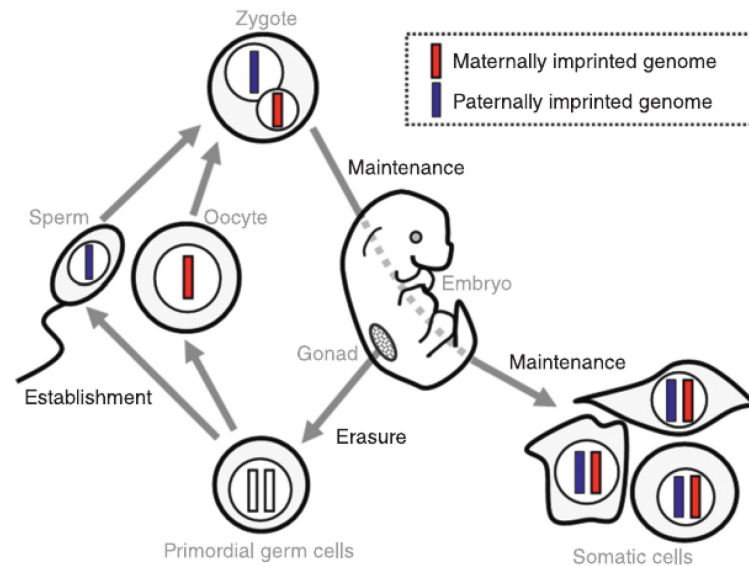


Figure 1. Establishment, maintenance and erasure of parental imprints
 DNA methylation imprints are established at ICRs during oogenesis (maternal imprints) or spermatogenesis (paternal imprints). After fertilization, parental imprints are maintained in all somatic cells and tissues throughout development. Conversely, in the newly forming germ cells of the embryo, they are erased and methylation imprints will become established later during gametogenesis, according to the sex of the embryo.

Figure 32 : Établissement, maintenance et effacement des empreintes parentales
Source : Hirasawa & Feil 2010

Dans le cas des agents tératogènes, l'inactivation d'un allèle par des mécanismes épigénétiques doit avoir lieu dans les gonades ou pendant la gamétogénèse, puis cette empreinte est maintenue dans l'ensemble des cellules (somatiques et germinales) de la descendance. Cette empreinte épigénétique est ainsi transmise de générations en générations. Chez l'Homme, la plupart des gènes soumis à empreinte sont localisés sur les chromosomes 6, 7, 14 et 15 (Tableau 8) (Hirasawa & Feil 2010). Le Syndrome de Prader-Willi est une maladie soumise à empreinte parentale avec l'inactivation d'un allèle du chromosome 15. Il est caractérisé par un retard mental, un retard de développement une hypotonie à la naissance, un hypogonadisme, un retard de puberté, de l'infertilité, une hyperphagie, des troubles obsessionnels compulsifs et des pieds et des mains de petite taille.

L'obésité, le stress mais aussi l'exposition au Bisphénol A (BPA) seraient associés à des effets transgénérationnels provoqués par des modifications épigénétiques (Tableau 9). Par exemple, l'exposition au BPA entraînerait des malformations des testicules à la 3^{ème} génération. De même, l'exposition à une dioxine entraînerait des malformations de l'utérus à la 3^{ème} génération (Guerrero-Bosagna & Skinner 2012).

Tableau 8 : Exemples d'altérations génétiques et épigénétiques impliquées dans des pathologies humaines

Source : (Hirasawa & Feil 2010)

Disease	Characteristics	Chromosomal region	Genes involved	Major causes
AS	Neurological disorder	15q11-13	UBE3A	Maternal 15q11-13 deletion, paternal UPD15, mutations at the UBE3A gene, imprinting defects at the SNRPN ICR
PWS	Neuro-developmental disorder	15q11-13	SNRPN, NDN	Paternal 15q11-13 deletion, maternal UPD15, imprint alterations at the SNRPN ICR
BWS	Growth disorder	11p15	IGF2, CDKN1C	Paternal UPD11, loss of methylation at KvDMR1 ICR, mutations in CDKN1C gene, gain of methylation at the H19-IGF2 ICR, translocations affecting 11p15
SRS	Growth retardation	11p15 7p12	IGF2, GRB10?	Maternal duplication of 11p15, loss of methylation at the IGF2-H19 ICR maternal UPD7, 7p duplications
TNDM	Hormonal and metabolic disorder	6q24 6p22	PLAGL1, ZFP57	Paternal UPD6, paternal duplication of 6q24 region, mutations in the ZFP57 gene
Maternal UPD14 syndrome	Developmental disorders	14q32	RTL1, DLK1	Imprinting errors at 14q32 maternal UPD14
Paternal UPD14 syndrome	Developmental disorders	14q32	RTL1	Imprinting errors at 14q32 paternal UPD14
AHO, PHP	Hormonal and metabolic disorder	20q13	GNAS	Imprinting errors and mutations at the GNAS locus

Tableau 9 : Exemples d'hérédité transgénérationnelle épigénétique

Source : (Guerrero-Bosagna & Skinner 2012)

Environmentally induced transgenerational inheritance	Reference
Vinclozolin induced epigenetic transgenerational adult onset disease in rats (F1-F4)	Anway et al. (2005)
Transgenerational response in longevity to nutrition (F0-F2)	Kaati et al. (2007)
Tumor susceptibility in <i>Drosophila</i> (F1-F3)	Xing et al. (2007)
Nutrition induced transgenerational obesity in mice (F1-F3)	Waterland et al. (2008)
BPA-induced transgenerational testicular abnormality (F1-F3)	Salian et al. (2009)
Stem cell culture induced adult onset disease (F0-F4)	Lee et al. (2009)
Dioxin induced transgenerational uterine abnormality (F1-F4)	Bruner-Tran and Osteen (2010)
Stress induced behavior alterations (F0-F2)	Matthews and Phillips (2010)
Transgenerational glucose intolerance (F0-F2)	Pentinat et al. (2010)
Transgenerational effects of morphine or thyroxine on hippocampus, birth weight and behavior (F0-F3)	Vyssotski (2011)
Transgenerational effects of chemotherapy in mice (F0-F6)	Kujjo et al. (2011)
Transgenerational effects of obesity on female body size (F0-F3)	Dunn and Bale (2011)

4.1.1.3. Hérité multifactorielle

Lorsque les lois de Mendel ne sont pas applicables pour expliquer l'apparition d'une maladie génétique ou de malformations, d'autres facteurs peuvent être impliqués. Il s'agit de la prédisposition liée à des facteurs déclenchants, aggravants, internes (poids, taille, genre, ...) ou externes (alimentation, médicaments, agent infectieux, substance chimique, ...).

Il existe plus de 7 000 malformations congénitales différentes d'origine génétique ou partiellement génétique (Christianson et al. 2006; Brent 2001). Parmi les malformations congénitales d'origine multifactorielle se trouvent les fentes palatines, la sténose du pylore (occlusion de l'estomac) et les malformations du tube neural (*spina bifida* et anencéphalie).

Les facteurs génétiques et environnementaux spécifiques de la plupart de ces malformations n'ont pas encore été déterminés (NRC US 2000).

4.1.2. Déficiences maternelles

L'état de santé de la mère peut également entraîner des malformations congénitales notamment si elle est en déficit d'un élément essentiel au développement de l'enfant comme l'acide folique ou l'iode.

4.1.2.1. Acide folique

L'acide folique (vitamine B9) est un précurseur métabolique d'une coenzyme, le tétrahydrofolate. Cette dernière est impliquée notamment dans la synthèse des bases nucléiques, purines et pyrimidines. Elle est par conséquent nécessaire à la division et au maintien cellulaire. Une déficience en acide folique pendant la grossesse entraîne notamment des malformations du tube neural comme des fentes labiales et des *spina bifida* mais aussi des malformations cardiaques et des troubles du spectre autistique (Christianson et al. 2006). Le mode d'action exact par lequel le déficit en acide folique entraîne des *spina bifida* n'est pas connu mais elles peuvent être évitées par la supplémentation en folates durant le premier trimestre de la grossesse.

4.1.2.2. Iode

L'iode est un composant des hormones thyroïdiennes et notamment de la thyroxine (T4). En cas de déficience en début de grossesse, le taux de la T4 diminue ce qui entraîne de l'hypothyroïdisme chez le fœtus. L'enfant peut alors souffrir de crétinisme. Ceci se caractérise par un arrêt du développement mental et moteur à une période variable de la croissance de l'enfant, ce qui entraîne un nanisme disharmonieux. D'autres critères physiques sont décrits comme la macroglossie avec protrusion, la malocclusion dentaire, la béance intermaxillaire, la surdité ou le strabisme. La déficience en iode peut également entraîner une naissance prématurée et une augmentation de la mortalité périnatale et infantile (Christianson et al. 2006). Cette déficience et ses conséquences peuvent être évitées par la supplémentation du sel de table en iode.

4.1.3. Infections

Certaines maladies de la mère d'origine bactérienne, virale et parasitaire peuvent être transmises au fœtus et causer des malformations. Ces maladies sont bien connues et facilement prises en charge ou évitables lorsque le système de santé le permet.

Les infections transmissibles au fœtus cités ci-dessous (Tableau 10) mettent en jeu le diagnostic vital. La quasi-totalité peut entraîner un retard mental, des malformations oculaires ou auditives.

Tableau 10 : Maladies infectieuses entraînant chez le fœtus des malformations

Maladie infectieuse	Type d'infection	Effets reprotoxiques dont tératogènes	Références
Rubéole	virale	retard mental, malformation cardiaque, cécités, trouble de l'audition, prématurité, avortement	(Christianson et al. 2006)
Varicelle	virale	microcéphalie, retard mental, cécité, convulsion, malformation musculosquelettique, des jambes	(Gilbert-Barness 2010; Christianson et al. 2006)
Parvovirus	virale	Malformation cardiaque, oculaire, des muscles, anémie, mort fœtale	(Polifka & Friedman 1999; Brent 2001; Christianson et al. 2006; Gilbert-Barness 2010)
Cytomegalo virus	virale	retard mental, trouble oculaire, malformation des dents, surdité progressive	(Christianson et al. 2006)
Herpès génital	virale	microcéphalie, retard mental, convulsion	(Christianson et al. 2006)
Syphilis	bactérienne	atteinte cérébrale, cécité, surdité, malformations dentaire, osseux, mort néonatale	(Christianson et al. 2006)
Toxoplasmose	parasitaire	retard mental, déficit visuel, convulsion	(Gilbert-Barness 2010)

4.2. Chimique

Les agents tératogènes d'origine chimique sont les plus connus avec les médicaments, les biocides et les contaminants environnementaux.

4.2.1. Médicaments

Les agents avérés tératogènes chez l'Homme peuvent être trouvés dans une grande variété de familles de médicaments (Tableau 11).

Tableau 11 : Exemples de médicaments tératogènes chez l'Homme avec leurs effets

Famille de médicament	Indication	Exemples de tératogène pour l'Homme	Exemples d'effets reprotoxiques dont tératogènes	Références
Antimétabolites / antinéoplasiques	Cancer	Thalidomide Méthotrexate Aminoptérine Cyclophosphamide Cytarabine Busulfan	Anencéphalie, hydrocéphalie, microcéphalie, méningoencéphalocèle, retard mental, fente palatine, fente labiale, <i>hypospadias</i> , phocomélie, ectrodactylie, malformation cardiaque, retard de croissance, ...	(Brent 2001 ; Shepard 2010; Hyoun et al. 2012; Vargesson 2015)
Antiépileptiques	Épilepsie	Phénytoïne Triméthadione Paraméthadione Acide valproïque Carbamazépine Phénobarbital	microcéphalie, méningoencéphalocèle, <i>spina bifida</i> , fentes labiales, malformations cardiaques, agénésie rénale, absence d'urètre, hypertélorisme, épicanthus, hypoplasie des phalanges distales et des ongles, ...	(Orgogozo & Loiseau 1977; Shepard 2010; Polifka & Friedman 1999)
Anti-acnéiques	Acné	Isotretinoïne Etrétinate	hydrocéphalies, microcéphalies, Tétralogie de Fallot, microtie, otite	(Brent 2001; Polifka & Friedman 1999)
Traitements hormonaux	Stérilité / Grossesse	DES Danazol Méthimazole	anomalie de l'utérus, <i>hypospadias</i> , cryptorchidie, hypotrophie testiculaire, oligospermie, cancer du vagin et de l'utérus, masculinisation des filles, <i>aplasia cutis congenita</i>	(Shepard 2010; Brent 2001)

Inhibiteurs de l'enzyme de conversion et antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II	Hypertension artérielle	Captopril Enalapril	hypotension fœtale, insuffisance rénale, anurie, oligoamnios, hypoplasie pulmonaire, avortements, fausses couches, ...	(Brent 2001; Gilbert-Barness 2010; Capelari et al. 2012)
Prostaglandines	Ulcère / IVG	Misoprostol	Anomalie de Moebius, malformation des membres, mort fœtale, ...	(Polifka & Friedman 1999)
Antibiotiques / antifongiques	Infection bactérienne / fongique	Tétracyclines Fluconazole	coloration des os et des dents, fentes palatines, malformation des oreilles, déformation du crâne, atrésie des choanes	(Brent 2001; Stadler 2011)
Anticoagulants	Troubles thrombo-emboliques	Coumarine	risque hémorragiques, hypoplasie nasale, RCIU, malformation du CNS	(Brent 2001; Polifka & Friedman 1999)
Antidépresseurs	Troubles bipolaires	Lithium	anomalie d'Ebstein	(Brent 2001; Orgogozo & Loiseau 1977)
Chélateurs	Empoisonnement	pénicillamine	<i>cutis laxa</i> , hyperflexibilité des cartilages	(Brent 2001)
Psychotrope	NA	Cocaïne Alcool	microcéphalie, raccourcissements des membres, malformation vasculaire, de la face, RCIU, fausse-couche, prématurité, mort subite du nourrisson	(Brent 2001; Polifka & Friedman 1999)

Les anti-métaboliques / antinéoplasiques servent à lutter contre différents cancers et ont plusieurs effets secondaires néfastes comme la tératogénicité. Cette famille de médicaments peut induire un spectre large de malformations touchant le cerveau, les membres, le palais, le cœur ou encore l'appareil reproducteur. Le Cyclophosphamide, utilisé dans les traitements de la leucémie, du cancer du sein, des ovaires, du rétinoblastome et du neuroblastome, est reconnu comme un agent tératogène chez l'Homme.

Les antiépileptiques sont bien connus pour leur potentiel tératogène et induisent aussi un spectre large de malformations. Parmi eux, on peut citer l'acide valproïque qui est également utilisé contre les migraines et les troubles bipolaires. Il entraîne des *spina bifida*, des malformations cardiaques et du tube neural.

Les anti-acnéiques, comme l'isotrétinoïne, peuvent induire des malformations céphaliques, cardiaques et de l'oreille. Les traitements hormonaux vont eux induire des malformations uniquement des glandes endocrines (cas du DES).

Les autres familles de médicaments font moins consensus sur leur caractère tératogène.

Selon le Centre de Référence des Agents Tératogènes, environ 5% des malformations congénitales seraient liées à une cause médicamenteuse.

4.2.2. Biocides

Les biocides sont dispersés de manière volontaire dans notre environnement : habitations, surfaces agricoles... Par leurs usages, ils peuvent de manière indirecte contaminer l'atmosphère, l'eau potable, les sols, les sédiments ainsi que l'alimentation (Figure 33). Par conséquent, les voies d'exposition aux biocides sont la voie orale (ingestion d'aliments ou d'eau contaminés), l'inhalation (pendant l'application du biocide) ou la voie topique (contact avec des surfaces contaminées).

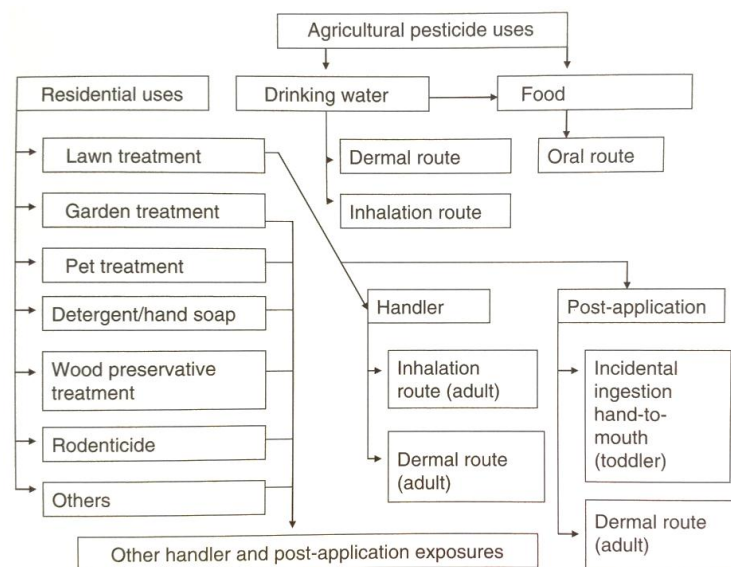


Figure 33 : Exemples de sources et de voies d'exposition aux biocides

Source : Fox & Aoki 2010

Les biocides regroupent les herbicides, les insecticides, les fongicides et les antiparasitaires (Tableau 12). Ces produits létaux pour les nuisibles peuvent être neurotoxiques et / ou des perturbateurs endocriniens mais aussi des agents tératogènes. Par

exemple, l'herbicide diquat entraîne chez la souris une exencéphalie, une anomalie du squelette et une hernie ombilicale. L'insecticide lindane entraîne une atrophie testiculaire chez le rat. Et le fongicide bénomyl entraîne une hydrocéphalie et une microphthalmie chez le rat (Iyer & Makris 2010).

Tableau 12 : Exemples de biocides avec leur mode d'action

Type de Biocide	Cible	Mode(s) d'action / Cibles	Exemples de molécule
Herbicides	Végétaux	perturbation de la photosynthèse, de la croissance, la dérégulation de l'auxine, l'inhibition de la synthèse des lipides, des acides aminés et des caroténoïdes	2,4 D, atrazine, dinoterbe, diquat, diuron, glyphosate, nitrofen, paraquat
Insecticides	Insectes	le système nerveux, la respiration cellulaire, la formation de la cuticule chitineuse, ou la perturbation de la mue	carbaryl, chlordécone, DDT , endosulfan, lindane , nicotine parathion , perméthrine
Fongicides	Champignons parasites des végétaux	respiration mitochondriale, la synthèse des stérols, des acides aminés et la division cellulaire	bénomyl, mancozeb, propiconazole

Parmi ces biocides, les plus préoccupants sont ceux désignés par la convention de Stockholm de 2001 et qualifiés de « dirty dozen » en raison de leur persistance et de leur accumulation dans les organismes et les chaînes alimentaires. Certains sont listés en gras dans le Tableau 12.

4.2.3. *Autres contaminants environnementaux*

D'autres contaminants environnementaux peuvent être tératogènes. En effet, les composés organiques tels que les HAPs (hydrocarbures aromatiques polycycliques), les dioxines, les PFOS (acide perfluorooctanesulfonique et ses dérivés) ou les PCBs (polychlorobiphényles). D'autres métaux lourds que le MeHg peuvent également être tératogènes comme le plomb (Fox & Aoki 2010).

Les métaux lourds peuvent s'accumuler dans la chaîne alimentaire jusqu'à empoisonner l'Homme (cas du méthylmercure de la maladie de Minamata). Un autre métal lourd, le plomb peut causer le saturnisme chez l'enfant mais aussi chez le fœtus : l'empoisonnement de la mère par une alimentation contaminée (gibiers tués avec une balle au plomb et non retirée lors de la cuisson), une pollution atmosphérique (essence au plomb), peut rendre le plomb disponible au fœtus. Le plomb se stocke alors préférentiellement dans les os à la place du calcium et peut être relargué dans la circulation générale des années plus tard. L'exposition prénatale au plomb entraîne des hydrocéphalies,

des cryptorchidies, des hémangiomes, des avortements et des enfants morts nés. (McDermott et al. 2012).

Les PCBs ont été utilisés pendant plus de 40 ans comme fluides isolants, échangeurs thermiques, plastifiants et additifs chimiques. Ces contaminants environnementaux mondiaux sont suspectés d'être des perturbateurs endocriniens (Grandjean et al. 2008). Comme le DDT, les PCBs sont des Polluants Organiques Persistants (POPs) et s'accumulent dans la chaîne alimentaire. Ils sont maintenant notamment retrouvés dans les poissons vivant dans des rivières où étaient rejetés les eaux usées d'usines (Lu et al. 2015). On en retrouve régulièrement des quantités significatives dans des échantillons biologiques humains et animaux, et ce malgré leur interdiction depuis les années 1980 (Parham et al. 2012; Meeker 2010). Comme les PCBs sont trouvés dans des échantillons, certains organismes ont été étudiés comme bioindicateurs du niveau de pollution des cours d'eau. Par exemple, la moule zébrée a permis d'identifier des pollutions en PCBs et en HAPs dans la Seine (Minier et al. 2006). Par ailleurs, les PCBs seraient également très immunotoxiques (Grandjean & Landrigan 2006). Une exposition prénatale aux PCBs peut entraîner des exophtalmies, des hypotonicités, des peaux parchemins avec des desquamations et des décolorations brunes ainsi que des ongles colorés noirs.

Un agent tératogène peut être de nature physique, biologique ou chimique. Il peut induire des malformations chez les espèces animales mais aussi chez l'Homme. Sa voie d'exposition peut être directe comme par la prise d'un médicament mais aussi indirecte comme par une contamination environnementale de notre alimentation due à des biocides, des métaux lourds ou des PCBs par exemple.

5. Voies de signalisation et agents tératogènes

Chaque étape du développement embryonnaire met en jeu différents mécanismes biologiques pour permettre la mise en place et le fonctionnement des différents organes. De manière générale, les cellules ont la capacité de communiquer entre elles soit par contact direct, soit à courte ou longue distance comme dans le cas du système hormonal. Pour chaque type de communication cellulaire correspond une ou plusieurs voies de signalisation. Pour la plupart des voies de signalisation, un ligand se fixe à un récepteur. Cette fixation déclenche une cascade d'évènements intracellulaires, qui aboutissent à la

régulation de l'expression ou de l'activité des protéines. Les voies de signalisation régulent la division, la croissance, la différenciation et la migration cellulaire, mais aussi l'apoptose (mort cellulaire programmée) ou encore la réponse immunitaire.

Au cours du développement embryonnaire, la perturbation de ces voies de signalisation par un agent tératogène peut entraîner l'apparition de malformations structurelles ou fonctionnelles. Une revue de 2007 a étudié les voies de signalisation impliquées au cours des stades préimplantatoires des embryons de mammifères (Figure 34). Par exemple, pendant cette période, la voie de signalisation Wnt/ β -caténine régule la balance entre pluripotence et différenciation des cellules souches embryonnaires. Cette voie de signalisation est également impliquée dans la mise en place de l'axe dorso-ventral de l'embryon (Zhang et al. 2007; Artavanis-Tsakonas & Muskavitch 2010).

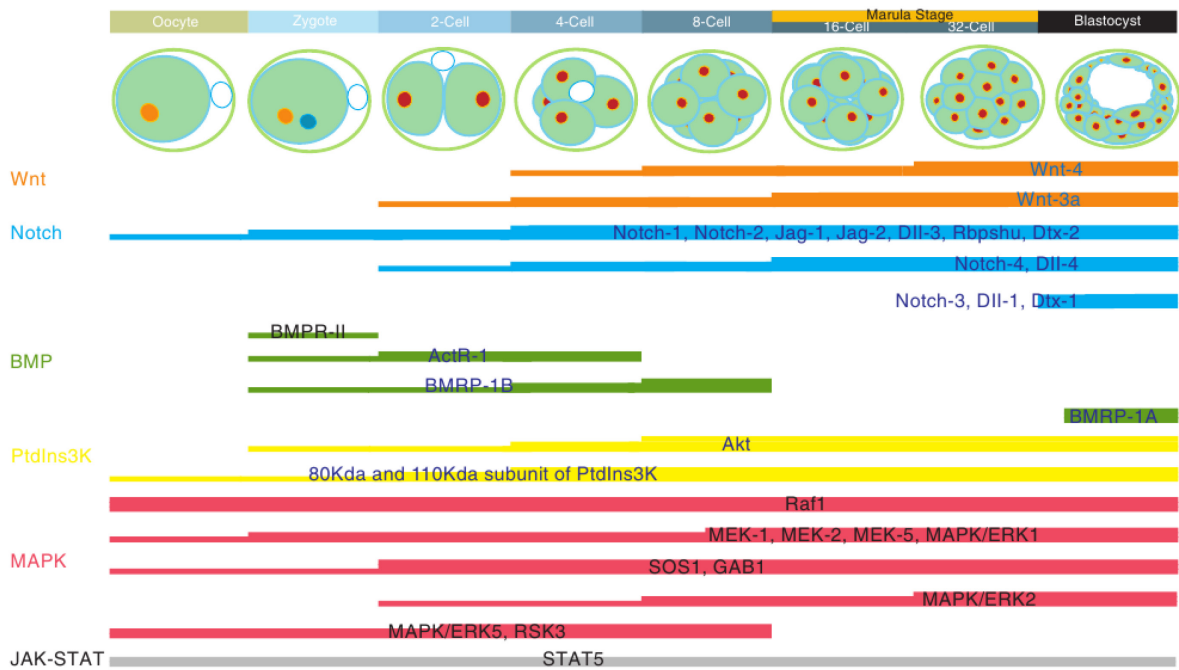


Figure 34 : Exemple chez les embryons de mammifères de voies de signalisation en fonction des stades de développement avant l'implantation

Source : Zhang et al. 2007

Un même agent tératogène peut agir sur une ou plusieurs voies de signalisation. Par exemple, la dexaméthasone agit sur les récepteurs aux glucocorticoïdes et entraîne des fentes palatines (Tableau 13) (NRC US 2000). Le Cyclophosphamide, lui, altère les voies de signalisation cellulaire contrôlant l'apoptose. Ceci peut conduire à l'apparition de syndactylie, par exemple.

Tableau 13 : Exemples de toxicité du développement médiée par des récepteursSource : *National Research Council (US) 2000*

Receptor (official name ^a)	Endogenous Ligands	Developmentally Toxic Ligand and Modifier	Typical Effects	Recent References
<i>Basic Helix-Loop-Helix Transcription Superfamily</i>				
Aryl hydrocarbon AHR	Unknown	Agonists: TCDD and related polycyclics	Cleft palate, hydronephrosis	Couture et al. 1990; Mimura et al. 1997; Abbott et al. 1998
<i>Nuclear Hormone Receptors</i>				
Androgen AR (NR3C4)	Testosterone Dihydro-testosterone	Agonists: 17 α -ethinyl-testosterone and related progestins Antagonists ^b : Flutamide	Agonists: Masculinization of female external genitals Antagonists: Inhibition of Wolffian duct and prostate development and feminization of external genitals in males	Kassim et al. 1997
Estrogen ER α , ER β (NR3A1 and 2)	Estradiol	Agonist: DES Antagonist: tamoxifen, clomiphene—weak	Agonist: various genital-tract defects in males and females	Cunha et al. 1999
Glucocorticoid GR (NR3C1)	Cortisol	Agonists: cortisone, dexamethasone, triamcinolone	Cleft palate	Fawcett et al. 1996
Retinoic acid RAR α , β , and γ (NR1B1, 2, and 3)	All- <i>trans</i> & 9- <i>cis</i> retinoic acids	Agonists: numerous natural and synthetic retinoids Antagonists: BMS493, AGN 193109 and others	Almost all organ systems can be affected	Collins and Mao 1999; Chazaud et al. 1999; Kochhar et al. 1998; Elmazar et al. 1997.
RXR α , β , and γ (NR2B1, 2, and 3)	9- <i>cis</i> retinoic acid			
Thyroid hormone TR α and β (NR1A1 and NR1A2)	Thyroxine (T4 and T3)	Antagonist: nitrophen	Lung, diaphragm, hardierian-gland defects	Brandsma et al. 1994
<i>continues</i>				
<i>Hedgehog Receptor</i> Patched	Sonic, Desert, and Indian Hedgehogs	Veratrum alkaloids: cyclopamine (mechanism unclear)	Cyclopia, holoprosencephaly	Incardona et al. 1998; Cooper et al. 1998
<i>Membrane</i>				
Endothelin receptors A and B	Endothelins 1, 2, and 3	Antagonists: L-753, 037, SB-209670, SB-217242	Craniofacial, thyroid, cardiovascular, intestinal aganglionosis (Hirschsprung's disease)	Spence et al. 1999; Treinen et al. 1999; Gershon 1999a,b
<i>Cation Channels</i>				
Delayed-rectifying IKr	Potassium ion	Inhibitors: almokalant, dofetilide, d-sotalol	Digit, cardiovascular, orofacial clefts	Webster et al. 1996; Wellfelt et al. 1999

^a Nuclear Receptors Committee 1999.^b Also, five α reductase inhibitors (e.g., finasteride) affect prostate and external genitals (Clarke et al. 1993).

Quelques caractéristiques des agents tératogènes ont notamment été comprises par le biais des différents cas emblématiques d'altérations du développement de l'enfant cités dans ce manuscrit.

Pour l'évaluation de la tératogénicité, il est important de retenir que :

- Les agents tératogènes peuvent agir à différentes étapes du développement embryonnaire : gastrulation, neurulation, organogénèse et maturation des organes.
- Ils provoquent des malformations congénitales structurelles et / ou fonctionnelles visibles dès la naissance, à la puberté ou à la génération suivante.
- Tous les organes peuvent être atteints de manière isolée ou associée. Les systèmes cardiaque, urogénital et nerveux sont les plus fréquemment touchés par les malformations congénitales chez l'Homme. Certains agents tératogènes augmentent également la fréquence des avortements, des fausses-couches ou de malformations congénitales spontanées.

Il existe une distinction entre les malformations congénitales majeures, qui ont un effet néfaste pour la santé et la vie sociale de l'individu, et celles mineures, qui ont un impact plus limité. Le jugement d'experts des toxicologues détermine la frontière entre les deux en fonction des données historiques du laboratoire où a été réalisée l'étude. Elles font l'objet d'une codification internationale et sont répertoriées dans des registres nationaux et internationaux. Dans la population mondiale, environ 3% des enfants naissent avec une malformation congénitale majeure et environ 15% avec une malformation congénitale mineure.

Un agent tératogène peut être de natures diverses : physique (radiations ionisantes), biologique (maladies génétiques monofactorielles et hérédité multifactorielle) ou chimique (médicaments, biocides, métaux lourds, POPs, ...). L'exposition des espèces animales et de l'Homme à des agents tératogènes peut être directe par exemple par la prise d'un médicament ou par l'épandage d'un biocide ou indirecte par une contamination environnementale de l'alimentation, de l'eau potable, des sols, de l'atmosphère, etc...

Des milliers de molécules s'avèrent tératogènes chez au moins une espèce animale mais seulement une quarantaine de substances seraient des agents tératogènes chez l'Homme (Shepard 2010; Stadler 2011). A l'heure actuelle, il n'existe pas de liste officielle des agents tératogènes humains. En dehors d'études épidémiologiques pour chaque substance, la classification comme agent tératogène chez l'Homme reste à ce jour un jugement d'expert. De plus, les mécanismes d'action d'un agent tératogène sont partiellement connus. Ils impliquent certainement plusieurs voies de signalisation cellulaire comme celles impliquées dans l'apoptose et la prolifération cellulaire, mais aussi des interactions avec différents récepteurs nucléaires et/ou membranaires.

De nombreuses études, dont les travaux présentés ci-après, sont en cours pour évaluer au mieux la tératogénicité. Elles ont pour objectif de préserver la santé de l'Homme et des espèces sauvages en intégrant les exigences réglementaires et en limitant le recours aux animaux de laboratoire.

Chapitre 3 : Évaluation de la tératogénicité

La détection de nouveaux agents tératogènes est une préoccupation constante des pouvoirs publics, des professionnels de santé et des futurs parents depuis les cas de la Thalidomide et du DES. La particularité des médicaments est une exposition volontaire et maîtrisée liée à un bénéfice médical. Cependant, comme cela a été décrit précédemment, la nature des agents tératogènes ne concerne pas uniquement les médicaments mais aussi d'autres natures comme les substances chimiques au sens large, dont l'exposition humaine est moins maîtrisée. En effet, il est estimé que l'Homme est exposé de 1 à plus de 500 000 substances chimiques tout au long de sa vie. Ce nombre augmente chaque année avec la mise sur le marché d'environ 600 nouvelles substances chimiques par an (Werler 2013; Stadler 2011). Dans la plupart des cas, cette exposition n'est pas intentionnelle mais liée à notre alimentation et à nos usages quotidiens de produits chimiques. Cette concomitance des expositions et leur variété rend difficile l'évaluation globale du risque de la reprotoxicité.

Dans ce chapitre, seront développées les exigences de la réglementation européenne de l'évaluation individuelle de la toxicité du développement (et donc de la tératogénicité) des substances chimiques ainsi que les particularités de l'évaluation des produits cosmétiques. Les différentes sources d'informations de données de reprotoxicité ainsi que les tests de reprotoxicité requis par la réglementation mais aussi les tests prédictifs et en cours de développement seront présentés.

Remarque : L'évaluation de la reprotoxicité est différente selon la nature de la substance à étudier : médicaments, vaccins, additifs alimentaires, substances chimiques et biocides. Les exigences réglementaires pour réaliser cette évaluation est également différente selon les pays.

1. Réglementation européenne

La directive « Substances Dangereuses » (Dir. 67/548/CEE) est la précédente réglementation européenne pour l'évaluation des risques toxicologiques des substances chimiques. Elle a été mise en place en 1967 peu de temps après le cas de la Thalidomide. À partir de 1981, les importateurs et les fabricants de substances chimiques doivent notifier les nouvelles substances mises sur le marché. À partir de cette date, une distinction est faite entre les « substances chimiques existantes », listées dans l'inventaire EINECS « European INventory of Existing Commercial chemical Substances » et les « substances chimiques nouvelles », notifiées dans la liste ELINCS « European LIst of Notified Chemical Substances ». L'évaluation des risques chimiques de ces « nouvelles substances chimiques » étaient réalisées par les institutions de chaque pays.

Depuis 2007, au sein de l'Union Européenne, l'évaluation des substances chimiques, dont la reprotoxicité, est définie par le règlement REACH (Registration Evaluation and Assessment of CHemicals) (Règlement n° 1907/2006/CE). Il exige des industriels de procéder à l'évaluation de la sécurité de leur substance chimique pour la protection de l'Homme ainsi que des organismes aquatiques. Le nombre et la nature des évaluations sont fonction du tonnage prévu de mise sur le marché européen. Le règlement européen CLP (Classification Labelling and Packaging) (Règlement 1272/2008/CE) définit les critères menant aux différents étiquetages des substances chimiques. Malgré cette réglementation européenne stricte, pour une même substance chimique, des discordances peuvent exister entre les différentes sources d'information réglementaire (dossier REACH, notification CLP et fiche de données de sécurité du fournisseur).

1.1. Règlement Registration Evaluation and Assessment of Chemicals (REACH)

Le règlement européen REACH (Règlement n° 1907/2006/CE) a pour vocation de protéger l'Homme (travailleurs, consommateurs, ...) et l'environnement contre les risques liés aux substances chimiques commercialisées dans l'Union Européenne.

Ce règlement a été mis en place le 1^{er} juin 2007 et concerne toutes les substances chimiques présentes (EINECS et ELINCS) et à venir sur le marché européen, produites à plus d'1 tonne par an. Il ne concerne pas les médicaments, les additifs alimentaires, les carburants et les substances radioactives. Le calendrier d'évaluation de plus de 100 000 substances chimiques est présenté dans la Figure 35. Différentes échéances permettent

l'évaluation progressive des substances chimiques jusqu'à 2018. A l'heure actuelle, les substances chimiques produites ou importées entre 1 et 100 tonnes par an ne sont pas encore toutes enregistrées.

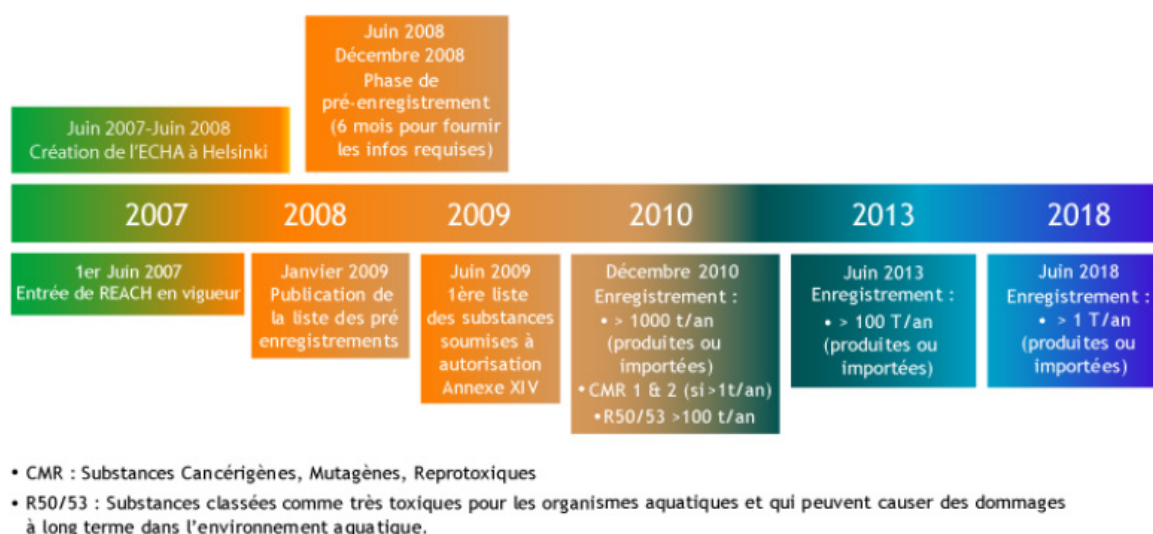


Figure 35 : Calendrier du règlement REACH

Source : INERIS

Le règlement REACH impose aux industriels de prouver l'innocuité de leurs substances chimiques. Pour ce faire, ils doivent recueillir l'ensemble des données disponibles, issues d'études épidémiologiques, d'outils *in silico* (modélisation mathématique), de certaines méthodes alternatives à l'expérimentation animale validées, etc... afin de permettre la caractérisation physico-chimique des substances et l'évaluation des effets pour la protection de l'Homme et des organismes aquatiques. Si nécessaire, ces données sont complétées avec des tests supplémentaires dont le nombre et la nature varie en fonction du tonnage de la substance chimique (Tableau 14). L'analyse de l'ensemble de ces données est une approche sur le « poids de l'évidence » relevant du jugement d'expert d'un toxicologue.

Tableau 14 : Exigences de REACH en matière d'informations standards

Source : CNRS

	≥ 1000 t/an (annexes VII + VIII + IX + X)			
	100-1000 t/an (annexes VII + VIII + IX)			
	10-100 t/an (annexes VII + VIII)			
	1-10 t/an (annexe VII)			
Informations toxicologiques	<ul style="list-style-type: none"> • Irritation ou corrosion cutanée (<i>in vitro</i>) • Irritation oculaire (<i>in vitro</i>) • Sensibilisation cutanée • Mutagénicité (<i>in vitro</i>, mutations géniques sur des bactéries) • Toxicité aiguë (voie orale) 	<ul style="list-style-type: none"> • Irritation cutanée (<i>in vivo</i>) • Irritation oculaire (<i>in vivo</i>) • Mutagénicité (<i>in vitro</i>, cytogénicité sur cellules de mammifères ou micronoyaux) • Mutagénicité (<i>in vitro</i>, mutation génique sur cellules de mammifères) • Toxicité aiguë (inhalation) • Toxicité aiguë (voie cutanée) • Toxicité par administration répétée (28 jours, une espèce) • Toxicité pour la reproduction (dépistage, une espèce) • Toxicocinétique (évaluation sur la base des informations disponibles) 	<ul style="list-style-type: none"> • Toxicité par administration répétée (28 jours, une espèce)* • Toxicité par administration répétée (90 jours, une espèce, rongeur) • Toxicité pour la reproduction (développement prénatal, une espèce) • Toxicité pour la reproduction (deux générations, une espèce) 	<ul style="list-style-type: none"> • Toxicité pour la reproduction (développement, une espèce) • Toxicité pour la reproduction (deux générations, une espèce)* • Etude de cancérogénicité
Informations écotoxicologiques	<ul style="list-style-type: none"> • Toxicité aquatique (court terme, invertébrés) • Toxicité aquatique (court terme, plantes aquatiques) • Dégradation (biotique, biodégradabilité facile) 	<ul style="list-style-type: none"> • Toxicité aquatique (court terme, poisson) • Toxicité aquatique (inhibition de la respiration des boues activées) • Dégradation (abiotique, hydrolyse en tant que fonction du pH) • Devenir et comportement dans l'environnement (dépistage adsorption/désorption) 	<ul style="list-style-type: none"> • Toxicité aquatique (long terme, invertébrés) • Toxicité aquatique (long terme, poissons) • Dégradation (biotique, eaux de surface) • Dégradation (biotique, sol) • Dégradation (biotique, sédiments) • Dégradation (biotique, identification des produits de dégradation) • Devenir et comportement dans l'environnement (bioaccumulation, une espèce aquatique) • Devenir et comportement dans l'environnement (informations supplémentaires sur l'adsorption/désorption) • Effets sur les organismes terrestres (court terme, invertébrés) • Effets sur les organismes terrestres (micro-organismes du sol) • Effets sur les organismes terrestres (court terme, plantes) 	<ul style="list-style-type: none"> • Dégradation (biotique, essais supplémentaires) • Devenir et comportement dans l'environnement (informations supplémentaires) • Effets sur les organismes terrestres (long terme, invertébrés) • Effets sur les organismes terrestres (long terme, plantes) • Effets sur les organismes des sédiments (long terme) • Effets sur les oiseaux (long terme ou toxicité pour la reproduction)
Propriétés physico-chimiques	<ul style="list-style-type: none"> • État de la substance à 20 °C et 101,3 kPa • Point de fusion/congélation • Point d'ébullition • Densité relative • Pression de vapeur • Tension superficielle • Hydrosolubilité • Coefficient de partage n-octanol/eau • Point d'éclair • Inflammabilité • Propriétés explosives • Température d'auto-inflammation • Propriétés comburantes • Granulométrie 		<ul style="list-style-type: none"> • Stabilité dans les solvants organiques et identité des produits de dégradation à prendre en considération (si la stabilité est jugée critique) • Constante de dissociation • Viscosité 	

* Ces études sont à réaliser si cela n'a pas déjà été fait pour la bande de tonnage inférieure en raison de l'application d'une dérogation.

1.1.1. Définition réglementaire d'une substance reprotoxique

Le règlement REACH définit une substance chimique toxique pour la reproduction ainsi : « *substances et préparations qui, par inhalation, ingestion ou pénétration cutanée, peuvent produire ou augmenter la fréquence d'effets nocifs non héréditaires dans la progéniture ou porter atteinte aux fonctions ou capacités reproductives* ».

1.1.2. Protection de l'Homme

Si les informations recueillies ne sont pas suffisantes, des tests *in vivo* sur rongeurs sont alors requis. La dernière version du « Guidance on information requirements and chemical safety assessment » de l'Agence Européenne des Substances Chimiques (ECHA), datant de mai 2015, précise les différents niveaux d'informations de reprotoxicité requis en fonction du tonnage de la substance chimique prévisible de mise sur le marché européen (Tableau 14 et Tableau 15) (ECHA 2015a) :

- À partir de 10 tonnes par an, un test de criblage de toxicité du développement sur rongeurs est requis (Ligne directrice OCDE n°421 ou 422) (OCDE 1995; OCDE 1996). Celui-ci permet un dépistage de la toxicité pour la reproduction et le développement.
- À partir de 100 tonnes par an, s'ajoute un test de toxicité de développement prénatal sur rongeurs (Ligne directrice OCDE n°414) (OCDE 2001).
- À partir de 1 000 tonnes par an, s'ajoute un test étendu de toxicité pour la reproduction sur une génération de rongeurs (Ligne directrice OCDE n°443) (OCDE 2012).

Ces tests de reprotoxicité doivent permettre l'établissement d'une dose sans effet reprotoxique observable (NOAEL) ou d'une dose minimale d'effet reprotoxique observable (LOAEL).

L'analyse de l'ensemble des données de reprotoxicité disponibles doit permettre le calcul de la dose sans effet pour la fertilité (DNEL_{fertilité}) ainsi que celle sans effet pour la toxicité pour le développement (DNEL_{développement}).

Tableau 15 : Résumé des informations requises pour la reprotoxicité selon le règlement REACH (Annexes VII à X)

Source : REACH

Study	Annex VII (<10 t/yr)	Annex VIII (≥10 t/yr)	Annex IX (≥100 t/yr)	Annex X (≥1000 t/yr)
Screening test for reproductive /developmental toxicity (OECD TG 421 or 422)		Required. If a prenatal developmental toxicity study is available or proposed, it is strongly recommended to consider conducting a screening study in addition to the prenatal developmental toxicity ¹ study. If an extended one-generation reproductive toxicity study is available or is proposed, a screening study may not need to be conducted.	Strongly recommended if no higher tier study (such as OECD TG 443) is/will be available to address fertility and peri/post natal development	(a higher tier study is required)
Prenatal developmental toxicity study (EU B.31, OECD TG 414)		May be proposed in case of serious concern ² for prenatal developmental toxicity instead of the screening study.	Required in one species; second species may be triggered ³	Required in <u>two</u> species
Extended one-generation reproductive toxicity study (EU B.56, OECD TG 443) ⁴		May be proposed in case of serious concern for fertility instead of the screening study ²	Required in one species if triggered ⁵ ; second species/strain may be triggered in exceptional cases	Required in one species unless already conducted at previous Annex level; second species/strain may be triggered in exceptional cases

NOTES for Table R.7.6-1

¹ See discussion at Stage 4.3 (i) Reproduction/developmental toxicity screening test under Section R.7.6.2.3.2

² Column 1 and Column 2 provisions at Annex VIII, 8.7.1 need to be considered together. Serious concern reflects a high likelihood for adverse effects on reproductive health.

³ For discussion on triggers see Stage 4.4 (ii), Prenatal developmental toxicity study under Section R.7.6.2.3.2.

⁴ Basic study design addressing fertility, and developmental toxicity effects manifested after birth, with Cohort 1A and Cohort 1B without extension of Cohort 1B, see Stage 4.4 (iii) and Stage 4.5 (ii) Extended one-generation reproductive toxicity study under Section R.7.6.2.3.2 for overview and Appendix 2 and 3 for details

⁵ For description of triggers see Stage 4.4 (iii), Extended one-generation reproductive toxicity study under Chapter R.7.6.2.3.2.

1.1.3. Protection des organismes aquatiques

Le règlement REACH requiert également l'évaluation de la reprotoxicité sur les organismes aquatiques. Les mesures concernent la survie, la croissance (incluant les malformations) et la reproduction. Ces informations permettent de calculer la concentration testée la plus élevée à laquelle aucun effet n'est observé (concentration sans

effet observé ou NOEC). Si nécessaire, ce paramètre peut être remplacé par une CE10 (concentration pour laquelle 10% d'effet ont été observés). La reprotoxicité pour l'Homme et pour les organismes aquatiques est intégrée dans le critère « T » des substances Persistantes, Bioaccumulables et Toxiques pour l'environnement (PBT).

Comme pour l'évaluation de la santé humaine, le nombre d'essais requis augmente avec le tonnage de la substance chimique prévisible de mise sur le marché européen. À partir de 100 tonnes par an, les effets à long terme sur les invertébrés et les poissons doivent être évalués selon les lignes directrices OCDE :

- n°211 : *Daphnia magna*, essai de reproduction (OCDE 2012b) ;
- n°210 : Poisson, essai de toxicité aux premiers stades de la vie (OCDE 2013).

Afin de minimiser le recours aux animaux vertébrés, le test sur daphnie est réalisé en premier. Si les critères T sont remplis avec les données algues et daphnies, le test à long terme sur poissons n'est pas réalisé.

Toutes les données de toxicité disponibles, à court terme ou à long terme pour les trois niveaux trophiques (algues, daphnies, poissons), sont intégrées dans l'évaluation du risque et utilisées pour établir une concentration prédite sans effet (PNEC) globale pour le milieu aquatique.

Le règlement REACH soumet également à autorisation les substances PBT ainsi que les substances très persistantes et très bioaccumulables (vPvB).

L'ensemble des données toxicologiques générées dans le cadre du règlement REACH sont enregistrées dans une base de données publique en ligne centralisée et gérée par l'ECHA.

1.1.4. Limitation du nombre de tests sur animaux vertébrés

Le règlement REACH demande à ne réaliser de tests sur animaux vertébrés qu'en dernier recours lorsque toutes les autres sources d'informations ont été utilisées (Bases de données, QSAR, études épidémiologiques, etc...). Il recommande également de recourir à des méthodes alternatives selon la règle des 3Rs afin d'évaluer les dangers intrinsèques aux substances chimiques.

La règle des 3Rs, élaborée en 1959 par Russell et Burch recommande de :

- Remplacer les méthodes utilisant l'animal de laboratoire par des méthodes *in vitro* (étude sur cellules humaines ou animales) ou *in silico* ;
- Réduire le nombre d'animaux de laboratoire utilisés en expérimentation ;

- Raffiner les protocoles de façon à minimiser la douleur et la détresse imposées aux animaux de laboratoire, tout en préservant l'obtention d'un niveau élevé d'informations.

Le règlement REACH a également l'ambition d'exclure progressivement les essais sur les animaux de laboratoire lorsque les méthodes alternatives auront été validées.

1.2. Règlement Classification, Labelling and Packaging (CLP)

Le règlement CLP (Règlement 1272/2008/CE) a pour objet d'assurer que les dangers que présentent les substances chimiques soient clairement communiqués aux travailleurs et aux consommateurs de l'Union Européenne grâce à la classification et à l'étiquetage des produits chimiques. Ce règlement, entré en vigueur en janvier 2009, définit la classification, l'étiquetage et l'emballage des substances chimiques. Cette réglementation repose sur le système général harmonisé des Nations Unies (SGH).

Le règlement CLP a totalement remplacé au 1^{er} juin 2015 deux actes législatifs antérieurs, à savoir les directives « Substances dangereuses » et « Préparations dangereuses ».

1.2.1. Protection de l'Homme




Le règlement CLP définit des catégories de danger représentant le niveau de preuve de l'effet observé :

- Catégorie 1A : risque avéré pour l'Homme basé sur des études épidémiologiques ;
- Catégorie 1B : risque supposé pour l'Homme basé sur des données sur au moins deux espèces animales ;
- Catégorie 2 : risque suspecté pour l'Homme basé sur des données sur une seule espèce animale.

L'emploi de substances tératogènes ou reprotoxiques est réglementé. Leurs classifications sont décrites dans le Tableau 16. Les substances reprotoxiques de catégorie 1A et 1B ont des mentions de danger H360 et d'avertissement « Danger ». Les substances reprotoxiques de catégorie 2 ont des mentions de danger H361 et d'avertissement « Attention ». Lorsque le type d'effet reprotoxique est déterminé, il est également précisé. Si la substance altère la fertilité, il sera donc mentionné : « f » (« susceptible d'altérer la fertilité ») ou « F » (« peut nuire à la fertilité »). Si la substance est un agent tératogène, il sera donc mentionné : « d » (« susceptible de nuire au fœtus ») ou « D » (« peut nuire au

foetus »). Il existe une catégorie supplémentaire pour les effets sur ou via la lactation avec une mention de danger H362 sans mention d'avertissement.

Tableau 16 : Classification et étiquetage des substances ou mélanges classés R selon le règlement CLP

Catégorie 1A : Effets reprotoxiques avérés pour l'homme
 Danger
H360 – Peut nuire à la fertilité ou au fœtus H360F - Peut nuire à la fertilité H360D- Peut nuire au fœtus H360FD- Peut nuire à la fertilité. Peut nuire au fœtus H360Fd - Peut nuire à la fertilité. Susceptible de nuire au fœtus H360Df - Peut nuire au fœtus. Susceptible de nuire à la fertilité
Catégorie 1B : Effets reprotoxiques présumés pour l'homme
 Danger
H360 – Peut nuire à la fertilité ou au fœtus H360F - Peut nuire à la fertilité H360D- Peut nuire au fœtus H360FD- Peut nuire à la fertilité. Peut nuire au fœtus H360Fd - Peut nuire à la fertilité. Susceptible de nuire au fœtus H360Df - Peut nuire au fœtus. Susceptible de nuire à la fertilité
Catégorie 2 : Effets reprotoxiques suspectés pour l'homme
 Attention
H361 – Susceptible de nuire à la fertilité ou au fœtus H361f - Susceptible de nuire à la fertilité H361d - Susceptible de nuire au fœtus H361fd- Susceptible de nuire à la fertilité. Susceptible de nuire au fœtus
Catégorie supplémentaire : Effets sur ou via l'allaitement
Pas de pictogramme
H362 – Peut être nocif pour les bébés nourris au lait maternel

Remarque : Dans le cadre de cette étude, les substances chimiques mutagènes vis-à-vis des cellules germinales (Catégorie 1B) avec une mention de danger H340 ne seront pas prises en compte car elles peuvent seulement avoir un effet indirect sur d'éventuelles malformations.

1.2.2. Protection des organismes aquatiques

Le règlement CLP définit deux classes de danger pour l'environnement :




- dangereux pour le milieu aquatique ;
- dangereux pour la couche d'ozone.

Le règlement définit 4 catégories pour la toxicité chronique chez les organismes aquatiques (Tableau 17).

La catégorie 1 comporte un pictogramme avec une mention d'avertissement « Attention » et regroupe les substances avec la mention de danger H410 « très toxique pour les organismes aquatiques, entraîne des effets à long terme ». La catégorie 2 comporte un pictogramme et regroupe les substances avec la mention de danger H411 « toxique pour les organismes aquatiques, entraîne des effets à long terme ». La catégorie 3 ne comporte pas de pictogramme et regroupe les substances avec la mention de danger H412 « nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets à long terme ». La catégorie 4 ne comporte pas de pictogramme et regroupe les substances avec la mention de danger H413 « peut entraîner des effets néfastes à long terme pour les organismes aquatiques ».

Tableau 17 : Classification et étiquetage des substances ou mélanges dangereux pour le milieu aquatique selon le règlement CLP

Source : CNRS

Substances ou mélanges dangereux pour le milieu aquatique					
	TOXICITÉ AIGUË		TOXICITÉ CHRONIQUE		
Classification	Catégorie 1	Catégorie 1	Catégorie 2	Catégorie 3	Catégorie 4
Pictogramme				Pas de pictogramme	Pas de pictogramme
Mention d'avertissement	Attention	Attention	Pas de mention d'avertissement	Pas de mention d'avertissement	Pas de mention d'avertissement
Mention de danger	H400 Très toxique pour les organismes aquatiques	H410 Très toxique pour les organismes aquatiques, entraîne des effets à long terme	H411 Toxique pour les organismes aquatiques, entraîne des effets à long terme	H412 Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets à long terme	H413 Peut entraîner des effets néfastes à long terme pour les organismes aquatiques

En l'absence de données de toxicité aquatique chronique, ces étiquetages environnementaux peuvent être tout de même attribués sur la base de données de toxicité aquatique aiguë et de paramètres de dégradabilité et/ou de potentiel de bioaccumulation (BCF et log K_{ow}) (Tableau 18).

Tableau 18 : Critères de catégorisation en toxicité aquatique chronique en l'absence de données spécifiques

Source : ECHA 2015b

(iii) Substances for which adequate chronic toxicity data are not available	
Category Chronic 1: (Note 1)	
96 hr LC ₅₀ (for fish)	≤1 mg/l and/or
48 hr EC ₅₀ (for crustacea)	≤1 mg/l and/or
72 or 96 hr ErC ₅₀ (for algae or other aquatic plants)	≤1 mg/l. (Note 2)
and the substance is not rapidly degradable and/or the experimentally determined BCF ≥ 500 (or, if absent, the log K _{ow} ≥ 4). (Note 3).	
Category Chronic 2:	
96 hr LC ₅₀ (for fish)	>1 to ≤10 mg/l and/or
48 hr EC ₅₀ (for crustacea)	>1 to ≤10 mg/l and/or
72 or 96 hr ErC ₅₀ (for algae or other aquatic plants)	>1 to ≤10 mg/l. (Note 2)
and the substance is not rapidly degradable and/or the experimentally determined BCF ≥ 500 (or, if absent, the log K _{ow} ≥ 4). (Note 3).	
Category Chronic 3:	
96 hr LC ₅₀ (for fish)	> 10 to ≤ 100 mg/l and/or
48 hr EC ₅₀ (for crustacea)	> 10 to ≤ 100 mg/l and/or
72 or 96 hr ErC ₅₀ (for algae or other aquatic plants)	> 10 to ≤ 100 mg/l. (Note 2)
and the substance is not rapidly degradable and/or the experimentally determined BCF ≥ 500 (or, if absent, the log K _{ow} ≥ 4). (Note 3).	
<i>Note 1:</i> When classifying substances as Acute Category 1 and/or Chronic Category 1 it is necessary at the same time to indicate then appropriate M-factor(s) (see table 4.1.3).	
<i>Note 2:</i> Classification shall be based on the ErC ₅₀ [= EC ₅₀ (growth rate)]. In circumstances where the basis of the EC ₅₀ is not specified or no ErC ₅₀ is recorded, classification shall be based on the lowest EC ₅₀ available.	
<i>Note 3:</i> When no useful data on degradability are available, either experimentally determined or estimated data, the substance should be regarded as not rapidly degradable.	

La réglementation européenne a défini des critères stricts pour l'évaluation de la tératogénicité pour la protection de l'Homme et des organismes aquatiques, cependant des discordances sont possibles entre les différentes sources d'information réglementaire.

1.3. Existence de discordances possibles entre les différents étiquetages réglementaires

1.3.1. Différents niveaux de fiabilité dans les notifications CLP

Il existe plusieurs niveaux de fiabilité d'informations dans la classification CLP en fonction du niveau d'avancement d'une substance chimique dans la procédure d'harmonisation de la notification.

Le premier niveau d'informations est issu d'une classification non harmonisée : chaque industriel apporte un dossier avec une proposition de classification. Cela entraîne la

présence de plusieurs notifications pour une même substance sur le site de l'ECHA avec des classifications différentes de reprotoxicité. Par exemple, le captopril (médicament ACE inhibiteur) a fait l'objet de 15 notifications différentes : 4 avec la mention de danger H361, 3 avec celle H360, 3 avec celle H360D, 1 avec celle H361d et 4 sans mention de danger de reprotoxicité pour l'Homme. En l'absence d'une harmonisation, il est difficile de déterminer la mention de danger la plus pertinente.

Le dernier niveau d'information est la classification harmonisée déterminée par les pouvoirs publics en regroupant l'ensemble des informations disponibles. A l'heure actuelle, une minorité des substances ont une classification harmonisée. Les données permettant cette classification ne sont pas accessibles sur le site de l'ECHA. La classification harmonisée semble être la plus fiable car elle est établie en fonction de l'ensemble des données des différentes notifications par une institution indépendante des industriels producteurs de ces substances chimiques.

1.3.2. Discordance entre les mentions de danger des notifications CLP et celles du dossier REACH

Le dossier REACH d'une substance chimique est constitué par un ou plusieurs industriels. Les dossiers REACH sont d'abord préenregistrés au niveau de l'ECHA selon le calendrier défini en fonction du tonnage par an des substances chimiques. A l'heure actuelle, toutes les substances chimiques n'ont pas encore leur dossier préenregistré : celles dont le tonnage annuel se situe entre 1 et 100 peuvent encore l'être jusqu'au 1^{er} juin 2018.

Une fois le dossier REACH enregistré, les données de toxicologie et d'écotoxicologie sont accessibles sur le site de l'ECHA. Pour chaque catégorie de toxicité, le dossier contient soit une mention de danger soit des mentions de non classification : « data lacking », « inconclusive » (données insuffisamment fiables pour permettre une décision de classification) ou « conclusive but non sufficient for classification » (données fiables permettant de ne pas classer la substance). Seul 1 dossier enregistré sur 20 est vérifié par l'ECHA.

L'étiquetage défini dans le dossier REACH enregistré d'une substance chimique peut différer de celui de ses notifications CLP. Par exemple, l'amantadine (médicament antiviral) possède un dossier REACH enregistré avec une mention de danger H361fd différente de celles des 11 notifications CLP dont elle a fait l'objet (5 avec la mention H361, 2 avec H360, 1 avec H361d et 3 sans mention de danger de reprotoxicité). Le chlorure de lithium (médicament antidépresseur) possède également un dossier REACH

enregistré avec la mention « conclusive but non sufficient for classification ». Il avait fait l'objet de 30 notifications CLP dont 1 avec la mention H360Df et 1 avec celle H360.

1.3.3. Discordance entre les mentions de danger des notifications CLP et celles des FDS

Les Fiches de Données de Sécurité (FDS) sont aussi établies par les industriels conformément au règlement REACH. Elles contiennent différentes informations dont les classifications, les propriétés chimiques et les données toxicologiques et écotoxicologiques. Les mentions de danger peuvent là aussi diverger pour une même substance chimique suivant l'importateur ou les différentes sources d'information.

Par exemple, le cyclophosphamide (médicament antinéoplasique) ne possède pas de mention de danger de reprotoxicité dans la FDS du fournisseur SIGMA alors qu'il a fait l'objet de 8 notifications CLP dont 2 avec la mention H360 et 1 avec celle H360FD.

Par ailleurs, des données toxicologiques de reprotoxicité peuvent être mentionnées dans la FDS sans que cela entraîne une mention de danger correspondante.

Le règlement européen REACH exige l'évaluation de la reprotoxicité des substances chimiques à la fois pour la protection de l'Homme et à la fois pour les organismes aquatiques dès 10 tonnes prévues de mise sur le marché européen. Le règlement CLP détermine la classification, l'étiquetage et l'emballage des substances chimiques. Contrairement aux mentions de danger de reprotoxicité pour l'Homme, celles de toxicité aquatique chronique peuvent ne pas être basées sur des données de reprotoxicité mais sur des données d'écotoxicité aiguë et de paramètres de dégradabilité et / ou de bioaccumulation.

Malgré les critères établis par les règlements REACH et CLP, des discordances peuvent exister pour une même substance chimique entre les différentes notifications CLP, un dossier REACH enregistré et la FDS. La classification harmonisée CLP, seule à être établie par les pouvoirs publics, semble la source d'information la plus fiable.

2. Particularités de l'industrie cosmétique

L'industrie cosmétique est une industrie chimique. Elle est donc également soumise au règlement REACH mais aussi à la réglementation spécifique à son domaine. La réglementation des produits cosmétiques interdit notamment l'utilisation des substances reprotoxiques ainsi que le recours aux tests sur animaux protégés par la directive européenne sur la protection des animaux à des fins scientifiques.

2.1. Réglementation des produits cosmétiques

L'industrie cosmétique est soumise au règlement n° 1223/2009/CE. Il définit un produit cosmétique comme suit : « substances ou mélanges de substances, destinés à être mis en contact avec les parties superficielles du corps humain (épiderme, système pileux, ongles, etc.), ou avec les dents et les muqueuses buccales, en vue, exclusivement ou principalement, de les nettoyer, de les parfumer, d'en modifier l'aspect, de les protéger, de les maintenir en bon état ou de corriger les odeurs corporelles ».

Ce règlement interdit l'utilisation des substances cancérogènes, mutagènes ou toxiques pour la reproduction, sauf dans des cas exceptionnels. Une substance reprotoxique de la catégorie 3 peut être utilisée dans des cosmétiques si elle a été préalablement évaluée par le « Scientific Committee on Cosmetics and Non-Food Products » (SCCNFP) et que celui-ci l'a jugée propre à l'utilisation dans les cosmétiques.

Depuis le 11 mars 2013, ce règlement européen relatif aux produits cosmétiques interdit totalement le recours à l'expérimentation animale pour les produits finis ainsi que pour les ingrédients ou pour les combinaisons d'ingrédients. La majorité des ingrédients utilisés dans les produits cosmétiques sont des ingrédients utilisés également dans de nombreux autres produits de consommation et produits industriels pour lesquels l'expérimentation animale peut constituer une exigence dans le cadre de la réglementation en vigueur applicable au secteur concerné. Les données obtenues à partir d'expérimentations sur animaux effectuées dans le cadre du respect de législations ne s'appliquant pas aux cosmétiques peuvent servir à l'évaluation de la sécurité des produits cosmétiques dans la mesure où elles sont pertinentes et conformes en matière de qualité des données. Le règlement cosmétique encourage le recours à des méthodes alternatives à l'expérimentation animale pour réaliser l'évaluation du risque de ses ingrédients et de ses combinaisons d'ingrédients.

2.2. Directive protection des animaux utilisés à des fins scientifiques

La directive européenne 2010/63/UE définit les animaux utilisés à des fins scientifiques comme les :

« a) animaux vertébrés non humains vivants, y compris :

i) les formes larvaires autonomes ; et

ii) les formes fœtales de mammifères à partir du dernier tiers de leur développement normal ;

b) les céphalopodes vivants. »

Les « formes larvaires autonomes » signifient les stades de développement à partir desquels la larve est capable de se nourrir de manière autonome. La larve est le stade de développement suivant les stades embryonnaires. La définition de la directive 2010/63/UE n'intègre donc pas les stades embryonnaires de vertébrés comme ceux de poissons ou d'amphibiens.

L'industrie cosmétique doit respecter la réglementation REACH mais aussi celle spécifique à son domaine, qui interdit l'usage de substances reprotoxiques ainsi que le recours à l'expérimentation animale. Des méthodes alternatives à l'expérimentation animale sont donc nécessaires à l'évaluation de la reprotoxicité des substances chimiques constitutives des produits cosmétiques. Ces méthodes peuvent être des tests utilisant des organismes vertébrés, aux stades de développement qui ne répondent pas à la définition européenne des animaux utilisés à des fins scientifiques. Le développement d'une de ces méthodes est exposé dans ce manuscrit.

3. Sources d'informations de données de reprotoxicité

Comme requis par le règlement REACH, l'évaluateur toxicologue doit faire le bilan de l'ensemble des données disponibles avant de juger de la nécessité de réaliser des tests de reprotoxicité. En plus des sources d'informations réglementaires (le dossier REACH, les notifications CLP ou les fiches de données de sécurité), d'autres sources d'informations sont à sa disposition : des données épidémiologiques, les classifications institutionnelles non européennes de l'United States Food and Drug Administration (US FDA) ou de l'Australian Therapeutic Goods Administration (TGA) ou des bases de données / outils *in silico* spécifiques à la reprotoxicité.

3.1. Données épidémiologiques

Il existe différents types de données épidémiologiques. Les cas isolés sont les moins documentés et peuvent être anecdotiques sans que la substance mise en question soit tératogène chez l'Homme. Il s'agit de notifications ponctuelles (publiée ou déclarée) de médecins de grossesses pathologiques. La répétition de cas similaires a valeur d'alerte sous certaines conditions. La période d'exposition doit être chronologiquement compatible avec les malformations observées. Il doit s'agir d'atteintes de prévalence rares dans la population générale et d'une utilisation peu fréquente de la substance chez la femme jeune. Les malformations observées ne doivent pas être liées à une maladie génétique. Classiquement, au bout de trois cas similaires une alerte est déclenchée. Cette alerte est renforcée si des résultats expérimentaux et/ou mécanistiques viennent consolider ces observations cliniques. Les agents les plus tératogènes dans l'espèce humaine ont presque tous été détectés initialement grâce à la publication de cas isolés par des médecins comme la Thalidomide, l'isotrétinoïne, ou encore le valproate de sodium.

Les données épidémiologiques peuvent être de plus grande ampleur dans l'étude de cas-témoins. Ce type d'étude a permis de démontrer l'association entre les cancers du vagin et l'exposition au DES en cours de grossesse. Enfin les études de cohortes (prospectives ou historiques), comme dans le cas du DDT peuvent également aider l'évaluateur. Ce dernier peut également consulter les registres nationaux ou régionaux (de malformations, de naissances...).

3.2. Classifications institutionnelles non européennes

3.2.1. *United States Food and Drug Administration (US FDA)*

L'"United States Food and Drug Administration" (US FDA) classe les médicaments et les additifs alimentaires selon leurs effets tératogènes (Tableau 19). La catégorie A est la plus sûre pour les femmes enceintes, c'est-à-dire qu'aucune étude épidémiologique n'a montré de risque pour le fœtus. Elle est suivie de la catégorie B, qui regroupe les substances pour lesquelles des données de reprotoxicité chez l'animal peuvent exister mais elles n'ont pas été confirmées chez la femme enceinte. La catégorie C reprend les mêmes critères que la catégorie B à la différence que ces médicaments de cette catégorie apportent un bénéfice jugé supérieur au risque d'apparition d'effets tératogènes. Pour les substances de la catégorie D, des données de reprotoxicité existent chez l'Homme cependant le bénéfice du médicament peut être supérieur au risque. Enfin les substances de

la catégorie X possèdent des données évidentes d'effets reprotoxiques chez l'Homme et/ou chez l'animal et leur usage est proscrit chez les femmes enceintes.

Tableau 19 : Catégories de risque fœtal de l'US Food and Drug Administration

Source : US FDA

Pregnancy Category A	Adequate and well-controlled human studies have failed to demonstrate a risk to the fetus in the first trimester of pregnancy (and there is no evidence of risk in later trimesters).
Pregnancy Category B	Animal reproduction studies have failed to demonstrate a risk to the fetus and there are no adequate and well-controlled studies in pregnant women OR Animal studies have shown an adverse effect, but adequate and well-controlled studies in pregnant women have failed to demonstrate a risk to the fetus in any trimester.
Pregnancy Category C	Animal reproduction studies have shown an adverse effect on the fetus and there are no adequate and well-controlled studies in humans, but potential benefits may warrant use of the drug in pregnant women despite potential risks.
Pregnancy Category D	There is positive evidence of human fetal risk based on adverse reaction data from investigational or marketing experience or studies in humans, but potential benefits may warrant use of the drug in pregnant women despite potential risks.
Pregnancy Category X	Studies in animals or humans have demonstrated fetal abnormalities and/or there is positive evidence of human fetal risk based on adverse reaction data from investigational or marketing experience, and the risks involved in use of the drug in pregnant women clearly outweigh potential benefits.
Pregnancy Category N	FDA has not yet classified the drug into a specified pregnancy category yet.

Le 30 juin 2015, l'US FDA a remplacé cette classification jugée trop simpliste et source de mésusage des médicaments par une classification plus détaillée permettant une personnalisation des prescriptions. Trois sections sont maintenant distinguées : « grossesse », « allaitement » et « potentiel reproductif masculin et féminin ».

Dans le cadre de ce manuscrit, l'ancienne classification est utilisée.

3.2.2. *Australian Therapeutic Goods Administration*

Le « Therapeutic Goods Administration » australien est l'équivalent de l'US FDA. Il reprend une classification similaire des médicaments ayant des effets néfastes pendant la grossesse (Tableau 20). La différence majeure entre ces deux classifications est le découpage de la catégorie B en trois niveaux (B1, B2 et B3) en fonction du niveau de certitudes d'effet sur le fœtus. La classification des médicaments est facilement accessible sur le site internet de la TGA.

Tableau 20 : Catégories de risque fœtal de la Therapeutic Goods Administration

Source : TGA

Pregnancy Category A	Drugs which have been taken by a large number of pregnant women and women of childbearing age without an increase in the frequency of malformations or other direct or indirect harmful effects on the fetus having been observed.
Pregnancy Category B1	Drugs which have been taken by only a limited number of pregnant women and women of childbearing age, without an increase in the frequency of malformation or other direct or indirect harmful effects on the human fetus having been observed.
	Studies in animals have not shown evidence of an increased occurrence of fetal damage.
Pregnancy Category B2	Drugs which have been taken by only a limited number of pregnant women and women of childbearing age, without an increase in the frequency of malformation or other direct or indirect harmful effects on the human fetus having been observed.
	Studies in animals are inadequate or may be lacking, but available data show no evidence of an increased occurrence of fetal damage.
Pregnancy Category B3	Drugs which have been taken by only a limited number of pregnant women and women of childbearing age, without an increase in the frequency of malformation or other direct or indirect harmful effects on the human fetus having been observed.
	Studies in animals have shown evidence of an increased occurrence of fetal damage, the significance of which is considered uncertain in humans.
Pregnancy Category C	Drugs which, owing to their pharmaceutical effects, have caused or may be suspected of causing, harmful effects on the human fetus or neonate without causing malformations. These effects may be reversible.
Pregnancy Category D	Drugs which have caused, are suspected to have caused or may be expected to cause, an increased incidence of human fetal malformations or irreversible damage. These drugs may also have adverse pharmacological effects.
Pregnancy Category X	Drugs which have such a high risk of causing permanent damage to the fetus that they should not be used in pregnancy or when there is a possibility of pregnancy.

3.3. Bases de données spécifiques à la reprotoxicité

Plusieurs bases générales compilent des données toxicologiques comme Medline, TOXLINE, Hazardous Substances Data Bank, RTECS et IRIS. D'autres sont spécifiques à la reprotoxicité et sont présentées dans le Tableau 21.

ReproCollection™ System regroupe plusieurs autres bases de reprotoxicité : DART, REPROTOX, TERIS, le catalogue de Shepard, ReproTEXT ainsi que les bases du National Toxicology Program. Par conséquent, ReproCollection™ System semble la base

de données la plus complète. Le DART decision tree est intégré dans l'OECD QSAR Toolbox, ce qui en fait également une bonne source d'informations mise à la disposition de l'évaluateur européen.

Tableau 21 : Liste non exhaustive de bases de données et outils *in silico* spécifiques à la reprotoxicité

Nom de la base	Description	Accès	Lien
CAESAR	Deux modèles de toxicité du développement basée sur les données de Arena et al. (2004) sur 292 substances.	Libre après enregistrement	http://www.vega-qsar.eu/download.html
Derek	Données de tératogénicité et de toxicité du développement	Licence	http://www.lhasalimited.org/products/derek-nexus.htm
Leadscope	<i>Drugs Repro-Developmental Database</i> Données de reprotoxicité sur 58 médicaments <i>QSAR models of developmental toxicity of the rodent fetus</i> Données de malformations physiques et viscérales, de toxicité du développement (retard de croissance et petit poids de naissance) et de survie fœtale	Licence	http://www.leadscope.com/product_info.php?products_id=110
MultiCASE	<i>DevTox Models</i> <i>Fetal Dysmorphogenesis Models</i> Basé sur des données de l'US FDA <i>Teratogenicity Models</i> Basé sur les données de TERIS	Licence	http://www.multicase.com/case-ultra-models
RepDose	Données subaiguës et chroniques d'environ 1 200 substances chimiques	Libre	http://fraunhofer-repdose.de/
US EPA ToxRefDB	Résultats de tests de toxicité du développement (387 substances) et sur plusieurs générations (316 substances)	Libre	http://www.epa.gov/NCCT/toxrefdb/
DART	200 000 références de journaux couvrant la tératologie et d'autres aspects de la toxicologie du développement et de la reproduction	Libre	http://toxnet.nlm.nih.gov/newtoxnet/dart.htm
REPROTOX	résumés des effets des médicaments, des substances chimiques, des infections, et agents physiques sur la grossesse, la reproduction et le développement	Licence	https://reprottox.org/
Catalog of Teratogenic Agents	plus de 1 500 agents pouvant induire des malformations congénitales chez l'animal	Livre	

TERIS (Teratogen Information System)	Catalog of Teratogenic Agent Chaque résumé inclue une évaluation du risque dérivé par consensus d'un comité consultative comprenant des autorités nationales dans le domaine de la tératologie de l'Université de Washington	Licence	http://depts.washington.edu/teris/web/teris/
ReproCollection™ System	DART REPROTOX TERIS Catalog of Teratogenic Agents ReproTEXT National Toxicology Program Databases	Licence	http://www.rightanswer.com/index.php/products/reprocollection-databases
DART decision tree	Basé sur 716 substances (664 positives, 16 négatives, et 36 avec des données insuffisantes)	OECD QSAR Toolbox	http://toolbox.oasis-lmc.org/?section=download

Ces bases de données et les outils informatiques comme les Quantitative Structure Activity Relationship (QSAR : modélisation faisant la corrélation entre une structure chimique et un effet bien déterminé comme l'activité biologique ou la réactivité chimique) font partie des outils *in silico* disponibles pour l'évaluateur. A l'heure actuelle, celles dédiées à la reprotoxicité ne sont pas suffisamment performantes pour permettre une prise de décision directe sur la substance chimique analysée. Elles sont tout de même intégrées dans l'approche « poids de l'évidence » ou comme base de classification pour répondre au règlement CLP (ECHA 2015).

Le toxicologue européen dispose de différentes sources d'informations de données de reprotoxicité pour réaliser l'évaluation d'une substance chimique. Parfois, celle-ci possède des données épidémiologiques, qui peuvent être du simple cas isolé (non suffisant pour conclure sur la tératogénicité d'une substance) à l'étude de cas de plus grande ampleur possédant des données suffisantes pour directement conclure des effets chez l'Homme. L'évaluateur peut également prendre en compte les informations de classifications institutionnelles de l'US FDA ou du TGA australien sur les recommandations d'usage de médicaments et d'additifs alimentaires chez les femmes enceintes. Enfin, des outils *in silico* sont également utiles pour rechercher des données ou essayer de prédire les effets de la substance en fonction de sa structure chimique en fonction des données disponibles de substances de la même famille chimique. Le toxicologue peut également utiliser les données de tests *in vitro* pour procéder à son évaluation.

Si les données collectées dans les différentes sources d'informations ne sont pas suffisantes pour réaliser l'évaluation du risque de la reprotoxicité pour l'Homme et pour les espèces aquatiques, il est alors nécessaire de réaliser des tests *in vivo* de reprotoxicité recommandés par le règlement REACH.

4. Tests de reprotoxicité

Cette partie décrit les tests réglementaires *in vivo* requis par le règlement REACH, les méthodes alternatives à l'expérimentation animale ainsi que les tests en développement dans des programmes internationaux pour l'évaluation de la tératogénicité.

4.1. Lignes directrices OCDE

L'Organisation de Coopération et de Développement Économiques (OCDE) établit des lignes directrices internationales harmonisées et standardisées destinées à l'évaluation toxicologique réglementaire des substances chimiques. Les lignes directrices requises par le règlement REACH pour la protection de l'Homme et des organismes aquatiques des substances tératogènes sont présentées ci-après.

4.1.1. Protection de l'Homme

Les lignes directrices OCDE requises par le règlement REACH (Tableau 22) sont des tests *in vivo* sur rongeurs. Elles nécessitent l'usage de rats exposés oralement et quotidiennement à un gradient de trois concentrations de la substance à tester. À partir de 10 tonnes / an, la ligne directrice OCDE n°421 ou celle n°422 est réalisée pour évaluer la tératogénicité et l'impact sur la fertilité de la substance chimique (OCDE 1995; OCDE 1996). La ligne directrice n°422 est une variante de celle n°421 à laquelle l'évaluation de la neurotoxicité est ajoutée. À partir de 100 tonnes / an, la ligne directrice OCDE n°414, un test spécifique de la tératogénicité, est ajoutée (OCDE 2001). Enfin à partir de 1 000 tonnes / an, la ligne directrice OCDE n°443 est également ajoutée (OCDE 2012). Ce test évalue également les effets neurotoxiques et immunotoxiques de la substance chimique sur la descendance ainsi que l'impact sur leur fertilité.

Tableau 22 : Résumé des lignes directrices OCDE requises par le règlement REACH pour l'évaluation de la reprotoxicité pour la santé humaine en fonction du tonnage de la mise sur le marché d'une substance chimique

Sources : OCDE 1995; OCDE 1996; OCDE 2001; OCDE 2012

Ligne directrice OCDE n°	421	422	414	443
Nom du test	Essai de dépistage de la toxicité pour la reproduction et le développement	Étude combinée de toxicité à doses répétées et de dépistage de la toxicité pour la reproduction et le développement	Étude de la toxicité pour le développement prénatal	Étude étendue de toxicité pour la reproduction sur une génération
Requis par le règlement REACH à partir de	>10 tonnes / an		>100 tonnes / an >10 tonnes / an	>1 000 tonnes / an >100 tonnes / an >10 tonnes / an
Type d'évaluation	Fertilité + tératogénicité		Tératogénicité	Fertilité + tératogénicité+ lactation + fertilité descendance + neurotoxicité + immunotoxicité
Espèces	Rat		Rat + lapin	Rat
Période d'exposition	Mâles : 4 semaines avant l'accouplement Femelles : ~54 jours (jusqu'à 4 jours post-parturition)		Femelles : Pré-implantation à la veille de la naissance	Mâles et femelles : 2 semaines avant l'accouplement jusqu'au sevrage Petits : du sevrage à l'âge adulte
Nombre d'individus par groupe	>10 / sexe		20 femelles gravides	Nombre suffisant pour obtenir 20 portées
Mesure	Fertilité Durée de la gestation Naissance Histopathologie des gonades et des organes cibles + cerveau pour 422 Croissance fœtale et des petits Taux de survie jusqu'au jour 3 post natal + fonction gonadique Comportement sexuel Accouplement / Gestation / Parturition Évaluation neurologique pour 422		Composition de la litière (nombre de résorptions, de fœtus morts, de fœtus vivants) Développement embryonnaire Croissance fœtale Variations morphologiques Malformations congénitales	cohorte 1 : évaluation pour la reproduction/le développement cohorte 2 : évaluation de la neurotoxicité développementale cohorte 3 : évaluation de l'immunotoxicité développementale

4.1.2. Protection des organismes aquatiques

À partir de 100 tonnes par an, le règlement REACH requiert l'évaluation environnementale de la reprotoxicité sur deux espèces : la daphnie (microcrustacé d'eau douce) et le poisson.

4.1.2.1. *Daphnia magna* essai de reproduction (n°211)

La ligne directrice OCDE n°211 évalue les effets d'une substance chimique sur la fertilité de l'espèce *Daphnia magna* Straus ainsi que les effets sur sa descendance (OCDE 2012b). A cette fin, dix jeunes daphnies femelles sont exposées à une substance chimique placée dans le milieu de culture à au moins cinq concentrations différentes. La durée de l'essai est de 21 jours. Quotidiennement, l'apparence de la descendance (dont les malformations) et la mortalité des parents sont observées. La mesure de l'essai est le nombre total de descendants vivants par daphnie parent.

Afin de calculer la PNEC de l'évaluation environnementale, la concentration minimale avec effets observés (CMEO), la concentration (maximale) sans effet observé (CSEO), ainsi que la concentration à partir de laquelle il y a une diminution du nombre de descendants sont déterminées.

Si les données collectées et générées ne sont pas suffisantes pour réaliser l'évaluation environnementale par le poids de l'évidence de la substance chimique concernant ses effets à long terme sur les organismes aquatiques, un test sur poisson est alors nécessaire.

4.1.2.2. Poisson, essai de toxicité aux premiers stades de la vie (n°210)

La ligne directrice OCDE n°210 est un test *in vivo* évaluant la toxicité et la reprotoxicité d'une substance chimique sur une espèce de poisson (OCDE 2013). Quatre espèces sont recommandées : le poisson zèbre (*Danio rerio* - Zebrafish), le médaka (*Oryzias latipes*), la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) et le vairon « tête-de-boule » (*Pimephales promelas*). Les premiers stades de vie des poissons sont exposés à cinq concentrations de la substance d'essai dissoute dans l'eau. L'essai commence en plaçant les œufs fécondés (au moins 80 par niveau de concentration) dans les chambres d'essai (4 au minimum) et continue au moins jusqu'à ce que tous les poissons témoins s'alimentent de façon autonome. A la fin de l'essai (environ 30 jours d'exposition en fonction de l'espèce utilisée), l'éclosion et la survie sont notées. De plus, le poids et la longueur des poissons sont mesurés, l'apparence et le comportement sont observés.

De même que pour le test d'effet chronique sur daphnie, la CMEO, la CSEO ainsi que la concentration à partir de laquelle il y a une apparition d'effets reprotoxiques sont déterminées.

A l'exception du test sur daphnies, l'ensemble des tests décrits jusqu'à présent sont des tests *in vivo* c'est-à-dire utilisant des espèces ou des stades de développement pris en compte par la directive européenne sur les animaux utilisés à des fins scientifiques.

En 2002, l'European Chemicals Bureau a estimé que le coût pour mettre sur le marché européen une substance commercialisée à 1 tonne par an était de 18 850 € quand des données pré-existent. Pour celles commercialisées à plus de 1 000 tonnes par an, le coût était de 683 400 € quand aucune donnée n'était disponible. Les tests de reprotoxicité représentent 54% de ces coûts. (Scialli 2008).

Le développement de méthodes alternatives à l'expérimentation animale pour évaluer de la toxicité du développement est nécessaire pour plusieurs raisons. Tout d'abord, le règlement actuel sur les produits cosmétiques ne permet plus le recours aux tests *in vivo* pour réaliser l'évaluation toxicologique des ingrédients cosmétiques. C'est également une volonté des industries cosmétiques de ne plus avoir recours aux animaux de laboratoire. Enfin ces nouvelles méthodes sont moins coûteuses et moins longues que les tests *in vivo* requis par le règlement REACH, ce qui en font de bons outils rapidement utilisables après la synthèse de nouvelles molécules chimiques pour réaliser leur criblage.

4.2. Tests prédictifs des effets tératogènes alternatifs à l'expérimentation animale validés par l'EURL-ECVAM

Le règlement REACH encourage le recours aux tests alternatifs à l'expérimentation animale validée par l'EURL-ECVAM (European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing) afin de réduire le nombre d'animaux de laboratoire nécessaires.

L'Institut National de l'Environnement industriel et des RISques (INERIS) a récemment estimé que 8,7% des animaux de laboratoire sont utilisés pour l'évaluation toxicologique des substances chimiques et la grande majorité est utilisée dans le domaine de la médecine (49,3%) et pour des études de biologie fondamentale (38,1%) (Figure 36).

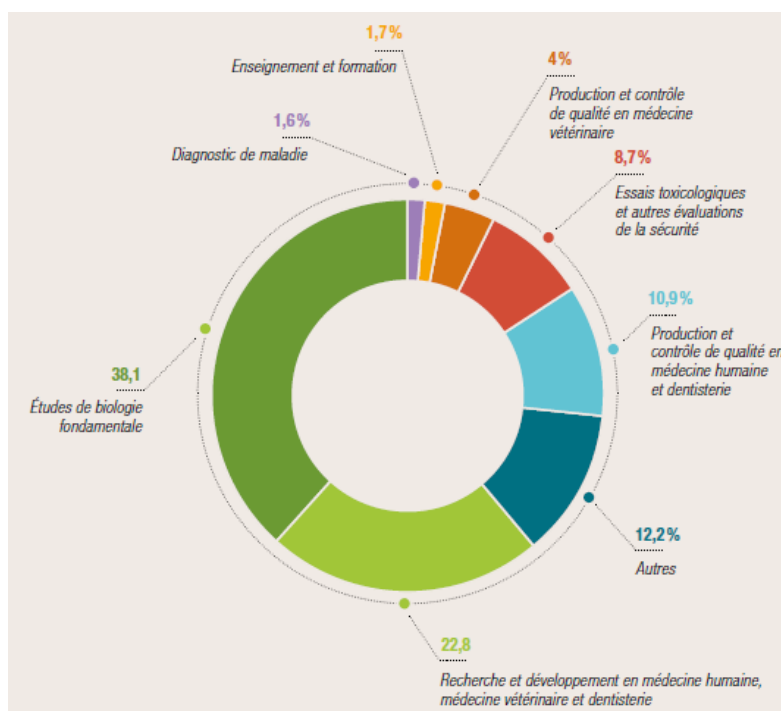


Figure 36 : Répartition des usages des animaux de laboratoire
Source : INERIS

Parmi l'ensemble des usages des animaux à des fins scientifiques, les tests toxicologiques ne sont pas les plus gros consommateurs en animaux de laboratoire. Cependant, parmi les tests toxicologiques, les tests de reprotoxicité sont les plus consommateurs en animaux de laboratoire. En effet, 560 rongeurs sont nécessaires pour un test de criblage (Ligne Directrice OCDE n°421), 150 pour un test de toxicité du développement (Ligne Directrice OCDE n°414) et 3 200 pour le test sur deux générations (Ligne Directrice OCDE n°416 anciennement requis par le règlement REACH). Pour répondre aux exigences du règlement REACH d'évaluer l'ensemble des substances chimiques actuellement mises sur le marché européen, près de 22 millions d'animaux de laboratoire seraient nécessaires pour réaliser l'évaluation de la reprotoxicité et 4 millions pour l'ensemble des autres tests de toxicologie (Scialli 2008).

En 2001, afin de réduire le nombre d'animaux de laboratoire nécessaire à l'évaluation de la reprotoxicité, l'EURL-ECVAM a scientifiquement validé 3 tests pour l'évaluation de la tératogénicité : le test MicroMass (MM), le test Whole Embryo Culture (WEC) et l'Embryonic Stem cell Test (EST). Ils ont pour vocation d'être prédictifs de la ligne directrice OCDE n°414 (Tableau 23). D'autres tests prédictifs de cette ligne directrice existent comme le test validé de culture d'embryon de poulet (CHEST) ainsi que le test en pré-validation, sur embryon d'amphibien xénope (FETAX). Les tests sur

embryons de poisson (ZET) et le test sur cellules embryonnaires (ReproGlo) sont en cours d'harmonisation et d'optimisation.

Tableau 23 : Méthodes alternatives à l'expérimentation animale pour l'évaluation de la reprotoxicité

Source : Adler et al. 2011

Current endpoint addressed in the animal test	Alternative tests available	Part of mechanism covered	Area of application	Status ^a	Estimated time to enter prevalidation process ^b	Comments
OECD TG 414	Murine embryonic stem cell test (EST)	Detects effects on differentiating embryonic stem cells into cardiomyocytes and cytotoxicity	Hazard identification of embryotoxicants	Validated	0	
OECD TG 414	Whole rat embryo culture		Hazard identification of embryotoxicants	Validated		
OECD TG 414	Chicken embryo culture		Hazard identification of embryotoxicants	Pre-validation	0	
OECD TG 414	The Zebrafish Embryo Teratogenicity Assay	Assessment of lethality, malformations and growth retardation	Screening test for the hazard identification of developmental toxicants	Optimisation	>3-5	A common standard protocol is needed to start prevalidation
OECD TG 414	Frog Embryo Teratogenesis Assay Xenopus (FETAX)	Assessment of lethality, malformations and growth retardation	Screening test for the hazard identification of developmental toxicants	Pre-validation	0	
OECD TG 414	Stem cell-based tests for assessing embryotoxicity	Interaction with cell differentiation into neural, cartilage, bone and cardiac cells, chemical effects on signalling pathways	Hazard identification of embryotoxicants	Optimisation	>3-5	Stem cell-based systems are difficult to optimised due to the challenges in stem cell differentiation protocols

Definitions used with regard to the development, validation and acceptance process of alternative methods are based on the description of the original document (Zuang and Eskes 2005). In summary a test is still in the R&D phase if basic research and development of a method and/or the test protocol is still ongoing. The phase of optimisation aims to prepare in vitro tests to fulfil ECVAM's criteria for entering into prevalidation. The prevalidation is a small-scale interlaboratory study to assess the readiness of a test for inclusion in a formal large scale validation study (Curren et al. 1995; Hartung et al. 2004). The time to enter the prevalidation process was estimated assuming optimal conditions. Generally high fall-out rates occur during the phases of test development and after entering the prevalidation phase. The list of alternative assays in this table comprises only a small proportion of the tests anticipated to be needed to replace in vivo reproductive toxicity testing. Only tests for which publications are available since 2005 were included. Estimations regarding the status of the different tests and timeframe have been performed by the working group and not officially done by the ECVAM

^a Five levels in the development of a test have been defined: Research and Development (R&D), Test optimisation, prevalidation, validation, regulatory acceptance

^b Under optimal conditions

4.2.1. Test MicroMass (MM)

Le test MM utilise des cellules mésenchymateuses des bourgeons de membre de rat contenant des chondroblastes (cellules progénitrices à l'origine du futur cartilage). L'obtention de ces cellules nécessite la dissection d'un embryon de rat. Ces cellules mésenchymateuses sont cultivées pendant 5 jours dans des plaques de culture de 96 puits. Dans des conditions normales, ces cellules forment des foci (amas cellulaire) de

chondrocytes (cellules du cartilage). Le test est décrit dans le protocole INVITTOX n°122 (EURL-ECVAM 2002).

Les paramètres d'effet sont la mesure de la dose induisant 50 % d'inhibition de la différenciation (ID50) évaluée par la coloration des cellules du cartilage en bleu alcian et celle induisant 50 % d'inhibition de la prolifération (IP50) évaluée par la coloration en cristal violet des cellules viables.

Pour chaque test, le 5 Fluorouracil une substance de référence considérée comme un agent tératogène fort est utilisé comme témoin positif. La Pénicilline G, considérée comme non tératogène, est utilisée comme témoin négatif.

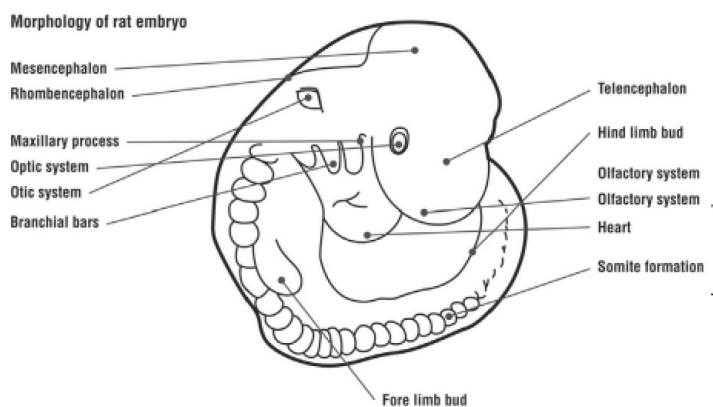
Ce test permet de détecter certains agents tératogènes agissant sur la prolifération, et la différenciation cellulaires et ceux induisant des malformations du cartilage voire du squelette. La prédictivité de ce test est de 100 % pour les forts tératogènes mais est faible pour les tératogènes modérés (Spézia & Barrow 2013). Cette forte prédictivité pour les forts tératogènes peut être expliqué par le fait que les forts tératogènes induisent généralement plusieurs malformations dont des malformations du squelette. En regroupant l'ensemble des agents tératogènes testés, le test MM est sensible avec 70 % de précision. Ce test nécessite la dissection d'embryons de rat, ce qui requiert du temps et une technicité élevée. C'est donc un test laborieux, ne permettant pas d'obtenir un débit très élevé de substances évaluées. Le test MM semble mal adapté au criblage de nombreuses substances.

Le test MM est proposé par le règlement REACH pour le criblage et l'identification des forts tératogènes uniquement (Spézia & Barrow 2013).

4.2.2. *Test Whole Embryo Culture (WEC)*

Le test WEC est décrit dans le protocole INVITTOX n°123 (EURL-ECVAM 2010). Pour réaliser ce test, des embryons de souris sont disséqués en début de neurulation (stade avec 1 à 5 somites). Ceux-ci sont ensuite cultivés dans un milieu de culture contenant la substance à tester pendant 24 à 48h, avec ou sans système d'activation métabolique (fraction S9 de foie de rat contenant les enzymes de détoxification).

En fin de test, le développement du sac vitellin, la croissance et la différenciation embryonnaire et les potentielles malformations sont observés (Figure 37).



WEC LINEAL DISCRIMINANT FUNCTIONS	
I	$15,37 \log(IC_{max}) + 21 [(IC_{503T3} - IC_{NOEC TMS}) / IC_{503T3}] - 23,58$
II	$17,71 \log(IC_{max}) + 27 [(IC_{503T3} - IC_{NOEC TMS}) / IC_{503T3}] - 32,37$
III	$4,21 \log(IC_{max}) + 9,3 [(IC_{503T3} - IC_{NOEC TMS}) / IC_{503T3}] - 4,23$

Non embryotoxicant: $I > II$ y $I > III$

Weak embryotoxicant: $II > I$ y $II > III$

Strong embryotoxicant: $III > I$ y $III > II$

Figure 37 : Différents paramètres de mesure d'effets et formules pour la catégorisation des substances testées dans le test WEC

Source : adapté de Sogorb et al. 2014

Le test WEC a été validé par l'EUURL-ECVAM sur 10 substances de référence dont le chlorure de cadmium, le vinclozolin, et le bisphénol A. Le test s'est avéré spécifique à 80 % (= 20 % des substances faussement identifiées comme ayant des effets tératogènes). Sa sensibilité est seulement de 50 %, c'est-à-dire qu'1 substance tératogène sur 2 a été correctement identifiée.

Le test WEC couvre une des étapes clés du développement : la neurulation mais aussi le début de l'organogénèse. En effet, chez le rat, pendant ces 48h d'exposition, en plus de la fermeture du tube neural, le cœur, les yeux, les oreilles, le système respiratoire et les bourgeons de membre se mettent en place. Les agents tératogènes agissant sur la formation de ces différents peuvent être détectés. Par contre, les malformations des structures mises en place après ces 48h d'exposition, comme le palais fermé ou l'appareil reproducteur, ne sont vraisemblablement pas identifiées. Ceci peut expliquer le manque de sensibilité du test. De plus, il nécessite l'euthanasie d'embryons de souris et des femelles gestantes.

Le comité de conseil scientifique de l'EURL-ECVAM considère que le test WEC est prêt pour une acceptation réglementaire, cependant la dissection et les techniques de culture sont complexes et nécessitent une forte expérience (Spézia & Barrow 2013).

4.2.3. Embryonic Stem cell Test (EST)

Le test EST requiert deux lignées cellulaires de souris. Les cellules souches embryonnaires D3 (ES) se différencient en cardiomyocytes contractiles dans des conditions normales (EURL-ECVAM 2006). Elles représentent le tissu embryonnaire. La deuxième lignée cellulaire de fibroblastes 3T3 représentent le tissu adulte et permettant de relativiser les mesures sur les ES (Figure 38).

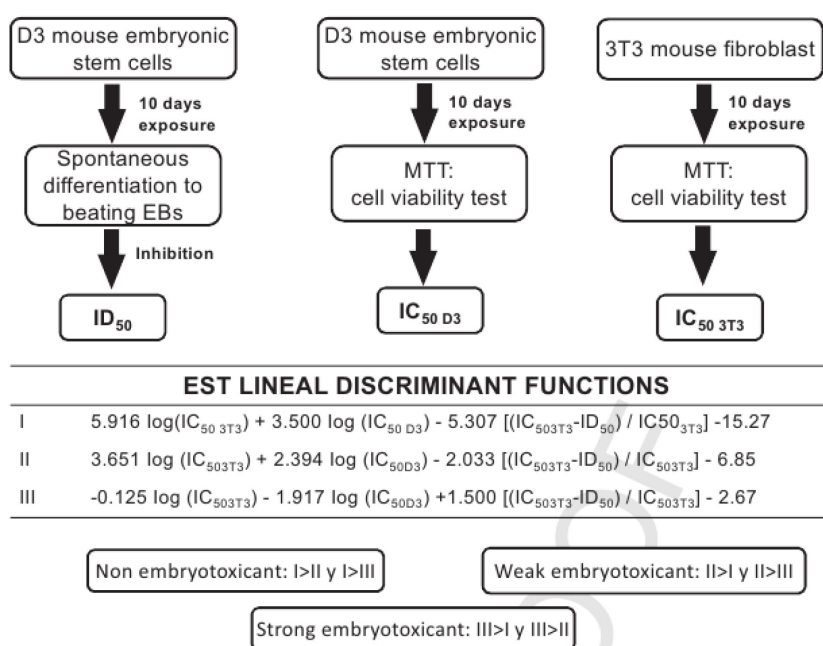


Figure 38 : Description du test EST et de la catégorisation des substances testées

Source : Sogorb et al. 2014

Les cellules D3 et 3T3 sont exposées dans des plaques de culture de 24 puits pendant 10 jours à un gradient de concentrations de la substance à tester.

Après 10 jours d'incubation, on observe l'inhibition de la croissance (ID50 D3) et de la différenciation des cellules D3 en cardiomyocytes (ID50), ainsi que l'inhibition de la croissance cellulaire 3T3 (IC50 3T3).

Le test a été validé sur 16 références :

- 5 substances considérées comme des forts agents tératogènes (Busulphan, Cytosine arabino-side, 5-Fluorouracil, l'Hydroxyurée et l'acide rétinoïque) ;

- 7 substances considérées comme des agents tératogènes modérées (Aspirine, Caféine, Dexaméthasone, Diphenhydramine, Diphénylhydantoïne, Indométhacine et Méthotrexate) ;
- 4 substances non considérées comme des agents tératogènes (Acide ascorbique, Isoniazid, Pénicilline G et Saccharine).

Ce test présente une prédictivité de 100 % pour les forts agents tératogènes et de 70 % pour les agents tératogènes modérés. Il a également une sensibilité de 70 %, c'est-à-dire que 30 % des substances tératogènes ne sont pas identifiées comme telle. Si l'on considère l'ensemble des agents tératogènes testés, le test EST est alors spécifique à 85 % (EURL-ECVAM 2006).

Dans cette version du test (Protocole INVITTOX n°113), on peut s'attendre à ce que le test EST puisse détecter une partie des agents tératogènes altérant la différenciation cellulaire et / ou induisant des malformations cardiaques. Depuis sa validation à l'EURL-ECVAM, d'autres versions du test ont vu le jour pour améliorer les prédictions d'effet sur l'Homme comme le test hEST, qui utilise des cellules souches embryonnaires humaines (Palmer et al. 2013).

L'EURL-ECVAM a validé trois méthodes alternatives à l'expérimentation animale pour l'évaluation de la tératogénicité. Le test MicroMass (MM) a une bonne spécificité (90 %) pour une sensibilité moyenne de 64 % sur les références testées (Tableau 24). Le règlement REACH recommande de prendre en compte uniquement les identifications d'agents tératogènes forts de ce test. Le test Whole Embryo Culture (WEC) présente l'avantage d'utiliser un organisme entier en développement mais à un stade précoce (stade *neurula*) n'intégrant pas la 1^{ère} grande étape du développement embryonnaire : la gastrulation. Il est moyennement sensible (50 %) pour une spécificité de 80 %. Les résultats de ce test sont peu reproductibles entre les laboratoires. Comme le test MM, le test WEC nécessite l'euthanasie des animaux. Contrairement à ces deux derniers, l'Embryonic Stem cell Test (EST) présente l'avantage de ne pas utiliser d'animaux. Il s'avère assez spécifique (85 %) et sensible (70 %). Le test EST est celui le plus repris dans les différents programmes de recherche pour l'évaluation de la reprotoxicité.

Par ailleurs, depuis 2001, ils ne font toujours pas l'objet d'une normalisation OCDE, AFNOR ou ISO.

Tableau 24 : Comparaison des trois tests validés par l’EURL-ECVAM pour l’évaluation de la tératogénicité

Test	MM	WEC	EST
Support	Cellules mésenchymateuses de chondrocytes	Embryon entier au stade <i>neurula</i>	Cellules souches embryonnaires devant se différencier en cardiomyocytes
Euthanasie	Oui	Oui	Non
Durée	5 jours	48 heures	10 jours
Conditionnement	Plaque 96 puits	Boite de pétri	Plaque 24 puits
Nombre de références	25	10	16
Spécificité	90 %	80 %	85 %
Sensibilité	64 %	50 %	70 %

4.3. Programmes de recherche internationaux intégrant des méthodes alternatives à l’expérimentation animale pour l’évaluation de la reprotoxicité

Des programmes de recherche de grande ampleur en Europe et aux États-Unis ont vu le jour pour développer une stratégie d’évaluation de la reprotoxicité (fertilité et tératogénicité) en utilisant des méthodes alternatives à l’expérimentation animale : ReProTect (UE), ChemScreen (UE) et ToxCast (USA).

4.3.1. ReProTect

Le projet ReProTect faisait partie du 6^{ème} European Framework Program (2004-2009). Il avait pour objectif de développer des méthodes alternatives pour réduire ou remplacer l’expérimentation animale dans l’évaluation de la reprotoxicité (Schenk et al. 2010).

ReProTect reposait sur 20 tests *in vitro* pour couvrir l’ensemble des étapes de la reproduction. Trois sont spécifiques aux malformations : l’EST et le WEC décrits précédemment mais aussi le test ReproGlo.

Ce dernier comme l’EST utilise également des cellules embryonnaires de souris. Ce test permet de mettre en évidence des altérations de la voie de signalisation Wnt/ β -catenin, par la détection de la fixation de la substance à tester à différents récepteurs spécifiques de cette voie (Uibel et al. 2010; Schenk et al. 2010). Il a été validé sur 17 substances de référence dont l’hydroxyurée, le chlorure de lithium, la Thalidomide, l’acide

valproïque et le cyclophosphamide. Sur ce jeu de références, le test ReproGlo est 100 % spécifique pour seulement 43 % de sensibilité.

Aucun des tests du programme ReProTect n'a pu prédire seul les effets reprotoxiques des références.

4.3.2. ChemScreen

Le projet ChemScreen (Chemical substance *in vitro* / *in silico* screening system to predict human- and ecotoxicological effects) faisait partie du programme européen : European Framework Program 7 (2007-2013). Il avait pour objectif de développer une stratégie de criblage des effets toxiques des substances chimiques chez l'Homme et l'environnement avec les outils *in silico* et *in vitro* déjà disponibles.

Parmi les différents outils repris dans le projet ChemScreen, certains étaient spécifiques à la reprotoxicité. Deux bases de données : Repeated dose (REPDOSE) et Fertility and developmental toxicity (FEDTEX) ont été enrichies avec les données générées par le projet. Il contenait également des tests *in vitro* pour identifier des malformations. Parmi eux, l'EST est utilisé ainsi que le test ReproGlo, qui est une variante de l'EST intégrant de l'analyse génomique de 5 voies de signalisation : Wnt-, SHH-, TGF-, Delta / Notch-, et RTK-.

Le test d'embryotoxicité sur le poisson zèbre (ZET) faisaient également partie de la batterie de tests. Le ZET a été développé par plusieurs laboratoires selon différents protocoles. Un consortium de 6 laboratoires pharmaceutiques s'est constitué en 2009 pour le développer et l'harmoniser afin de l'intégrer dans la ligne directrice ICH S5 destinée à l'évaluation de la reprotoxicité des produits pharmaceutiques (Beekhuijzen et al. 2015). Les résultats de cette harmonisation ne sont pas encore publiés. Par conséquent, la spécificité et la sensibilité de ce test ne sont pas encore connues.

L'analyse des résultats de l'ensemble des outils pour l'évaluation des substances ayant des effets tératogènes du projet ChemScreen a permis d'identifier correctement l'ensemble des 10 références ayant des effets tératogènes à l'exception du glufosinate ammonium (Figure 39). La seule référence négative, le D-mannitol (n'ayant pas d'effet tératogène *in vivo*) du projet a été correctement identifiée (van der Burg et al. 2015). D'autres substances de référence négatives pourraient intégrer pour déterminer avec précision la spécificité de chaque test et de la batterie de tests.

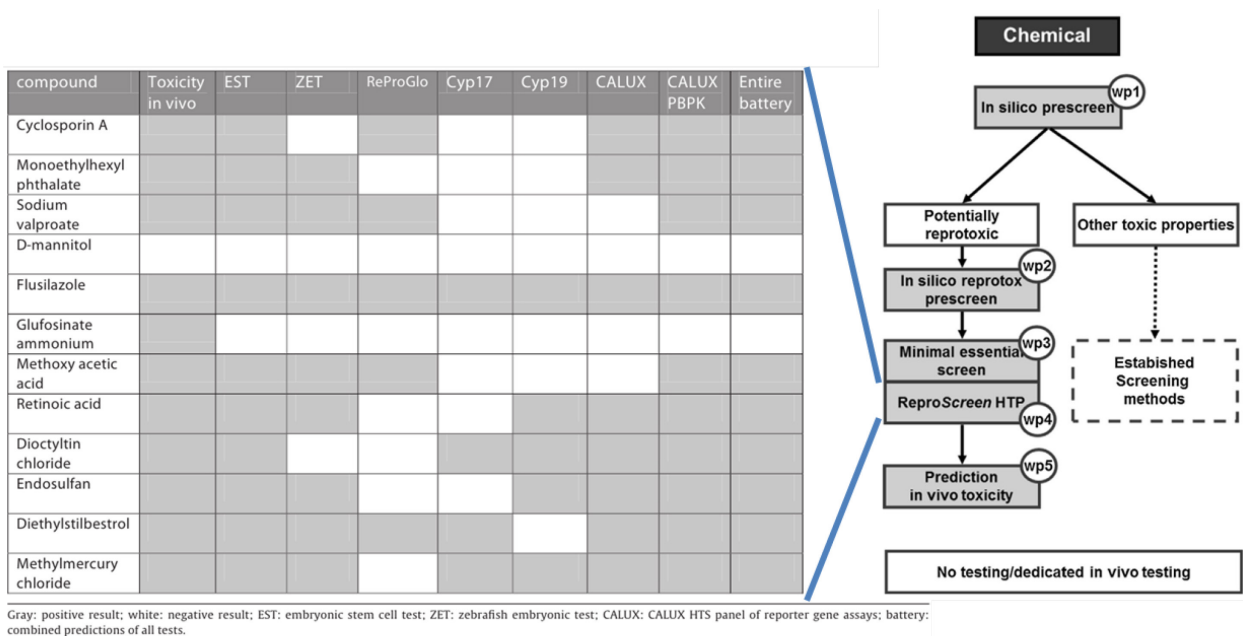


Figure 39 : Stratégie proposée par ChemScreen pour l'évaluation de la reprotoxicité en utilisant des méthodes alternatives à l'expérimentation animale

Source : adapté de van der Burg et al. 2015

Pour l'évaluation de la tératogénicité des substances, le projet ChemScreen a proposé une stratégie de criblage sur 7 méthodes alternatives à l'expérimentation animale relativement complexes et ne s'adaptant pas à une évaluation de la tératogénicité à haut débit. Ces méthodes sont elles-mêmes intégrées dans une stratégie globale intégrant notamment les analyses *in silico*.

4.3.3. ToxCast

Le programme ToxCast de l'agence américaine de la protection de l'environnement (US EPA), lancé en 2007, a pour objectif de développer des approches d'évaluation *in vitro* à haut débit des effets toxicologiques des substances chimiques. Fin 2014, le programme a fini de tester 1 800 substances chimiques sur 342 tests expérimentaux incluant chacun 20 paramètres d'effets mesurés. Les effets reprotoxiques de ces substances chimiques font également partie des effets toxiques recherchés. Des tests *in vitro* étudient les voies mécanistiques des substances reprotoxiques (Sipes et al. 2011). Le test ZET fait également partie du programme. Les résultats du programme ToxCast ne sont pas encore publiés. Par conséquent, la stratégie d'évaluation des substances chimiques n'est pas encore arrêtée.

En plus des tests validés par L'EURL-ECVAM, d'autres méthodes alternatives à l'expérimentation animale et prédictives de la ligne directrice n°414 existent. Parmi eux, le test de culture d'embryon de poulet (CHEST) est validé et le test sur embryon d'amphibien xénope (FETAX) est en pré-validation. Les tests sur embryons de poisson (ZET) et le test sur cellules embryonnaires (ReproGlo) sont en cours d'harmonisation et d'optimisation. Les tests ZET et ReproGlo sont actuellement repris dans différents programmes de recherche internationaux européens (ReProTect et ChemScreen) et américain (ToxCast), utilisant des méthodes alternatives à l'expérimentation animale. Le projet ChemScreen et le programme ToxCast développent des stratégies globales d'évaluation de la toxicité des substances chimiques. Par contre, le projet ReProTect étudie spécifiquement des tests d'évaluation de la toxicité du développement.

5. Besoins de l'industrie cosmétique

Comme cela a été évoqué précédemment, l'industrie cosmétique comme toute industrie chimique est soumise au règlement REACH et doit procéder à l'évaluation toxicologique de ses actifs pour la protection de l'Homme et des organismes aquatiques. Cependant elle a également l'interdiction d'avoir recours à l'expérimentation animale pour réaliser cette évaluation. Ceci exclut l'utilisation des vertébrés à l'exception des stades embryonnaires précoces. Pour se conformer à la réglementation, l'industrie cosmétique ne peut pas avoir recours aux tests *in vivo* requis par le règlement REACH. Elle doit utiliser des méthodes alternatives à l'expérimentation animale pour réaliser l'évaluation de la reprotoxicité de ses nouveaux actifs.

Dans ce contexte, l'industrie cosmétique a besoin de développer un test permettant :

- L'intégration de la toxicocinétique des actifs : (Absorption Distribution Métabolisation Extraction). Par exemple, si l'actif n'est pas disponible pour l'organisme, il ne sera pas absorbé et par conséquent n'aura pas d'effet sur l'organisme. Par ailleurs, comme l'a démontré le cas de la Thalidomide, les capacités métaboliques de l'organisme peuvent avoir un rôle déterminant dans la toxicité et doivent être prises en compte. L'utilisation d'un organisme entier permet d'intégrer la toxicocinétique.
- Une exposition sur l'ensemble des étapes du développement embryonnaire. En effet, nous avons vu qu'un agent tératogène peut agir à n'importe quel stade. Il est

donc important de couvrir l'ensemble des fenêtres de sensibilité d'exposition et ainsi identifier le spectre le plus large possible de malformations.

- L'extrapolation à la toxicologie humaine. Pour cela, le recours à un organisme vertébré semble le plus pertinent.
- De respecter la réglementation cosmétique et ne pas utiliser des animaux définis par la directive européenne 2010/63/UE.
- D'être très spécifique et reproductible afin de ne pas éliminer une substance de manière erronée. Dans ces conditions, le test doit être suffisamment sensible pour éliminer les agents tératogènes les plus puissants.
- D'avoir un débit supérieur aux tests traditionnels de reprotoxicité sur rongeurs et si possible être également moins coûteux.
- D'être facilement transférable dans n'importe quel laboratoire.

Remarque 1 : L'utilisation d'une espèce ayant déjà fait ses preuves en évaluation environnementale permettrait de faciliter son intégration dans une stratégie globale d'évaluation de la reprotoxicité. Les stades embryonnaires précoces de poisson et d'amphibien semblent remplir un maximum de ces conditions.

Remarque 2 : Les effets transgénérationnels comme ceux du DES ne pourront pas être évalués dans ce test idéal. Pour cela, il faudrait avoir recours à des organismes adultes pouvant se reproduire. Or ceux-ci sont couverts par la directive 2010/63/UE et leur utilisation est interdite à l'industrie cosmétique.

Les tests *in vitro* validés par l'EURL-ECVAM ne répondent pas à l'ensemble de ces critères. Les tests FETAX et ZET sont ceux répondant au plus grand nombre de critères de l'industrie cosmétique. L'objectif poursuivi de cette thèse est de les adapter aux exigences réglementaires et de les optimiser afin d'obtenir une spécificité de 100 % tout en restant suffisamment sensibles pour détecter les agents tératogènes.

Pour protéger l'Homme et les organismes aquatiques, le règlement européen REACH oblige les industries chimiques à évaluer la reprotoxicité pour les substances mises sur le marché à partir de 10 tonnes / an. L'évaluateur toxicologue doit faire le bilan de l'ensemble des données disponibles. Pour cela, différentes sources d'informations sont à sa disposition (données épidémiologiques, outils *in silico*, tests *in vitro*). Si les données

disponibles sont insuffisantes pour réaliser l'évaluation selon le « poids de l'évidence », il est alors nécessaire de réaliser des tests complémentaires d'évaluation de la toxicité du développement. Pour cela, les tests des lignes directrices de l'OCDE, recommandés par le règlement REACH, utilisent tous des rongeurs. Les stades de développement analysés et le nombre de générations de rongeurs concerné par le test dépendent du tonnage commercialisé de la substance testée. Pour l'évaluation environnementale des effets à long terme sur les organismes aquatiques, le règlement REACH exige à partir de 100 tonnes par an l'évaluation de l'écotoxicité chronique sur l'invertébré *Daphnia magna* et si nécessaire également sur une espèce de poisson.

L'industrie cosmétique en tant qu'utilisatrice et productrice de substances chimiques est soumise au règlement REACH. Elle est parallèlement soumise au règlement sur les produits cosmétiques interdisant l'utilisation des substances reprotoxiques ainsi que le recours à l'expérimentation animale. Par conséquent, l'industrie cosmétique doit avoir recours à des méthodes alternatives à l'expérimentation animale pour procéder à l'évaluation de la reprotoxicité de ses produits.

L'EURL-ECVAM a validé 3 tests alternatifs à l'expérimentation animale pour l'évaluation de la tératogénicité : les tests MicroMass (MM), Whole Embryo Culture (WEC) et l'Embryonic Stem cell Test (EST). Des 3 tests, le test EST est celui s'approchant le plus du test idéal pour l'industrie cosmétique. En effet, il est assez prédictif et sensible sans avoir recours à l'euthanasie d'animaux. Cependant sa spécificité est insuffisante pour que cette version du test EST soit envisagée dans la réalisation du criblage par exclusion des ingrédients cosmétiques.

Au sein de l'Union Européenne, les embryons de poissons et d'amphibiens ne répondent pas à la définition de l'animal de laboratoire de la directive 2010/63/UE. Des tests sur embryons de poisson, comme le Zebrafish Embryo Teratogenicity test (ZET), sont en cours d'harmonisation et d'optimisation. Ces tests sur poissons pourraient convenir aux besoins de l'industrie cosmétique à condition de ne pas les exposer au-delà des stades embryonnaires et d'obtenir une spécificité de 100 % (identification correcte de toutes les substances non tératogènes) avec une sensibilité satisfaisante pour identifier les agents tératogènes les plus puissants. Par ailleurs, ces tests sur poissons sont repris dans plusieurs programmes de recherche internationaux dont le but est le développement de tests ou de stratégie d'évaluation de la reprotoxicité en ayant recours à des méthodes alternatives à l'expérimentation animale (ReProTect, ChemScreen et ToxCast).

Deuxième partie : Résultats

L'objectif de mes travaux de thèse est de développer un test répondant au maximum aux contraintes et aux besoins de l'industrie cosmétique pour le développement d'une méthode alternative à l'expérimentation animale pour l'évaluation de la tératogénicité de ses ingrédients. Pour cela, une liste de 34 substances de référence a été établie et trois organismes ont été sélectionnés. Les tests utilisant ces organismes ont été évalués sur la liste de substances de référence pour déterminer l'organisme le plus robuste et le test le plus sensible pour l'identification des agents tératogènes dans nos conditions. Ce dernier est ensuite réévalué sur une liste enrichie en substances de référence n'ayant pas d'effets tératogènes connus pour préciser la spécificité du test.

Chapitre 1 : Démarche de sélection des substances et des organismes de référence

Le sujet de la tératogénicité est vaste et partiellement connu. Un agent tératogène peut avoir plusieurs modes d'action et induire différentes malformations selon différentes fenêtres d'exposition chez une ou plusieurs animales et / ou l'Homme.

La réglementation européenne requiert l'évaluation de la reprotoxicité (dont fait partie la tératogénicité) en fonction du tonnage d'une substance chimique. Par ailleurs, l'industrie cosmétique ne peut avoir recours aux tests sur les formes larvaires autonomes d'animaux vertébrés définies par la directive 2010/63/UE.

Pour le développement d'un test alternatif à l'expérimentation animale et prédictif d'effet tératogène chez l'animal et / ou l'Homme, la sélection des substances de référence ainsi que de l'organisme de test est primordiale. Les substances de référence positives ayant des effets tératogènes et celles de référence négatives n'en entraînant pas doivent être choisies avec précaution sur la base de données fiables et confirmées si possible dans plusieurs sources d'information. Les performances du test développé en dépendent.

1. Établissement de la liste de substances de référence

Le choix des substances de référence est crucial pour valider un test. Les données concernant ces substances doivent être les plus fiables possibles afin de correctement les catégoriser comme ayant ou pas des effets tératogènes. La performance du test est directement liée au choix de ces substances de référence. Dans le cas des agents tératogènes, cela est d'autant plus vrai qu'il n'existe pas à ce jour de consensus sur l'identification de leurs effets à part pour quelques agents indiscutablement tératogènes chez l'Homme comme la Thalidomide.

Afin d'obtenir un test d'évaluation de la tératogénicité le plus pertinent possible, une méthode de sélection des substances de référence a été utilisée. Elle consiste à regrouper l'ensemble des informations disponibles sur les classifications ou les catégories de reprotoxicité à travers le monde, mais aussi les données issues de plusieurs bases de données, de quelques publications scientifiques et de programmes de recherche. Cette première étape a permis de répertorier 4 656 substances possédant au moins une alerte de reprotoxicité. Cette étape a également mis en évidence les sources d'information les plus pertinentes pour la sélection des substances de référence pour le test d'évaluation de la tératogénicité.

Le critère d'hydrosolubilité a également été pris en compte dans la sélection des substances de référence pour ne pas intégrer de biais dans le test. En effet, elle conditionne la biodisponibilité de la substance pour les organismes aquatiques. Sélectionner des substances hydrosolubles permet ainsi de limiter le recours à l'analyse chimique nécessaire à la quantification des fractions hydrosolubilisées.

Parmi les sources d'informations sélectionnées pour l'établissement des différentes catégories de substances de référence, les classifications institutionnelles (dossiers REACH, notifications CLP, Fiches de Données de Sécurité, classifications FDA et TGA) sont les plus fiables même si des discordances peuvent exister entre elles. Les données issues d'autres sources d'informations ont été également exploitées en tant qu'alerte de tératogénicité. C'est le cas de celles des bases de données de ReproCollection™ System et le « DART (Developmental And Reproductive Toxicity) decision tree » de l'OECD QSAR Toolbox ainsi que celles d'une étude bibliographique réalisée par nos soins. Ces informations constituent un faisceau de preuves permettant l'établissement de plusieurs catégories de substances de référence du test d'évaluation de la tératogénicité.

1.1. Méthode de sélection des substances de référence

1.1.1. *Établissement d'un tableau préparatoire de données*

Un tableau préparatoire de données (non présenté dans ce manuscrit) a été établi avec des listes de substances ayant des alertes de tératogénicité pour faciliter la sélection de la liste de substances de référence.

Le premier type d'informations collectées est la mention de danger de reprotoxicité. Sur le site de l'ECHA, l'ensemble des substances chimiques de l'Union Européenne ayant cette mention (à l'exception de celles mettant uniquement en cause la fertilité à savoir H360F et H361f) a été extrait. Ainsi 3 262 substances ont été ajoutées au tableau. Une autre source d'information est les "Regulated Chemicals LOLI[®] (List of Lists) System" de ChemADVISOR, Inc. Elles contiennent notamment des listes de substances chimiques de 19 pays à travers le monde pour lesquelles des mentions de reprotoxicité existent. Parmi les 9 pays non européens indépendants de l'ECHA, 1 328 substances chimiques ont été sélectionnées.

Un deuxième type d'informations a également été collecté issu de base de données comme le « DART (Developmental And Reproductive Toxicity) decision tree » de l'OECD QSAR Toolbox, de programmes de recherche (ChemScreen, ReProTect et ToxCast) et de quelques publications scientifiques. Ces différentes sources ont permis l'identification de 757 substances chimiques avec des données de tératogénicité.

Après la fusion des données d'une même substance identifiée dans plusieurs sources d'information, le tableau répertorie 4 656 substances différentes dont la majorité présente au moins une alerte de tératogénicité. Une minorité de ces substances sont des substances de référence négatives utilisées dans un programme de recherche ou dans la validation d'un test de tératogénicité. Ce tableau préparatoire représente 4657 lignes pour 93 colonnes, ce qui rend difficile sa présentation dans le cadre de ce manuscrit.

1.1.2. *Hydrosolubilité des substances de référence*

Afin d'optimiser la disponibilité des substances de référence aux organismes du test, les substances sont volontairement choisies hydrosolubles. Ceci permet de limiter le recours aux analyses chimiques. Les données d'hydrosolubilité sont préférentiellement issues des dossiers REACH, à défaut du Merck Index ou de la fiche de données de sécurité (FDS) du fournisseur. Par ailleurs, l'hydrosolubilité des substances sélectionnées est

également estimée au laboratoire par une mesure de COT (Carbone Organique Total) dans le milieu d'essai.

1.1.3. Représentation des alertes de tératogénicité

Pour faciliter la lecture des données et la sélection des substances de référence, un code couleur a été instauré en fonction du niveau de qualité de l'information ou de certitude des effets tératogènes :

- rouge foncé = classification reprotoxique CLP harmonisée ou effets tératogènes chez l'Homme avérés ;
- rouge = classification reprotoxique ou effets tératogènes chez l'animal ou effets tératogènes suspectés chez l'Homme (existence de cas isolés) ;
- rouge clair = données de reprotoxicité sans mention de danger de reprotoxicité ou suspicion d'effets tératogènes chez l'animal ;
- vert clair = absence de mention de danger de reprotoxicité ou données insuffisantes pour écarter des effets tératogènes ;
- vert = absence de mention de danger de reprotoxicité ou données n'indiquant pas d'effet tératogène chez l'animal ou l'homme ;
- vert foncé = absence de mention de danger de reprotoxicité ou reconnu sans effet tératogène chez l'Homme et/ou l'animal ;
- blanc = donnée inexistante.

Toutes les nuances de rouge constituent des alertes d'effet tératogène chez l'animal et / ou l'Homme. Ce code couleur facilite également la détermination des différentes catégories de substances de référence.

1.2. Sélection de 34 substances et recherche d'informations complémentaires

Parmi les 4 656 substances avec au moins une alerte de tératogénicité, une sélection a été réalisée en fonction de la quantité et de la qualité des alertes identifiées, mais aussi en fonction des facilités d'approvisionnement et de manipulation en laboratoire. Par exemple, les substances inflammables ou nécessitant une déclaration à l'état (comme pour certains psychotropes) n'ont pas été retenues. Selon ces différents critères, les substances de référence retenues sont essentiellement des médicaments ou des additifs alimentaires pour lesquels il existe des données de tératogénicité les plus fiables, répandues et concordantes.

Une priorité a également été donnée aux substances faisant partie de liste de substances pour valider des tests.

Pour les 34 substances sélectionnées, d'autres informations ont été recherchées comme celles présentes dans leur dossier REACH, de leur FDS, leur catégorisation à la FDA ou au TGA, mais aussi dans les bases de données de ReproCollection™ System et du « DART scheme v. 1.0 » de l'OECD QSAR Toolbox (dernière version 3.3.5.17).

Une étude bibliographique de la littérature scientifique des substances de référence sélectionnées a également été réalisée par nos soins pour obtenir d'autres alertes d'effets tératogènes chez l'animal ou l'Homme. Cette étude a été étendue à toutes les espèces et non restreinte aux données sur l'Homme ou les organismes aquatiques. L'ensemble des informations ayant servies aux différentes catégorisations sont répertoriées dans le Tableau 27 avec le système de code couleur décrit précédemment.

1.3. Détermination d'une liste de substances de référence

Comme cela a été présenté précédemment, des discordances peuvent exister pour une même substance chimique entre les différentes notifications CLP, un dossier REACH enregistré et la FDS. En fonction de l'ensemble des données récoltées sur les 34 substances sélectionnées, ces dernières sont réparties dans trois catégories de substances de référence (Tableau 27). La première catégorie de substances rassemble 14 substances de référence, qualifiées de positives. Selon nos critères, elles sont considérées comme tératogènes, sur la base de la présence d'au moins une mention de danger de reprotoxicité. La deuxième catégorie de substances rassemble 12 substances, qualifiées également de positives. Selon nos critères, elles sont suspectées d'être tératogènes sur la base de la présence d'alertes de tératogénicité. La troisième et dernière catégorie de substances regroupe 8 substances, qualifiées de négatives. Selon nos critères, elles ne possèdent pas d'alerte de tératogénicité.

1.3.1. Première catégorie : substances de référence positives possédant au moins une mention de danger de reprotoxicité

Selon nos critères de catégorisation, l'analyse des différentes classifications institutionnelles c'est-à-dire les mentions de danger de reprotoxicité pour l'Homme (H360 et H361) ainsi que les catégories FDA et TGA, aboutit à placer 14 substances dans cette catégorie.

Une classification harmonisée CLP permet directement de placer une substance dans la première catégorie. C'est le cas pour seulement deux substances : l'amantadine et

l'éthylènthiourée. Lorsque les notifications CLP d'une même substance n'ont pas fait l'objet d'une harmonisation, la mention de danger la plus défavorable est indiquée entre parenthèse dans le Tableau 27. Cette mention de danger de reprotoxicité par l'Homme non harmonisée doit être confirmée par une autre mention pour l'Homme dans un dossier REACH ou dans la FDS, ou alors par une catégorie « X » ou « D » de la FDA ou du TGA pour permettre le classement de cette substance dans la 1^{ère} catégorie.

Dans leur(s) notification(s) CLP, 5 substances ont une mention de danger de reprotoxicité à la fois pour les organismes aquatiques et pour l'Homme. Il s'agit du chlorure de cadmium, du captopril, du cyclophosphamide C, du fluorouracil et du chlorure de lithium.

Seulement 5 substances ont un dossier REACH enregistré. Parmi elles, 3 avec des mentions de danger de reprotoxicité : l'éthylènthiourée (H360), le fluorouracil (H360) et l'amantadine (H361fd). Cette dernière a une mention différente dans sa classification harmonisée CLP : H360. Dans leur dossier REACH, le chlorure de lithium et l'acide acétylsalicylique n'ont pas de mention de danger de reprotoxicité, ce qui diverge également de leur classification CLP respective : H360Df et H360.

Sur les 14 substances de cette 1^{ère} catégorie, uniquement 7 substances ont une mention de danger de reprotoxicité dans leur FDS. Cela est le cas pour le 6 aminonicotinamide (H360), l'acide acétohydroxamique (H360), le chlorure de cadmium (H360FD), le captopril (H361), l'éthambutol (H360), l'éthylènthiourée (H360D) et l'hydroxyurée (H361). Le captopril et l'hydroxyurée ont des mentions différentes dans leur notification CLP la plus défavorable : H360D et H360.

La FDA classe « X » l'utilisation du 6 aminonicotinamide et du fluorouracil, « D » l'utilisation de l'acide acétylsalicylique, du captopril, du cyclophosphamide, de l'hydroxyurée et du chlorure de lithium, et « C » celle de l'amantadine, de l'éthambutol, de l'isoniazide et du métoprolol.

Le TGA classe « D » l'utilisation du captopril, du cyclophosphamide, du fluorouracil, de l'hydroxyurée et du chlorure de lithium ; et « C » celle du métoprolol.

La FDA et le TGA ont parfois des catégorisations différentes : le TGA a une catégorisation plus modérée que la FDA sur les effets tératogènes de l'amantadine, de l'éthambutol et de l'isoniazide.

Certaines substances de référence de la première catégorie ont également fait partie de listes de validation de tests d'évaluation de la tératogénicité Tableau 25. Par exemple, l'hydroxyurée est une référence positive d'une proposition de liste pour la validation d'un

test d'évaluation de la tératogénicité basée sur la dose d'exposition (Daston et al. 2014), mais aussi de la validation du test FETAX (Bantle et al. 1994) et du test sur cellules souches humaines hES intégré dans le programme américain ToxCast (Palmer et al. 2013). L'hydroxyurée semble faire consensus quant à ses effets tératogènes. Ceci n'est pas le cas pour l'isoniazide qui est une référence positive pour le FETAX mais négative pour le test hES.

Par ailleurs, l'acide acétylsalicylique est une substance de référence modérément tératogène de la liste de validation du test EST de l'EURL-ECVAM. Le fluorouracil est le témoin positif du test MM. Le chlorure de cadmium est une substance de référence positive de la validation du test WEC. Le chlorure de lithium fait partie de la liste de validation du test ReproGlo du programme ReProTect. L'éthylèneurée fait partie de la « liste des substances extrêmement préoccupantes candidates en vue d'une autorisation » de l'ECHA pour la raison de toxicité de la reproduction (Article 57 c).

Tableau 25 : Implication de 5 substances de référence de la première catégorie dans des listes de validation de test d'évaluation de la tératogénicité

	DART consensus list (Daston et al. 2014)	FETAX (Bantle et al. 1994)	hES (ToxCast) (Palmer et al. 2013)	ReproGlo (ReProTect) (Uibel et al. 2010)
6 Aminonicotinamide		+	+	
Cyclophosphamide		+		+
Fluorouracil		+	+	
Hydroxyurée	+	+	+	+
Isoniazide		+	-	

Remarque : Le premier réflexe pour connaître la dangerosité d'une substance est de consulter sa FDS, établie par le fournisseur. Pourtant, cette dernière peut ne pas contenir une mention de danger de reprotoxicité existante dans d'autres sources réglementaires. Utilisée seule, elle peut mener à une conclusion erronée sur la tératogénicité d'une substance. Par exemple, dans notre système de catégorisation des substances, le fluorouracil se trouve dans la 1^{ère} catégorie car il remplit tous nos critères de cette catégorie. En effet, il possède la mention de danger de reprotoxicité H360 dans au moins une notification CLP et dans son dossier REACH enregistré. Il possède également une catégorie « X » à la FDA et « D » à la TGA. Malgré toutes ces informations, sa FDS du fournisseur SIGMA- ALDRICH ne possède aucune mention de danger de reprotoxicité pour l'Homme. Cet exemple indique bien que l'on ne peut pas uniquement se baser sur les FDS pour définir si une substance est tératogène. Par conséquent, la présence d'une mention de danger de reprotoxicité dans la FDS ne constitue qu'une alerte supplémentaire pour cette 1^{ère} catégorie.

1.3.2. Deuxième catégorie : substances de référence positives possédant des alertes de tératogénicité

La deuxième catégorie regroupe les substances positives ayant des alertes de tératogénicité : mention de danger pour les organismes aquatiques, présence de données de tératogénicité dans la FDS, classification reprotoxique par la FDA ou TGA ou alerte dans une base de données ou indication d'effets tératogènes dans une publication scientifique. Les substances ayant fait l'objet d'une seule mention de danger pour l'Homme dans ses notifications CLP, non confirmée par une alerte de tératogénicité sont également classées dans cette 2^{ème} catégorie.

Une substance chimique peut avoir une mention de danger d'effets à long terme pour les organismes aquatiques sans que cette mention soit justifiée par des données de reprotoxicité issues des lignes directrices OCDE n°211 ou 210. Comme cela a été développé précédemment, cette mention de danger est parfois uniquement basée sur des données aiguës et / ou des propriétés physico-chimiques de la substance évaluée. Par conséquent, cette mention est uniquement une alerte de tératogénicité pour classer une substance dans la deuxième catégorie de références positives.

La présence de ces données de reprotoxicité dans la FDS constitue également une alerte pour classer une substance dans la deuxième catégorie, tout comme les catégorisations « X », « D » et « C » de la FDA ou du TGA.

Ces alertes ont permis de catégoriser 12 substances dans cette deuxième catégorie.

La caféine, la colchicine et l'uréthane ont une notification CLP harmonisée sans mention de danger de reprotoxicité. Cependant les deux premières sont classifiés « C » par la FDA et la troisième a des données de tératogénicité dans sa FDS.

Le lévamisol, le métronidazole, la pyrilamine et la saccharine ont au moins une notification CLP avec une mention de danger de reprotoxicité pour l'Homme sans que cela soit confirmé par une autre alerte institutionnelle. Mis à part la saccharine, elles ont également des alertes de tératogénicité dans les bases de données et l'étude bibliographique.

La bupivacaïne et l'hydroxyzine ont une classification « C » à la FDA, ce qui permet également de les classer dans la deuxième catégorie. Le cefuroxime a des données de tératogénicité dans sa FDS et une alerte dans la DART scheme de l'OECD QSAR Toolbox. Le diphenhydramine et la doxylamine ont des alertes de tératogénicité dans les bases de données et / ou dans l'étude bibliographique.

Certaines substances de référence de la deuxième catégorie ont également fait partie de listes de validation de test d'évaluation de la tératogénicité (Tableau 26).

Par exemple, la caféine est une référence positive ou négative en fonction de la dose d'exposition de la liste consensuelle DART (Daston et al. 2014). Elle est une référence positive pour la validation du test FETAX (Bantle et al. 1994) mais négative pour le test sur hES du programme ToxCast (Palmer et al. 2013). Ces éléments justifient de classer la caféine dans la deuxième catégorie. Par contre, la saccharine est une référence négative dans ces trois listes malgré une notification CLP avec une mention de danger H361, ce qui la place également dans la deuxième catégorie.

Tableau 26 : Implication de 4 substances de référence de la seconde catégorie dans des listes de validation de test d'évaluation de la tératogénicité

	DART consensus list (Daston et al. 2014)	FETAX (Bantle et al. 1994)	hES (ToxCast) (Palmer et al. 2013)
Caféine	+/-	+	-
Diphenhydramine			-
Doxylamine			-
Saccharine	-	-	-

1.3.3. Troisième catégorie : substances de référence négatives sans alerte de tératogénicité

Les catégories « A » et « B » de la FDA ou du TGA contribuent au faisceau de preuves pour identifier une substance comme n'ayant aucune alerte de tératogénicité.

Les dernières substances constituent la troisième catégorie avec 8 références négatives sans alerte de tératogénicité dans nos sources d'information : l'amarante, l'acide ascorbique, l'acide azélaïque, la cefotaxime, le ceftriaxone, le cromolyn, le cyclamate et le lactitol.

Tableau 27 : Données de tératogénicité réglementaires, bibliographiques et issues de bases de données recueillies sur les substances de référence choisies

CAS #	Chemical name	Human reprotoxic labelling or classification					Environmental long term toxicity labelling			Reprotoxic Databases					Bibliographic study	
		CLP () if not harmonized / worst	REACH dossier () pre registered	EU MSDS	US FDA category	TGA Australian category	CLP () if not harmonized / worst case	REACH dossier () pre registered	EU MSDS	Shepard's Catalog of Teratogenic Agents	TERIS	REPROTOX	DART decision tree Wu et al., 2013	DART Toolbox	Human teratogenic effects	Animal teratogenic effects
329-89-5	6-Aminonicotinamide	(H360)	(-)	H360	-	-	(-)	(-)	No							
546-88-3	Acetohydroxamic acid	(H360D)	(-)	H360	X	-	(-)	(-)	No							
50-78-2	Acetylsalicylic acid	(H360)	conclusive	No	D	-	(-)	conclusive	No							
665-66-7	Amantadine	H360	H361fd	No	C	B3	-	H412	No							
7790-78-5	Cadmium chloride,	(H360FD)	(-)	H360FD	-	-	(H410)	(-)	H410							
62571-86-2	Captopril	(H360D)	(-)	H361	D	D	(H412)	(-)	No							
6055-19-2	Cyclophosphamide C	(H360FD)	(-)	No	D	D	(H413)	(-)	No							
1070-11-7	Ethambutol	(H360FD)	(-)	H360	C	A	(-)	(-)	No							
96-45-7	Ethylenethiourea	H360D	H360	H360D	-	-	-	data lacking	No							
51-21-8	Fluorouracil	(H360)	H360	No	X	D	(H412)	data lacking	H412							
127-07-1	Hydroxyurea	(H360)	(-)	H361	D	D	(-)	(-)	No							
54-85-3	Isoniazid	(H360)	(-)	No	C	A	(-)	(-)	No							
7447-41-8	Lithium chloride	(H360Df)	conclusive	No	D	D	(H411)	conclusive	No							
37350-58-6	Metoprolol	(H361d)	(-)	No	C	C	(-)	(-)	No							
18010-40-7	bupivacaine hydrochloride	(-)	(-)	No	C	A	(H412)	(-)	No							
58-08-2	Caffeine	-	conclusive	No	C	A	-	conclusive	No							
56238-63-2	cefuroxime sodium	(-)	(-)	No	B	B1	(-)	(-)	No							
64-86-8	Colchicine	-	conclusive	No	C	D	-	data lacking	No							
58-73-1	Diphenhydramine HCl	(-)	data lacking	No	B	A	(-)	data lacking	No							
469-21-6	Doxylamine	(-)	data lacking	No	A	A	(H412)	H412	No							
68-88-2	Hydroxyzine	NA	(-)	No	C	A	NA	(-)	No							
16595-80-5	Levamisol	(H361d)	(-)	No	-	B3	(H412)	(-)	No							
443-48-1	Metronidazole	(H360)	(-)	No	B	B2	(H411)	(-)	No							
91-84-9	Pyrilamine	(H361)	(-)	No	-	-	(-)	(-)	No							
81-07-2	Saccharin	(H361)	conclusive	No	-	-	(-)	conclusive	No							
51-79-6	Urethane	-	(-)	No	-	-	-	(-)	No							
915-67-3	Amaranth	(-)	(-)	No	-	-	(-)	(-)	No							
62624-30-0	Ascorbic acid	NA	(-)	No	A	-	(-)	(-)	No							
123-99-9	Azelaic acid	(-)	conclusive b	No	B	B1	(-)	conclusive	No							
64485-93-4	Cefotaxime sodique	(-)	(-)	No	B	B1	(-)	(-)	No							
73384-59-5	Ceftriaxone	(-)	(-)	No	B	B1	(-)	(-)	No							
15826-37-6	Cromolyn disodique	(-)	(-)	No	B	-	(-)	(-)	No							
139-05-9	Cyclamate sodium	(-)	(-)	No	-	-	(-)	(-)	No							
81025-04-9	Lactitol monohydrate	NA	NA	No	-	-	NA	NA	No							

Tératogène avéré chez l'Homme	Tératogène chez l'animal	Tératogène suspecté chez l'animal	Absence de données de tératogénicité	Données insuffisantes de tératogénicité	Données d'absence d'effet tératogène chez l'animal	Données d'absence d'effet tératogène chez l'Homme

En résumé de ce chapitre, 34 substances de référence ont été sélectionnées sur la base des données de classifications institutionnelles (notification CLP, dossier REACH, catégories FDA et TGA), des bases de données (ReproCollection™ System et DART scheme de l'OECD QSAR Toolbox) et d'une étude bibliographique. Plusieurs catégories ont été définies : la première regroupe 14 substances de référence ayant une mention de danger de reprotoxicité dans une notification CLP harmonisée ou dans une notification CLP non harmonisée confirmée par une autre classification institutionnelle. Une deuxième catégorie regroupe 12 substances de référence n'ayant pas d'étiquetage de reprotoxicité mais possédant plusieurs alertes de tératogénicité dans les bases de données utilisées ou dans l'étude bibliographique. Ces deux premières catégories constituent 26 références positives. Une dernière catégorie regroupe 8 substances de référence pour lesquelles aucune alerte d'effet tératogène n'a été identifiée dans les différentes sources d'informations utilisées. Ces 34 références ont été volontairement choisies hydrosolubles afin d'optimiser leur biodisponibilité vis-à-vis des organismes aquatiques sélectionnés dans la suite du manuscrit.

2. Sélection des organismes modèles

Cette partie est consacrée à la sélection d'organismes adaptés aux contraintes et aux besoins précités de l'industrie cosmétique. Les tests utilisant ces organismes compatibles avec ses exigences doivent permettre d'éliminer les agents tératogènes les plus puissants tout en identifiant correctement les substances de référence négatives. Comme cela a été précisé précédemment, le test alternatif à l'expérimentation animale idéal pour l'industrie cosmétique utiliserait un organisme vertébré entier utilisé pour l'évaluation environnementale et exposé pendant toute sa période embryonnaire. Enfin, l'organisme modèle retenu doit permettre l'élaboration d'un test rapide adapté au criblage de nombreux produits.

Trois organismes (deux espèces de poisson et une d'amphibien) répondent au maximum de critères précités. En effet, les embryons de poisson et d'amphibien aux stades embryonnaires ne sont pas intégrés dans la définition de la directive européenne 2010/63/UE. De plus, ces organismes sont tous transparents à la fin de leurs stades embryonnaires facilitant ainsi l'identification des malformations. Ils ont l'avantage d'être des espèces modèles d'évaluation environnementale de l'OCDE et d'être faciles à se procurer ainsi qu'à manipuler. Enfin, ils font déjà l'objet de différents tests d'évaluation de la tératogénicité. Cependant, ces derniers présentent des limites précisées dans ce manuscrit.

Les caractéristiques générales de ces organismes modèles, leur développement embryonnaire ainsi que leur usage en (éco)toxicologie sont présentées dans cette partie du manuscrit.

2.1. Critères de sélection

Le "Committee on Developmental Toxicology" et le "National Research Council (US)" ont publié en 2000 une liste d'organismes alternatifs proposés pour l'évaluation de la tératogénicité (Tableau 28).

L'usage des produits cosmétiques et d'hygiène corporelle conduit à leur rejet dispersif et continu dans les effluents domestiques. Par conséquent, les substances chimiques contenues dans ces produits sont alors susceptibles de rejoindre le milieu naturel et plus particulièrement le milieu aquatique. Dans ce contexte, un organisme vertébré entier aquatique serait pertinent pour répondre à notre besoin.

Tableau 28 : Organismes alternatifs proposés pour l'évaluation de la tératogénicité

Source : National Research Council (US) 2000

System	End Point Monitored	References
Mammalian embryos ex utero		
<i>Rodent whole-embryo culture</i>	Morphogenesis	Webster et al. 1997
<i>Rodent embryonic organ culture: limb; palate</i>	Morphogenesis	Kochhar 1982; Abbott et al. 1992
Sub-mammalian embryos		
<i>Avia: Chick embryotoxicity test (CHEST)</i>	Morphogenesis	Peterka and Pexieder 1994
<i>Amphibia: Frog embryo test (FETAX)</i>	Morphogenesis	Fort et al. 1998
Fish: Mekada, zebrafish	Morphogenesis	Herrmann 1993
Arthropods: Cricket, artemia, <i>Drosophila</i>	Morphogenesis	Walton 1983; Sleet and Brendel 1985; Lynch et al. 1991
Flatworms: Planaria	Morphogenesis	Best and Morita 1991
Echinoderms: Sea urchin	Morphogenesis	Graillet et al. 1993
Coelenterates: Hydra	Regeneration	Johnson et al. 1988
Protista: Slime mold	Morphogenesis	Tillner et al. 1996

Pour l'évaluation de la sécurité des produits cosmétiques, la réglementation européenne interdit le recours aux tests sur les animaux utilisés à des fins scientifiques définis par la directive 2010/63/UE. Les animaux vertébrés aux stades embryonnaires ne répondent pas à cette définition. Par conséquent, ils peuvent être utilisés dans un test de l'évaluation de la tératogénicité. Parmi les propositions du Tableau 28, trois organismes vertébrés aquatiques répondent à nos critères : le poisson zèbre, le poisson médaka et l'amphibien xénope du test

FETAX. En effet, les œufs fertilisés de poisson jusqu'à l'alevin vésiculé possédant encore sa réserve vitelline (Embry et al. 2010) et les œufs fertilisés d'amphibien jusqu'au têtard au stade 45 du développement (Nieuwkoop et al. 1956) ne sont pas considérés par la directive 2010/63/UE (Figure 40). Ce point de vue est partagé par l'EURL-ECVAM car les besoins caloriques de ces organismes sont assurés par les réserves vitellines endogènes (Worth & Balls 2002).

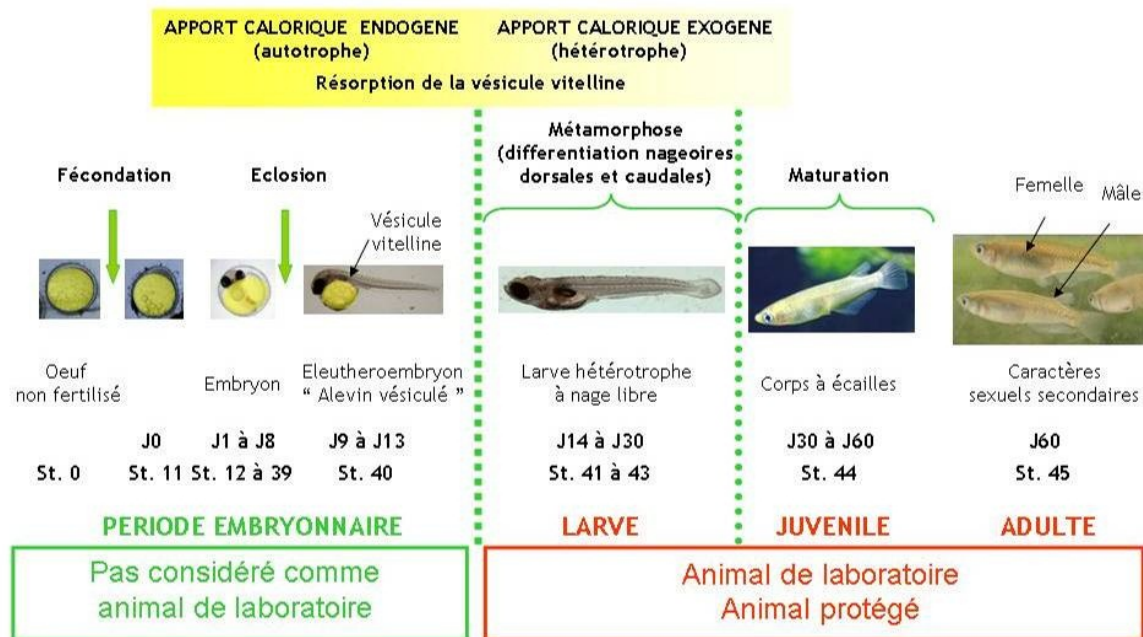


Figure 40 : Exemple des stades de développement considérés par la directive européenne 2010/63/UE avec le poisson médaka *Oryzias latipes*

Source : Poster de Barbeau E et al, 2008

Comme cela a été indiqué dans la première partie de ce manuscrit, le règlement REACH requiert l'évaluation de la reprotoxicité d'une substance chimique sur rongeurs lorsque son tonnage dépasse 10 tonnes par an. Au-delà de 100 tonnes par an, des tests d'effets à long terme sur daphnies et si nécessaire sur poissons, sont requis pour l'évaluation environnementale. L'organisme poisson est donc pertinent pour l'évaluation de la tératogénicité avec les espèces poisson zèbre et médaka. L'amphibien xénope n'est pas systématiquement requis par le règlement REACH. En effet, un test de métamorphose des Amphibiens (Ligne directrice n°231) est demandé en cas de suspicion d'effet de perturbation thyroïdienne de la substance à évaluer (OCDE 2009b). Hormis ces considérations réglementaires, le xénope est un tétrapode et donc phylogénétiquement plus près de l'Homme (360 millions d'années) que le poisson (450 millions d'années) (Figure 41).

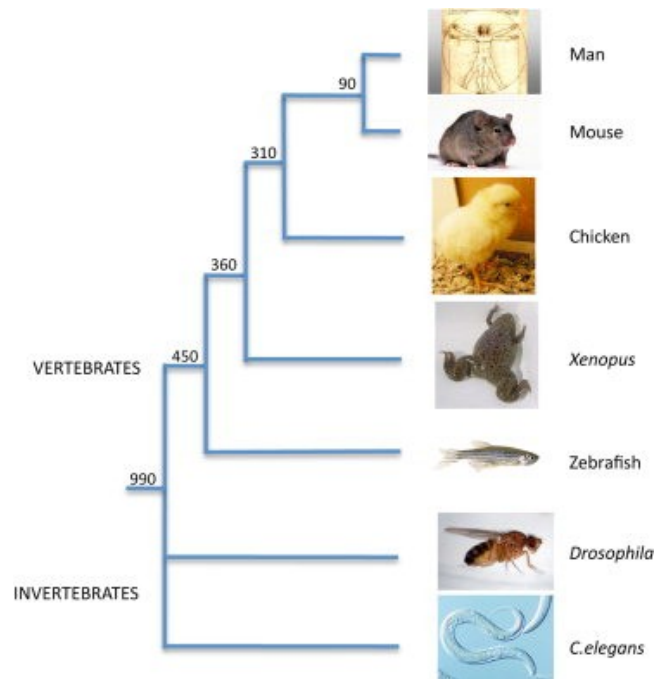


Figure 41 : Arbre phylogénétique montrant les principaux modèles communément utilisés en recherche biomédicale et leur relation évolutive

Source : Wheeler & Brändli 2009

Pour les mêmes raisons de conformités réglementaires, il n'est pas possible d'avoir un élevage de poissons ou d'amphibiens dans notre laboratoire. C'est pourquoi les œufs de ces organismes juste fécondés doivent supporter le transport de l'élevage à notre laboratoire. Les pontes doivent être suffisamment abondantes pour assurer un test à moyen voire haut débit. L'élevage doit également être fiable pour approvisionner notre laboratoire tout au long de l'année. Enfin les embryons doivent être assez robustes pour supporter les manipulations comme le transfert d'un contenant à un autre.

Un autre avantage de ces organismes est la petite taille de leurs embryons permettant leur exposition dans de petits volumes placés dans des plaques de culture multipuits. Cette miniaturisation de la taille du test par rapport aux tests *in vivo* sur rongeurs permet d'obtenir un débit de tests satisfaisant permettant l'évaluation de plusieurs dizaines de substances par an.

A la fin du test de tératogénicité, les embryons de ces trois organismes sont encore suffisamment transparents pour permettre l'identification des malformations externes mais aussi internes au moment de leur observation sous loupe.




Les poissons zèbre et médaka ainsi que l'amphibien xénope ont été sélectionnés pour le développement d'un test alternatif à l'expérimentation animale pour l'identification des effets tératogènes des substances chimiques.

2.2. Comparaison de trois organismes modèles

2.2.1. Présentation générale

Les trois organismes sélectionnés pour le développement d'un test de tératogénicité alternatif à l'expérimentation animale sont comparés dans le Tableau 29.

Tableau 29 : Comparaison générale du poisson zèbre, du médaka et du xénope

	Poisson zèbre	Médaka	Xénope
			
Classe	Téléostéens	Téléostéens	Anoures
Espèce	<i>Danio rerio</i>	<i>Oryzias latipes</i>	<i>Xenopus laevis</i>
Souche	AB	CAB	Sauvage
Caractéristiques génétiques	Diploïde 25 chromosomes	Diploïde 48 chromosomes	Pseudotétraploïde 36 chromosomes
Détermination sexuelle	Génétique : femelle ZW et mâle ZZ Et environnementale	Génétique : femelle XX et mâle XY	Génétique : femelle ZW et mâle ZZ
Origine géographique	Inde et péninsule Malaise	Asie du sud-est (Japon, Corée, Chine...)	Afrique subsaharienne
Milieu naturel	Eau douce : rizières, eaux stagnantes et petits cours d'eau de lent débit	Eau douce et eau de mer : rizières, océans et fleuves.	Eau douce : étangs et mares.
Statut de conservation UICN	Préoccupation mineure	Vulnérable	Préoccupation mineure
Taille adulte	de 4 à 5 cm	2 à 4 cm	Femelles de 12 à 14 cm et mâles de 7 à 10 cm
Taille des œufs	1 mm	1 mm	1,15 mm
Quantité d'œufs par femelle	50 à 300	10 à 50	300 à 1 000

Le poisson zèbre et le médaka sont des Téléostéens c'est-à-dire des poissons osseux à nageoire rayonnée. Les Téléostéens représentent 99,8% des espèces poissons avec 23 600 espèces. Ils sont également très représentatifs des vertébrés : près de la moitié des espèces vertébrés sont des Téléostéens.

Le xénope est un amphibien faisant partie des Anoures c'est-à-dire des amphibiens sans queue à l'âge adulte à la différence des Urodèles comme les salamandres. Les Anoures représentent 90% des amphibiens avec 6 200 espèces. Ils sont donc très représentatifs des

amphibiens et représentent plus de 10% des espèces vertébrés. Le xénope a la particularité d'être un Anoure exclusivement aquatique.

Ces trois organismes vivent en eau douce et le médaka peut également vivre en eau de mer. Ce sont des organismes prisés en aquariophilie.

Le nombre de gènes reste relativement stable au cours de l'évolution, par contre le nombre de copies de ces gènes varie. Tout comme l'Homme, le poisson zèbre et le médaka sont diploïdes. Par contre, le xénope est pseudotétraploïde : une partie de son génome est diploïde et l'autre partie tétraploïde. Une comparaison du génome des vertébrés montre que plus de 10 000 gènes sont communs entre le poisson zèbre, le poulet, la souris et l'Homme (Figure 42). Et près de 13 000 sont communs entre le poisson zèbre et l'Homme. Certains gènes sont spécifiques à une espèce : environ 3 600 pour le poisson zèbre et environ 3 000 pour l'Homme. Les proportions sont les mêmes avec le médaka (Howe et al. 2013; Kasahara et al. 2007). Cette conservation des gènes est un élément supplémentaire pour expliquer les similitudes de développement embryonnaire entre les espèces ainsi que la conservation des mécanismes de contrôle du développement embryonnaire au cours de l'évolution.



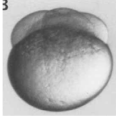
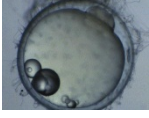

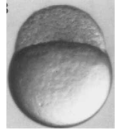
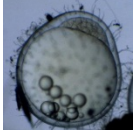

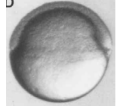

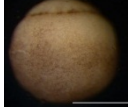
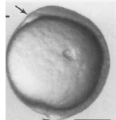




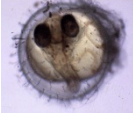



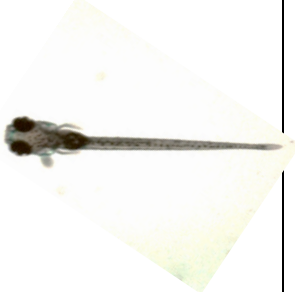
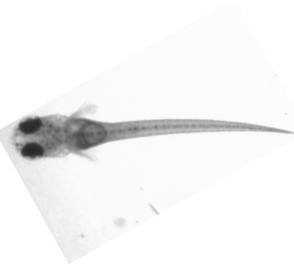


Figure 42 : Répartition des gènes codants entre le poisson zèbre, le poulet, la souris et l'Homme
Source : Howe et al. 2013

2.2.2. Développement embryonnaire

Les grandes étapes du développement embryonnaire des vertébrés sont conservées au cours de l'évolution : le clivage, la gastrulation, la neurulation et la suite de l'organogénèse (Tableau 30). Les stades de développement embryonnaire de poisson zèbre, de médaka et de xénope sont précisément caractérisés (Nieuwkoop et al. 1995; Iwamatsu 2004; Kimmel et al. 1995).

Tableau 30 : Comparaison du développement embryonnaire du poisson zèbre, du médaka et du xénope

Source : adapté de (Kimmel et al. 1995), *Xenbase*

	Poisson zèbre (28,5°C)	Médaka (26°C)	Xénope (23°C)
Clivage	 45 min	 1h05	 2h
Blastula	 2h15	 6h30	 4h
Gastrula	 5h15	 17h30	 9h
Neurula	 10h	 25h	 18h15
Stades intermédiaires d'organogénèse	 24h	 38h  J4	
Éclosion	 48h	 J8	 24h
Stades de développement post éclosion et non considérés par la directive 2010/63/UE	 J6	 J9	 50h  J4

La durée des stades embryonnaires (stades non pris en compte par la directive 2010/63/UE) diffère entre les trois organismes. Le xénope a le développement embryonnaire le plus rapide : au bout de 24h à 23°C, juste après la neurulation, il éclot. Par conséquent, il est l'organisme le moins longtemps protégé par son chorion (enveloppe). Il résorbe sa réserve énergétique (vitellus) 4 jours après la fécondation. À partir de ce stade de développement, le xénope doit alors être nourri et est considéré par la directive européenne 2010/63/UE. Il ne peut donc plus être utilisé dans un test alternatif à l'expérimentation animale. Le développement embryonnaire du poisson zèbre est un peu plus long. Il résorbe sa réserve vitelline au bout de 6 jours après la fécondation. Les premières étapes du développement embryonnaire sont très rapides et le stade *blastula* est atteint seulement 2h15 après la fécondation. Son éclosion a lieu à 48h à 28,5°C. Le médaka placé à 26°C a le développement embryonnaire le plus long avec la résorption de ses réserves vitellines 12 jours après la fécondation. Le stade *blastula* est atteint au bout de 6h30 après fécondation. Ces indications chronologiques varient en fonction de la température d'incubation des stades de développement embryonnaire.

Les réserves vitellines des œufs, composées de glucides, de protéines et de lipides, diffèrent entre les mammifères, les amphibiens et les poissons. Les mammifères possèdent des œufs oligolécithes pauvres en vitellus. Les amphibiens possèdent des œufs hétérolécithes ayant des particules vitellines présentes dans les blastomères. Les poissons ont des œufs télolécithes avec un vitellus très abondant, rassemblé en une masse cohérente qui occupe la majeure partie du volume de l'œuf. Le pôle animal est alors limité à une petite zone périphérique. La segmentation des œufs télolécithes s'effectue uniquement dans le pôle animal, le pôle vitellin restant indivis.

Les œufs de poisson zèbre ont un chorion à simple membrane. Après un transport aux stades embryonnaires, cette propriété peut les rendre fragiles à la manipulation notamment au moment du transfert d'un contenant à un autre. Les œufs de médaka ont, eux, un chorion à double membrane, qui les rend facile à manipuler. Ils ont également la particularité de posséder des gouttelettes lipidiques très énergétiques dans leur vitellus. Ces gouttelettes fusionnent et sont consommées après le vitellus. Le chorion du médaka possède de nombreux filaments permettant à l'œuf de s'attacher à différents supports. Enfin, les œufs de xénope ont un chorion à simple membrane mais entouré d'une gangue mucilagineuse (substance gélatineuse et collante, formée de protéoglycanes). Cette gangue maintient ensemble les œufs d'une même ponte. Elle peut être retirée par réaction chimique (Figure 43). Les œufs de

xénope « dégangués » sont de taille légèrement plus grande (1,2 mm de diamètre) que ceux de poisson zèbre et de médaka (1,0 mm de diamètre).

Une seule ponte de xénope ou de poisson zèbre est généralement suffisante pour obtenir plusieurs centaines d'œufs et ainsi réaliser plusieurs tests en parallèle. La ponte n'est donc représentative que des géniteurs de la ponte. Par contre, plusieurs pontes de médaka sont nécessaires pour obtenir les centaines d'œufs nécessaires à la réalisation de tests de tératogénicité. Cela permet d'avoir des œufs représentatifs d'une population réduite à un élevage. En laboratoire, les pontes de ces trois organismes peuvent être obtenues tout au long de l'année sans périodicité saisonnière comme cela est le cas d'autres espèces de poisson ou d'amphibien (Exbrayat 2014).

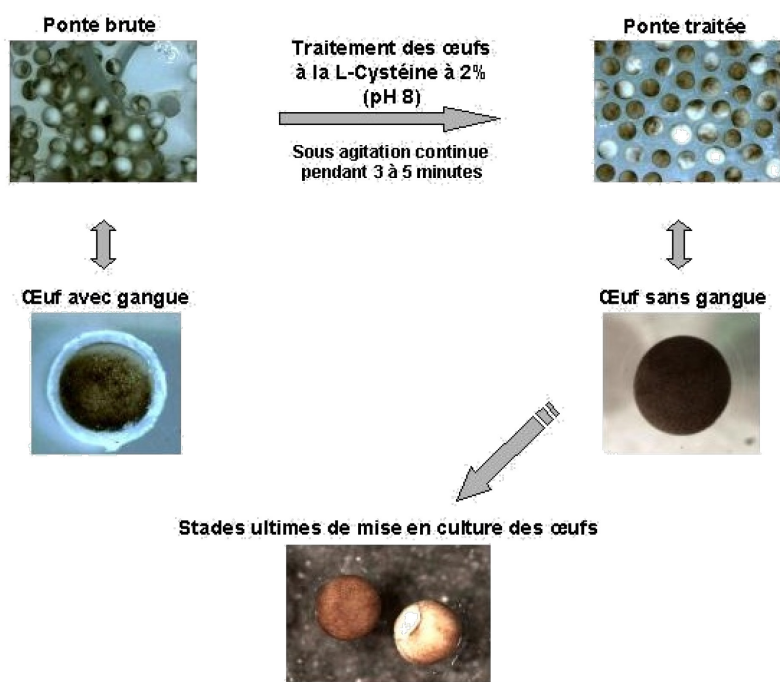


Figure 43 : Méthode de dégantage des œufs de xénope à l'aide d'une solution de L-Cystéine à 2%

En conformité avec la réglementation sur la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques (Dir. 2010/63/UE), les embryons de poisson et d'amphibien constituent des organismes *in vivo* éthiquement acceptables pour le développement de méthodes alternatives à l'évaluation de la sécurité des produits cosmétiques et de leurs constituants.

Les espèces retenues pour cette étude sont le *Danio rerio* (poisson zèbre), l'*Oryzias latipes* (médaka) et le *Xenopus laevis* (xénope). Ils présentent l'avantage d'avoir un développement embryonnaire externe. Ils sont également suffisamment transparents à la fin des tests pour que les malformations externes et la plupart de celles internes soient observables sous microscope. Leur développement embryonnaire est court (4 à 12 jours

suivant les espèces) et leurs stades de développement embryonnaire sont précisément caractérisés. Les différents types de malformations sont documentés (Bantle et al. 1991; Beekhuijzen et al. 2015). De plus, les embryons sont de petite taille (1 à 5 mm) permettant l'utilisation de plaques de culture multipuits et la miniaturisation des tests. Cette miniaturisation permet également de travailler avec de faibles volumes de solution d'essai. De plus, des élevages existent permettant ainsi un approvisionnement tout au long de l'année sans être soumis à des périodicités saisonnières.

2.3. Limites des tests de tératogénicité utilisant ces organismes

Chacun des trois organismes sélectionnés a déjà fait l'objet du développement d'un test plus ou moins avancé dans sa validation et sa reconnaissance : le test sur embryons de poisson zèbre (ZET), l'équivalent sur le poisson médaka et le test sur embryons de xénope (FETAX).

2.3.1. *Test Zebrafish Embryo Teratogenicity*

Le test Zebrafish Embryo Teratogenicity (ZET - test sur embryon de Poisson zèbre) est basé sur le test allemand DarT développé en substitution aux essais sur poissons adultes (Nagel & others 2002). Le principe est l'exposition d'œufs fécondés à différentes concentrations de la substance à tester. À différents moments du test, les embryons en développement sont observés, la létalité et les effets tératogènes sont alors répertoriés. De nombreux laboratoires l'utilisent avec différents protocoles. En effet, le stade de développement des embryons de poisson zèbre en début d'exposition et la durée de l'exposition (la durée moyenne est de 48h) peuvent diverger. Certains laboratoires ont recours à des œufs déchorionés, c'est-à-dire que l'enveloppe des œufs a été enlevée par traitement enzymatique (Ito et al. 2010). D'autres utilisent un système d'activation métabolique (fraction S9) pour faciliter l'identification de substances pro-tératogènes (Busquet et al. 2008). Enfin certaines équipes scientifiques observent les embryons à différents stades de développement ou encore attribuent des notes aux malformations en fonction de leur sévérité (Beekhuijzen et al. 2015). Ces différences de protocole ainsi que la souche de poisson zèbre utilisée ont des conséquences non négligeables sur les résultats. Par exemple, la thalidomide a été identifiée comme ayant des effets tératogènes chez le poisson zèbre uniquement lorsque l'exposition commence avant 2h post fertilisation chez des œufs déchorionés et en observant spécifiquement les nageoires et les otolithes (Ito et al. 2010).

Un consortium de 6 laboratoires pharmaceutiques s'est constitué en 2009 pour harmoniser le protocole et l'intégrer dans la ligne directrice ICH S5 destinée à l'évaluation de la reprotoxicité des produits pharmaceutiques (Beekhuijzen et al. 2015). Les résultats de cette harmonisation ne sont pas encore publiés. Par conséquent, la spécificité et la sensibilité de ce test ne sont pas encore connues. Cependant les différentes études intra- et inter-laboratoires ont montré une prédictivité satisfaisante des agents tératogènes de référence utilisés dans cette étude.

Une version du test ZET a été reprise dans le programme de recherche ChemScreen puis dans ToxCast. Les résultats devraient être également publiés prochainement.

2.3.2. Tests de tératogénicité utilisant le médaka

Comme pour le ZET, plusieurs versions du test utilisant le médaka existent. Ils divergent principalement par leur voie d'exposition. Il s'agit souvent d'une exposition directe de la substance à tester dans le milieu, ou alors d'une exposition indirecte par des sédiments contenant la substance à tester (Le Bihanic et al. 2015). D'autres laboratoires choisissent comme voie d'exposition la microinjection dans les embryons (Colman et al. 2005) ou l'injection de composés organiques volatiles dans le milieu (Kim et al. 2011). Les conditions expérimentales varient pour les stades de développement exposés, la température d'exposition, le cycle lumineux, la densité d'individus, la composition du milieu de culture, ... Ces différences modifient le développement notamment en termes de vitesse ou encore sur le moment de l'éclosion (Rosemore & Welsh 2012). À la différence du ZET, il ne semble pas y avoir de volonté d'établir un protocole harmonisé pour l'évaluation de la tératogénicité. Le médaka est plus souvent étudié pour répondre à des questions précises notamment d'embryogénèse.

Comme pour le poisson zèbre, le médaka est également un organisme de référence recommandé par l'OCDE pour l'évaluation de l'écotoxicité aquatique à long terme. Le médaka fait l'objet d'une nouvelle ligne directrice OCDE n° 240 : Étude étendue de toxicité pour la reproduction sur une génération chez médaka (MEOGRT) depuis le 28 juillet 2015 (OCDE 2015). Pour ce test, le médaka a été préféré au poisson zèbre grâce à l'identification de son sexe génétique (XY pour les mâles et XX pour les femelles) par analyse par la réaction en chaîne par polymérase (PCR) et grâce à ses caractères sexuels secondaires facilement observables (papille uro-génitale normalement développée chez les mâles sexuellement matures). Ce test *in vivo* permet l'évaluation des dangers et des risques pour l'environnement des substances reprotoxiques. Il intègre différents paramètres d'effet

pour identifier les produits chimiques suspectés d'être des perturbateurs endocriniens, ou d'autres types de substances ayant des effets toxiques sur le développement et la fertilité.

2.3.3. *Frog Embryo Teratogenesis Assay Xenopus*

Le Frog Embryo Teratogenesis Assay Xenopus (FETAX) a fait l'objet d'une norme américaine ASTM E 1439-98 en 1991. La dernière version de cette norme date de 2004. Le test FETAX consiste à exposer pendant 96h des œufs au stade *blastula* dans du milieu contenant la substance à tester. La létalité, le retard de croissance et les malformations sont répertoriés pendant le test. Même si le test existe en version normalisée, il en existe également différentes versions. Comme le ZET, le FETAX est parfois utilisé pour évaluer les sols contaminés (Prati et al. 2000).

Dans certaines études, une activation métabolique est intégrée au FETAX. Cette activation permet d'identifier la Thalidomide tératogène chez le xénope (Fort et al. 2003).

Une autre espèce est parfois utilisée : *Xenopus tropicalis*, qui a l'avantage d'être de taille plus petite que celle du *Xenopus laevis* (Hu et al. 2015).

Les œufs fécondés sont parfois obtenus par une fécondation naturelle ou *in vitro* (Boga Pekmezekmek et al. 2014; Prati et al. 2000). La méthode *in vitro* présente l'avantage de synchroniser le développement des œufs mais aussi de réaliser la fécondation à n'importe quel moment. Par contre, cela nécessite l'euthanasie d'un mâle pour récupérer du sperme.

Les résultats de malformation peuvent être interprétés de manière différente : l'indice tératogène (rapport de concentrations entraînant de la létalité et des malformations) de la norme ASTM E 1439-98 du FETAX, un « dorsal and axis index » (Kao & Elinson 1988), un « index of axis deficiency », un « index of fin deficiencies » ou encore par une note en fonction de sévérité des malformations (Hu et al. 2015). Par conséquent, les résultats d'un même test pourraient avoir des interprétations différentes en fonction de la méthode choisie pour ces résultats. Plusieurs tables de malformations des xénopes issus du FETAX ont fait l'objet de publications pour les deux espèces de xénope (Hu et al. 2015).

Une étude inter-laboratoire sur 12 références a démontré la reproductibilité du test FETAX. Néanmoins, l'activation métabolique semble nécessaire pour avoir une bonne prédictivité des agents tératogènes (Bantle et al. 1999).

Cependant une revue d'experts des institutions américaines NTP (National Toxicology Program) et ICCVAM (Interagency Coordinating Committee for the Validation of Alternative Methods) a conclu que le FETAX était insuffisamment validé et que par conséquent, il ne pouvait pas être utilisé à des fins réglementaires (NTP/NICEATM, 2000).

Le 28 juillet 2015, le xénope est également devenu, comme le poisson zèbre et le médaka, une espèce recommandée par l'OCDE pour les tests classiques de toxicité chronique avec la nouvelle ligne directrice OCDE n° 241 : Essai de croissance et de développement de larves d'amphibiens (LAGDA) (OCDE 2015b). Ce test *in vivo* permet l'évaluation des dangers et des risques pour l'environnement des substances reprotoxiques. Il intègre différents paramètres d'effet pour identifier les produits chimiques suspectés d'être des perturbateurs endocriniens, ou d'autres types de substances ayant des effets toxiques sur le développement et la fertilité. Cet essai (d'une durée de 16 semaines, en général) consiste à étudier la croissance et le développement des amphibiens depuis la fécondation jusqu'à la période juvénile précoce. Jusqu'à l'existence de cette nouvelle ligne directrice, l'OCDE ne recommandait le xénope que pour l'étude de la perturbation de l'axe hormonal thyroïdien avec sa ligne directrice OCDE n°231 : Essai de métamorphose des amphibiens (OCDE 2009b). Cette ligne directrice a recours à des stades de développement définis par la directive 2010/63/UE. C'est pourquoi un test alternatif à l'expérimentation animale à cette ligne directrice a été développé et est en cours d'intercalibration à l'OCDE : test utilisant des embryons de xénope transgéniques THbZIP. Pour plus de détails, voir le poster en annexe III.

Un des besoins de l'industrie cosmétique pour la réalisation du criblage de ses substances est le recours à un organisme entier vertébré aquatique. Le choix s'est porté sur trois organismes reconnus par l'OCDE : deux espèces de poisson (le poisson zèbre et le médaka) et une espèce d'amphibien (le xénope). Chacune de ces espèces fait l'objet d'un test d'évaluation de la tératogénicité à des degrés divers de standardisation. Les résultats publiés de ces tests ZET, sur médaka et FETAX montrent des disparités en termes de conditions expérimentales, de paramètres de mesure et d'interprétation des résultats. Ces tests ont été évalués sur un nombre limité de substances de référence pour la plupart différentes. Par ailleurs, leurs résultats sont critiqués pour manquer de prédictivité des effets tératogènes.

En conséquence, la présente étude évalue la fiabilité de ces tests à identifier les substances chimiques tératogènes, à l'aide d'un nombre significatif de substances de référence identiques.

Chapitre 2 : Évaluation des tests de tératogénicité utilisant des embryons de poissons et d'amphibien

Les organismes sélectionnés : les deux poissons (poisson zèbre et médaka) et l'amphibien (xénope) sont évalués avec 34 substances de référence. Les mêmes principes sont appliqués aux trois organismes. Plusieurs essais sont réalisés pour valider chaque test. Au stade précoce de développement *blastula*, les organismes sont exposés à un gradient de concentrations de la substance à tester dans leur milieu de culture jusqu'à la limite des stades de développement pris en compte par la directive 2010/63/UE. A la fin de l'essai, un gradient de létalité et de malformations doit être observé aux différentes concentrations. Comme la létalité, les malformations facilement identifiables sont recherchées et répertoriées. Un test statistique de régression permet d'extrapoler la concentration à laquelle 50 % des individus meurent (CL50) et la concentration à laquelle 50 % des individus vivants présentent une malformation (CE50). Le rapport entre ces deux valeurs détermine l'indice tératogène (IT), paramètre permettant l'évaluation de la tératogénicité. Le seuil de cet IT est fixé de sorte à obtenir 100 % de spécificité c'est-à-dire que 100 % des substances ayant des effets tératogènes dans le test sont effectivement des agents tératogènes chez l'Homme ou les rongeurs. La valeur de ce seuil dépend des IT des substances de référence négatives reconnues comme n'ayant pas d'effets tératogènes chez l'Homme ou les rongeurs. Le seuil est fixé au-dessus de la valeur la plus haute d'IT des substances de référence négative. Par conséquent, ce seuil dépend directement de la liste de substances de référence de validation d'un test. Une fois, la spécificité du test fixée à 100 %, la sensibilité (capacité à détecter les substances de référence positives) en découle pour ces conditions. L'organisme obtenant les meilleures performances en termes de robustesse et de concordance est retenu.

1. Méthodes

Le matériel et méthodes est décrit en Annexe IV.

1.1. Hydrosolubilité des substances de référence

Comme précisé précédemment, les substances de référence sont choisies hydrosolubles. Avant le lancement des premiers essais et en l'absence des organismes, la solubilité de ces références dans les milieux de culture des poissons et du xénope a été appréciée par une mesure de Carbone Organique Total (COT) à l'aide d'un analyseur de carbone en phase liquide (Figure 44). La technique utilisée consiste à ajouter du persulfate (oxydant fort) à l'échantillon filtré à 0,45µm (pour ne conserver que la partie solubilisée de la solution) puis de le chauffer à 100°C pour former du dioxyde de carbone (CO₂). Le taux de CO₂ ainsi formé est ensuite mesuré par analyse infrarouge non dispersive. Cette mesure de quantité de carbone permet d'apprécier la mise en solution des substances dans nos conditions opératoires. Il s'agit de comparer le pourcentage théorique attendu de la substance au pourcentage de carbone mesuré. Même si les milieux d'essai ne possèdent pas de carbone organique mais uniquement des sels minéraux, par principe, la quantité de carbone des milieux d'essai seuls est mesurée et soustraite si nécessaire aux différentes valeurs pour ne prendre en compte que le carbone des substances. La mesure du COT n'indique pas sous quelle forme le carbone organique est présent, c'est-à-dire qu'elle ne permet pas par exemple d'indiquer si la substance a été altérée par hydrolyse.

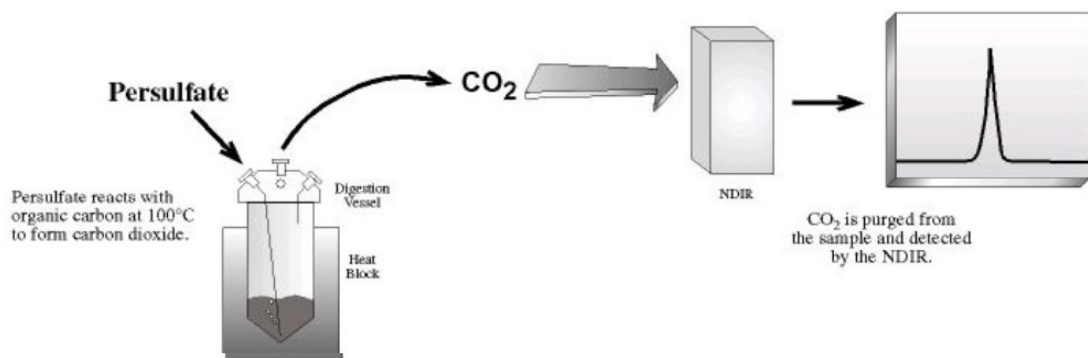


Figure 44 : Principe de la mesure du carbone organique total pour réaction avec du persulfate

Les mesures réalisées sont présentées dans le Tableau 31 ci-après. Elles ont indiqué qu'en moyenne 90,2 % de la substance à tester se trouvait dans le milieu d'essai des tests sur poissons et en moyenne à 88,2 % dans le milieu d'essai du test sur le xénope. Ceci est considéré comme acceptable pour nos conditions expérimentales pour permettre la biodisponibilité de nos substances de référence aux organismes aquatiques.

Tableau 31 : Résultats de l'analyse du COT liquide des substances de référence dans les milieux d'essai pour les tests utilisant les embryons de médaka (milieu médaka) et de xénope (milieu FETAX)

PRODUITS	Pureté (%)	Formule Brute	% Carbone Théorique	% C théorique en fonction de la pureté	Milieu MEDAKA		Milieu FETAX	
					Mesure COT en (mg de C) /L après filtration à 0,45µm	% de la substance solubilisée	Mesure COT en (mg de C) /L après filtration à 0,45µm	% de la substance solubilisée
6 Aminonicotinamide	99	C ₆ H ₇ ON ₃	52,55	52,03	43,1	82,8	44,5	85,5
Acide Acétohydroxamique	100	C ₂ H ₅ NO ₂	32	32	30,58	95,6	28	87,5
Acide acétylsalicylique	99,5	C ₉ H ₈ O ₄	60	59,70	53,44	89,5	49,85	83,5
Amantadine	100	C ₁₀ H ₁₇ N HCl	64,17	64,17	54,95	85,6	55,67	86,8
Chlorure de Cadmium	98	CdCl ₂	0	0	0	-	0	-
Captopril	99	C ₉ H ₁₅ NO ₃ S	49,77	49,27	47,62	96,6	46,01	93,4
Cyclophosphamide	100	C ₇ H ₁₅ Cl ₃ N ₂ O ₂ P H ₂ O	30,22	30,22	24,7	81,7	28,9	95,6
Dichlorure d'Ethambutol	100	C ₁₀ H ₂₄ N ₂ O ₂ 2HCl	43,48	43,48	38,9	89,5	39,55	91,0
Ethylène thiourée	98	C ₃ H ₆ N ₂ S	35,29	34,58	32,86	95,0	30,92	89,4
Fluorouracil	99	C ₄ H ₃ N ₂ O ₂ F	36,92	36,55	34,4	94,1	32	87,5
Hydroxyurée	[100]	CH ₄ N ₂ O ₂	15,79	15,79	14,3	90,6	14,49	91,8
Isoniazid	99	C ₆ H ₇ ON ₃	45,57	45,11	44,2	98,0	44,9	99,5
Chlorure de Lithium	100	LiCl	0	0	0	-	0	-
Métoprolol	100	C ₃₀ H ₅₀ N ₂ O ₆ C ₄ H ₆ O ₆	59,65	59,65	51,01	85,5	49,7	83,3
Chlorhydrate de Bupivacaine	99	C ₁₈ H ₂₈ N ₂ O HCl	66,67	66,00	63,17	95,7	58,02	87,9
Caféine	100	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	49,48	49,48	40,16	81,2	44,15	89,2
Cefuroxime sodium	100	C ₁₆ H ₁₅ N ₄ NaO ₈ S	43,24	43,24	41,23	95,4	37,8	87,4
Colchicine	95	C ₂₂ H ₂₅ NO ₆	66,17	62,86	57,69	91,8	53,77	85,5
Hydrochlorure de Diphenhydramine	99	C ₁₇ H ₂₁ NO HCl	70,10	69,40	58,2	83,9	56,7	81,7
Doxylamine	100	C ₁₇ H ₂₂ N ₂ O C ₄ H ₆ O ₄	64,95	64,95	63,72	98,1	58,28	89,7
Dichlorhydrate d'Hydroxyzine	100	C ₂₁ H ₂₇ ClN ₂ O ₂ 2HCl	56,5	56,50	46,47	82,2	47,14	83,4
Levamisol	99	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ S HCl	55	54,45	51,07	93,8	49,95	91,7
Métronidazole	100	C ₆ H ₉ N ₃ O ₃	42,11	42,11	41,4	98,3	40,64	96,5
Pyrilamine	100	C ₁₇ H ₂₃ N ₃ O C ₄ H ₄ O ₄	62,84	62,84	56,96	90,6	59,94	95,4
Saccharine	99	C ₇ H ₄ NO ₃ SNa	41,38	40,97	40,2	98,1	33,65	82,1
Uréthane	99	C ₃ H ₇ NO ₂	40,45	40,05	36,2	90,4	35,6	88,9
Amaranth	100	C ₂₀ H ₁₁ N ₂ Na ₃ O ₁₀ S ₃	40,13	40,13	32,8	81,7	32,13	80,1
Acide Ascorbique	99	C ₆ H ₈ O ₆	40,91	40,50	35,9	88,6	36	88,9
Acide azélaïque	98	C ₉ H ₁₆ O ₄	57,45	56,30	49,58	88,1	52,43	93,1
Cefotaxime sodique	100	C ₁₆ H ₁₆ N ₃ NaO ₇ S ₂	42,95	42,95	35,93	83,7	36,98	86,1
Ceftriaxone	100	C ₁₈ H ₁₆ N ₈ O ₇ S ₃ Na ₂	36,36	36,36	27,2	74,7	30,03	82,6
Cromolyn disodique	95	C ₂₃ H ₁₄ O ₁₁ Na ₂	54,33	51,61	50,339	97,5	42,69	82,71
Cyclamate de Sodium	100	C ₆ H ₁₂ O ₃ NNa	43,11	43,11	37,70	87,4	33,88	78,6
Lactitol monohydrate	99	C ₁₂ H ₂₄ O ₁₁ , H ₂ O	39,78	39,38	39,032	99,1	38,04	96,6

1.2. Exposition des embryons

Dès réception au laboratoire, les organismes sont observés. Les œufs vivants au stade *blastula* sont exposés de manière continue à un gradient de concentrations de la substance à tester dans leur milieu de culture. Deux lots de 10 œufs sont placés chacun dans 10 mL de solution dans des plaques de culture de 6 puits. La solution est renouvelée au cours de l'essai pour maintenir les concentrations de la substance mais aussi le taux d'oxygène dissous du milieu et compenser l'acidification du milieu. Ceci permet d'obtenir la fenêtre d'exposition la plus grande possible pour couvrir l'ensemble de l'organogénèse et ainsi maximiser les conditions d'obtention de malformations.

Les mêmes principes sont appliqués à chacun des tests, mais chaque matériel et protocole est adapté à chaque espèce (Tableau 32).

Tableau 32 : Adaptations du protocole à chaque organisme

	Poisson zèbre	Médaka	Xénope
Durée de l'essai	6 jours	9 jours	4 jours
Milieu de culture	1 g/L NaCl, 30 mg/L KCl, 40 mg/L CaCl ₂ 2H ₂ O, 40 mg/L MgSO ₄ , 7H ₂ O, 4 mg bleu de méthylène, Eau osmosée qsp 1 L		625 mg NaCl, 96 mg NaHCO ₃ , 30 mg KCl, 15 mg CaCl ₂ , 60 mg CaSO ₄ 2H ₂ O, 75 mg MgSO ₄ Eau osmosée qsp 1 L
Nombre de renouvellements de milieu	2	3	1
Température	26°C	28°C	24°C
Cycle lumineux	14h de lumière / 10 h d'obscurité		Obscurité totale

L'évaluation de la tératogénicité est réalisée en deux étapes. Dans une première étape, les embryons sont exposés à une gamme de concentration logarithmique de 1, 10, 100 et 1000 mg.L⁻¹ de la substance à tester. Ceci permet de déterminer les classes de concentration à intégrer dans l'essai « définitif » pour cibler les effets létaux et les malformations. Après ce premier essai, un second essai est réalisé avec un minimum de 5 concentrations pour idéalement obtenir une absence d'effet léthal ou malformatif à la concentration la plus basse, une concentration avec 100 % d'effet tératogène et une dernière avec 100 % d'effet léthal. La concentration maximale des tests d'écotoxicité est 100 mg/L. Lors de l'évaluation du risque pour l'Homme, un facteur 10 ou 100 est classiquement appliqué. Dans nos tests, la concentration maximale testée est 1 g.L⁻¹. Si des effets tératogènes sont observés autour de cette valeur, les concentrations sont augmentées dans la limite de 4 g/L.

1.3. Observation de la létalité et des malformations des embryons

A la fin de l'essai, les organismes sont observés grâce à un stéréomicroscope relié à un logiciel d'acquisition et d'analyse d'images. Si la gamme de concentrations a été choisie de manière adéquate, un gradient de létalité est observé, idéalement avec une concentration basse avec 0 % de létalité et la concentration la plus haute avec 100 % de létalité. Le nombre de morts observés pour chaque concentration permet de réaliser un calcul statistique de régression permettant d'extrapoler une valeur de concentration à laquelle précisément 50 % des individus exposés à une substance sont morts : la CL50.

Chez les individus vivants, sont d'abord recherchées des malformations fonctionnelles telles qu'une nage non coordonnée, une hyperventilation, une modification du rythme cardiaque ou une immobilité anormale. Un léger stimulus mécanique avec une pipette pasteur est réalisé pour induire un comportement de fuite. Lorsqu'une anomalie du comportement est observée, elle est notée « AC » dans la feuille de suivi. Un exemple de feuilles de suivi pour le test de tératogénicité utilisant le médaka est présenté dans la Figure 45. Le même type de feuilles a été utilisé pour le suivi des embryons de poisson zèbre et de xénope.

TEST DE TERATOGENICITE SUR CEUFS DE MEDAKA (<i>Oryzias latipes</i>)																						
Test définitif																						
Nature du composé :		Colchicine		pH																		
Code :				Osmolarité										Solubilité								
Lot :				Photopériode		14h 10h								Totale		Partielle		Non sol.				
% M A :				Température		26°C								X								
Solution mère (en mg/L) :		100		Taux d'oxygène dissout		≥ 60 %																
10 mL de milieu par puits avec un renouvellement 3 fois par semaine																						
Concentrations mg/l	Date	J0			J4			J7			J9							RESULTATS				
		09/04/2004			13/04/2004			16/04/2004			18/04/2004							mort	Anomalie	eclor	% Mortalité	% Anomalie
		CEufs	mort	Anom.	mort	Anom.	eclor	mort	AC	MT	O	Y	D	DA	MM	MS	eclor					
Témoin	puits 1	10	0		2		4	0									8	2	0	18	10	0
	puits 2	10	0		0		3	0									10					
1,0	puits 1	10	1		0		3	0			2						9	1	3	19	5	16
	puits 2	10	0		0		0		1								10					
5,0	puits 3	10	0		0			1	4								9	1	10	19	5	53
	puits 4	10	0		0		4	0	3	1				1	1		10					
7,5	puits 5	10	0		0			1	1	2							7	2	6	16	10	33
	puits 6	10	0		0		7	1	3								9					
10,0	puits 1	10	0		0		1	4	2									7	5	0	35	38
	puits 2	10	0		0		5	3	2	1												
12,5	puits 3	10	0		0		4	5	2						1			11	5	0	55	56
	puits 4	10	1		0		4	5	2													
15,0	puits 5	10	0		1		3	9										18	2	0	90	100
	puits 6	10	1		0			7		2												
17,5	puits 1	10	0		0		2	9		1								18	2	0	90	100
	puits 2	10	0	1	0	1		9		1												
20	puits 3	10	0		0			10										20	0	0	100	0
	puits 4	10	0		0		4	10														

AC : Anomalie du Comportement / MT : Modification de la taille / O : Œdème / Y : Yeux / D : Dépigmentation / DA : Déformation Axiale / MM : Malformations multiples / MS : Malformations Sévères

Figure 45 : Exemple de feuilles de suivi d'un test de tératogénicité utilisant les embryons de médaka

Les malformations physiques majeures sont ensuite recherchées : anomalies du squelette (DA : Déformation Axiale), des yeux (Y), de la tête, de la pigmentation (D), la présence d'œdèmes (O) et la modification de la taille (MT) de l'organisme (Figure 46 et Figure 47). Pour la mesure de la taille, les alevins vésiculés et les têtards sont anesthésiés avec du MS222, ceux d'un même puits sont positionnés les uns par rapport aux autres pour acquérir une photo globale du puits ainsi que pour faciliter les mesures individuelles. La taille de chacun est mesurée par analyse d'image. Lorsque la taille mesurée par analyse d'image dépasse la valeur moyenne de la taille des témoins historiques de plus de 2 écart-types, la modification de la taille est alors considérée comme significative. Comme l'objectif de ce test de criblage est d'identifier une substance tératogène quel que soit le type de malformation induite, si un individu vivant présente une ou plusieurs malformations, il n'est répertorié qu'une seule fois. Dans le cas de deux malformations observées, la malformation la plus sévère est notée. Un individu peut présenter plus de deux malformations, il est alors identifié et noté « MM » pour Malformations Multiples. Si les différentes parties de l'organisme sont difficilement distinguables et pourtant un battement cardiaque existe, l'individu est alors identifié et noté « MS » pour Malformations Sévères. Dans ces derniers cas, l'étape de neurulation a généralement eu lieu mais l'organogénèse semble avoir été fortement perturbée.

Anomalies observables au stade œuf (J5) :



Anomalies observables au stade alevin vésiculé :

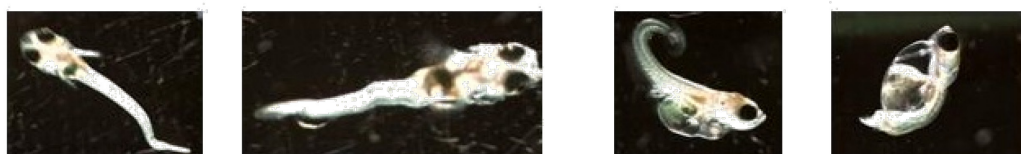


Figure 46 : Exemples de malformations observables chez les embryons de médaka

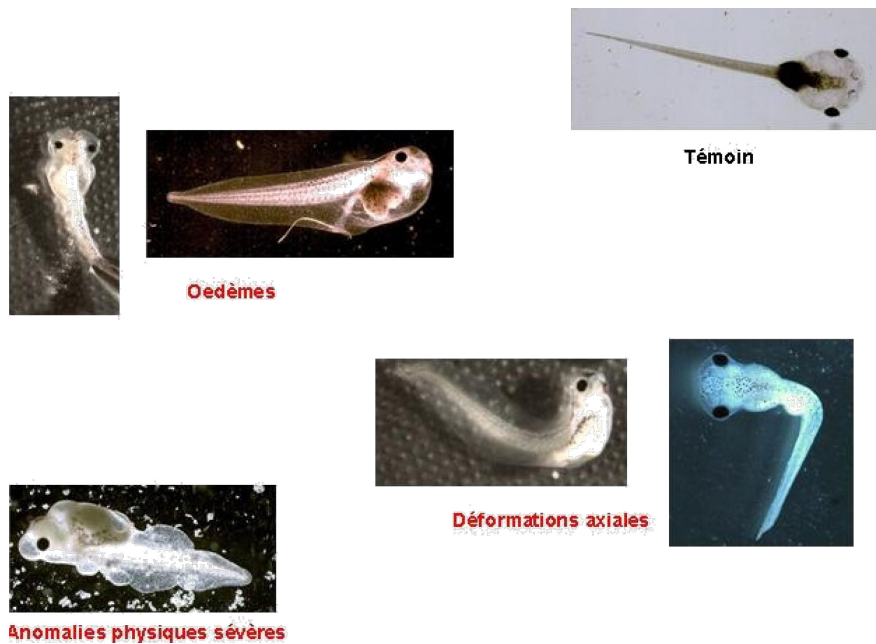


Figure 47 : Exemples de malformations observables chez les embryons de xénope

Si la gamme de concentrations a été choisie de manière adéquate, un gradient de malformations (fonctionnelle et / ou physique) est observé. Idéalement, pour une concentration basse, aucune malformation ne doit être observée et pour une concentration haute, tous les individus vivants doivent avoir au moins une malformation. Des concentrations intermédiaires avec une partie des individus possédant des malformations sont également requises. Le nombre d'individus malformés par concentration permet de réaliser un calcul statistique de régression permettant d'extrapoler une valeur de concentration à laquelle précisément 50 % des individus vivants exposés à une substance présentent des malformations : la CE50.

1.4. Calculs de la CL50, de la CE50 et de l'Indice Tératogène de chaque substance de référence

À partir des observations faites sur la gamme de concentration, la CL50 et la CE50 sont calculées avec le test statistique de régression « EPA Probit Analysis Program used for calculating LC/EC values version 1.5 ». Si les conditions ne sont pas remplies pour réaliser le test Probit (notamment absence de réponse à une concentration et réponse totale à une autre ainsi que des réponses intermédiaires entre les deux), un autre test statistique de régression « Trimmed Spearman Karber version 1.5 » (TSK) est appliqué. Les valeurs de CL50 et de CE50 sont obtenues avec un intervalle de confiance de 95 %.

L'indice tératogène (IT) est ensuite calculé pour chaque substance testée. Il est important que les valeurs de la CL50 et de la CE50 proviennent d'un même essai. En effet, l'IT, rapport entre les valeurs de la CL50 et de la CE50, permet de s'affranchir de la variabilité interindividuelle d'une ponte à une autre et d'avoir une meilleure répétabilité des IT. L'effet tératogène de la substance testée est d'autant plus important que l'IT est élevé. À une concentration, une substance peut avoir des effets tératogènes sans avoir d'effet léthal : l'IT est alors très supérieur à 1. Lorsque des effets tératogènes ne sont observés qu'en présence d'effet léthal, l'IT obtenu peut être inférieur à 1 (Figure 48). Lorsqu'aucun effet tératogène n'est observé, la CE50 ne peut pas être calculée, l'IT est alors indiqué comme « Non Applicable » (NA). La même règle est appliquée lorsqu'aucun effet léthal ou tératogène n'est observé aux concentrations testées.

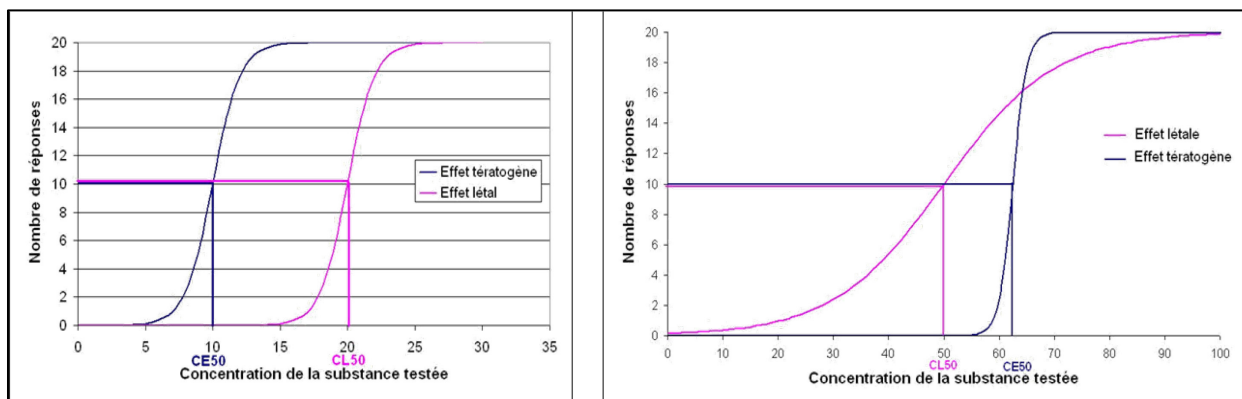


Figure 48 : Exemples de relation dose / effet pour la létalité et la tératogénicité

1.5. Conditions de validité d'un essai

Plusieurs critères doivent être remplis pour qu'un essai soit considéré comme valide. Tout d'abord, comme beaucoup de tests d'écotoxicité, l'essai est valide lorsque moins de 20% d'effet léthal ou tératogène est observé chez le groupe témoin. Le second critère de validité est que l'essai à lui seul permette de déterminer un IT.

L'essai valide doit ensuite être confirmé avec un second essai. L'essai est confirmé lorsque les valeurs de CL50 et de CE50 ou l'IT sont comparables à ceux du nouvel essai. L'IT le plus défavorable est pris en compte pour déterminer la performance du test. Si les valeurs de CL50 et de CE50 ainsi que l'IT diffèrent de l'essai précédent, l'essai est valide mais non confirmé. Un essai complémentaire est alors nécessaire.

1.6. Test de concordance de chaque test de tératogénicité

La performance du test est évaluée selon la méthode Kappa de Cohen (Viera et al. 2005; Carletta 1996). Il s'agit d'un outil statistique mesurant l'accord entre plusieurs observateurs selon des catégories qualitatives.

Pour cela, les résultats obtenus dans les tests de tératogénicité sur les organismes sélectionnés sont confrontés à ceux attendus par rapport aux différentes catégories de substances de référence positive ou négative (classification selon des données *in vivo* issues de différentes sources d'information). Des concordances sont réalisées à l'aide de différents paramètres : la sensibilité, la spécificité, la concordance observée, la concordance attendue et la valeur κ (Tableau 33).

La sensibilité est la probabilité pour qu'une substance de référence classée tératogène soit prédite tératogène par le test considéré. Elle correspond à la proportion de résultats positifs correctement prédits (« Vrais Positifs » = VP) en fonction des résultats faussement négatifs (« Faux Négatifs » = FN) par le test considéré : $VP / (VP + FN)$.

La spécificité est la probabilité pour qu'un produit classé non tératogène soit prédit non tératogène (« Vrais Négatifs » = VN) en fonction des résultats faussement positifs (« Faux Positifs » = FP) par le test considéré. Elle équivaut donc à la proportion de résultats négatifs correctement prédits par le test : $VN / (VN + FP)$.

La concordance observée (Co) est la part totale de résultats correctement prédits par le test. Elle exprime la conformité de prédiction : $(VP + VN) / T$. La concordance attendue (Ca) prend également en compte les résultats non prédits correctement : $[((VP+FP)*(VP+FN))+((FP+VN)*(FN+VN))] / T$.

L'indice Kappa (κ) donne une indication de la performance du test : $(Co - Ca) / (1 - Ca)$. Si $\kappa < 0$: désaccord, entre 0,0 et 0,20 : accord très faible, entre 0,21 et 0,40 : accord faible, entre 0,41 et 0,60 : accord modéré, entre 0,61 et 0,80 : accord fort ; entre 0,81 et 1,00 : accord presque parfait.

La valeur prédictive négative (VPN) est la proportion des substances de référence classées non tératogènes correctement prédites parmi l'ensemble des prédictions négatives : $VPN = VN / (VN + FN)$.

La valeur prédictive positive (VPP) est la proportion des substances de référence classées tératogènes correctement prédites parmi l'ensemble des prédictions positives : $VPP = VP / (VP + FP)$.

La prédictivité globale est la moyenne de la valeur prédictive négative et de la valeur prédictive positive (VPN + VPP) / 2.

Tableau 33 : Tableau de concordance entre les résultats attendus et ceux observés

		Classification de référence			Légende :
		Tératogène	Non tératogène	Total	
Résultats du test de tératogénicité	Effet tératogène	VP	FP	VP + FP	VP : Vrai Positif VN : Vrai Négatif FP : Faux Positif FN : Faux Négatif T : effectif total
	Absence d'effet tératogène	FN	VN	FN + VN	
	Total	VP + FN	FP + VN	T	

Remarque : Dans nos conditions et selon les mêmes principes d'indice de performance, la sensibilité du test est considérée comme très faible entre 0 % et 20 %, faible entre 21 % et 40 %, modérée entre 41 % et 60 %, satisfaisante entre 61 % et 80 % et très satisfaisante au-delà de 81 %.

Pour répondre à l'objectif de criblage des effets tératogènes, le seuil de l'IT pour un test est fixé de sorte qu'aucune substance de référence négative ne soit faussement identifiée comme ayant des effets tératogènes. Dans ces conditions, la spécificité de chaque test est donc fixée à 100 % et seules les substances ayant des effets tératogènes sont identifiées. Si une valeur de l'IT est supérieure au seuil spécifique défini, cela conduit à suspecter une substance d'être un agent tératogène chez les mammifères. Si la valeur de l'IT est en-dessous de ce seuil, aucune interprétation sur les effets tératogènes de la substance ne peut être réalisée à moins que le test ait une sensibilité de 100 %. Uniquement dans ce cas, la substance n'est pas considérée comme un agent tératogène dans ce test de tératogénicité sur poisson ou amphibien.

2. Analyse séparée des tests

L'ensemble des valeurs calculées de CL50, de CE50 et des ITs sont regroupées dans le Tableau 34 pour le test utilisant les embryons de poisson zèbre, dans le Tableau 36 pour le test utilisant les embryons de médaka et dans le Tableau 38 pour le test utilisant les embryons de xénope.

2.1. Test utilisant les embryons de poisson zèbre

L'approvisionnement en œufs de poisson zèbre n'a pas été égal aussi bien en terme de fréquence et de qualité de pontes que de quantités d'œufs par ponte. Au cours de l'étude, l'élevage de poisson zèbre de l'INERIS a perdu ses géniteurs et ne pouvait plus nous fournir en œufs. De plus, le transport des œufs de poisson zèbre entre l'INERIS et Aulnay-sous-bois (45 km) entraînait en moyenne 30 % de mortalité à la réception des pontes. Les œufs de poisson zèbre au stade *blastula* ayant subi ce transport ont été fragiles à la manipulation ce qui peut biaiser les résultats de l'essai.

Malgré cet aléa, 48 essais sur embryons de poisson zèbre ont tout de même pu être réalisés. Néanmoins, 6 substances de référence n'ont pas pu être testées. De plus, la moitié des substances, soit 17 références, n'a pu être testée qu'une seule fois. Par conséquent, les valeurs de CL50 ou de CE50 de ces substances n'ont pas pu être calculées ou confirmées. Ces valeurs sont signalées par des cellules grisées dans le tableau de résultats (Tableau 34). Pour 10 substances, la concentration la plus haute testée avait moins de 50 % de létalité chez les organismes. Dans ces conditions, aucun test statistique ne peut être appliqué pour calculer la CL50. Par conséquent, 10 valeurs de CL50 ont seulement été estimées supérieures à la concentration maximale testée. De même, 2 valeurs de CE50 ont seulement été estimées inférieures à la concentration la plus basse testée. Dans les deux cas, ceci implique que la valeur de l'IT est au moins supérieure à celle indiquée. Seuls les ITs de 3 substances ont pu être validés et confirmés : pour la colchicine, l'hydroxyzine et l'amarante.

Aucune malformation n'a été observée chez les embryons de poisson zèbre exposés aux 7 références négatives testées, ce qui correspond à des concentrations sans effet reprotoxique observable (NOAEC) de 1 000 mg/L. Le seuil de l'IT peut être fixé à 1,0 pour obtenir 100 % de spécificité. Dans ces conditions, aucune référence négative n'est faussement prédite comme ayant des effets tératogènes, en d'autres termes le test ne présente pas de « Faux positifs ». Ceci implique que si la valeur de l'IT du test utilisant le poisson zèbre est

supérieure à 1,0, la substance peut être considérée comme ayant des effets tératogènes chez le poisson zèbre et comme ayant des effets tératogènes potentiels chez les mammifères. Si la valeur de l'IT est inférieure à 1,0, ce résultat ne constitue par une alerte de tératogénicité pour cette substance dans ces conditions. Ces résultats ne présument en rien de l'innocuité de cette substance pour les mammifères.

Tableau 34 : Résultats du test utilisant les embryons de poisson zèbre

Chemical name	Nombre total de tests	Nombre total de tests valides	CL 50 mg / L	CL 50 mg / L intervalle de confiance à 95%	Test statistique	CE 50 mg / L	CE 50 mg / L intervalle de confiance à 95%	Test statistique	IT CL50 / CE50
6-Aminonicotinamide	2	0	>2000	NA	NA	290,20	(264,9-316,3)	Probit	>6,89
Acetohydroxamic acid	1	0	>2000	NA	NA	<500	NA	NA	>4
Acetylsalicylic acid	1	1	21,30	(17,1-26,9)	Probit	45,80	(28,7-118,2)	Probit	0,47
Amantadine	5	1	1240,00	(1020,4-1403,0)	Probit	504,21	NR	TSK	2,46
Cadmium chloride,	1	0	80,60	(65,3-109,5)	Probit	<3,1	NA	NA	>26
Captopril	1	1	>1000	NA	NA	>1000	NA	NA	NA
Cyclophosphamide C	3	1	784,20	(742,64-828,1)	TSK	198,00	NR	TSK	8,51
Ethambutol	1	1	>1000	NA	NA	>1000	NA	NA	NA
Ethylenethiourea	2	0	>10	NA	NA	3,15	(2,32-4,51)	Probit	>3,17
Fluorouracil	3	0	>2000	NA	NA	604,00	(541,4-659,6)	Probit	>3,31
Hydroxyurea	1	0	>2000	NA	NA	687,10	(626,2-752,7)	Probit	>2,91
Isoniazid	1	0	>2000	NA	NA	71,16	(40,87-104,89)	Probit	>28,11
Lithium chloride	2	0	>2000	NA	NA	666,08	(499,11-810,64)	Probit	>3,00
Metoprolol	0	0							
bupivacaine hydrochloride	1	1	258,60	(187,7-367,1)	Probit	227,90	(190,4-296,5)	Probit	1,13
Caffeine	3	0	>250	NA	NA	32,30	(30,1-34,6)	Probit	>7,73
cefuroxime sodium	0	0							
Colchicine	3	3	36,00	(30,3-42,9)	TSK	24,40	(19,6-30,29)	TSK	1,48
Diphenhydramine HCl	0	0							
Doxylamine	0	0							
Hydroxyzine	4	1	34,87	(26,5-44,3)	Probit	11,50	(6,5-16,8)	Probit	2,97
Levamisol	1	1	1003,00	NR	Probit	382,60	(298,8-578,4)	Probit	2,62
Metronidazole	1	0	>2000	NA	NA	886,82	(775,33-983,15)	Probit	>2,26
Pyrilamine	0	0							
Saccharin	1	1	>1000	NA	NA	>1000	NA	NA	NA
Urethane	2	0	>2000	NA	NA	956,22	(676,13-1420,43)	Probit	>25,54
Amaranth	2	1	>1000	NA	NA	>1000	NA	NA	NA
Ascorbic acid	0	0							
Azelaic acid	1	0	100-1000	NA	NA	100-1000	NA	NA	NA
Cefotaxime sodique	1	0	100-1000	NA	NA	100-1000	NA	NA	NA
Ceftriaxone	1	1	744,00	(429,6-1289,2)	TSK	-	NA	NA	NA
Cromolyn disodique	1	1	>1000	NA	NA	>1000	NA	NA	NA
Cyclamate sodium	1	1	>1000	NA	NA	>1000	NA	NA	NA
Lactitol monohydrate	1	1	>1000	NA	NA	>1000	NA	NA	NA

Les valeurs grisées de la colonne CL50 correspondent à la concentration maximale testée en dessous de la CL50 ou à une gamme de concentrations encadrant la CL50. Les valeurs grisées de la colonne CE50 correspondent à la concentration minimale testée au-dessus de la CE50 ou à une gamme de concentrations encadrant la CE50. NR : « Not relevant », les intervalles de confiance n'ont pas pu être établis ou sont non pertinents. Les indices tératogènes grisés indiquent une valeur minimale et qu'un test complémentaire est nécessaire pour déterminer sa valeur exacte, ou que la substance n'a été testée qu'une seule fois. NA : « Non Applicable ». TSK : Trimmed Spearman-Kärber.

Pour l'analyse de la performance d'un test sur un organisme, trois conditions sont analysées. La 1^{ère} condition d'analyse de performance est celle idéale, basée sur les références

les plus fiables. Elle ne prend en compte que les résultats valides et confirmés issus des références positives avec une mention de danger de reprotoxicité réglementaire ainsi que ceux issus des références négatives ne possédant pas d'alerte de tératogénicité dans nos sources d'information. La 2^{ème} condition d'analyse de performance ajoute les résultats des références positives suspectées d'avoir des effets tératogènes de la 2^{ème} catégorie de références. Cette condition permet d'apprécier les capacités du test à détecter des agents tératogènes ayant uniquement des alertes de tératogénicité. Dans le cas particulier du test utilisant le poisson zèbre, une 3^{ème} condition d'analyse est appliquée pour prendre en compte ses résultats dont la majorité ne sont pas valides pour discuter un minimum les capacités globales de ce test (Tableau 35).

Tableau 35 : Évaluation de la concordance du test utilisant les embryons de poisson zèbre selon différentes conditions d'analyse de performance

	1 ^{ère} condition	2 ^{ème} condition	3 ^{ème} condition
Nombre de substances de référence	1	3	28
Valeur du seuil de l'IT	1,0		
Nombre de « Vrais Positifs »	0	2	17
Nombre de « Faux Négatifs »	0	0	4
Nombre de « Vrais Négatifs »	1	1	7
Nombre de « Faux Positifs »	0		
Spécificité	100 %		
Sensibilité	0,0 %	100 %	80,0 %
Concordance observée	NC	1,00	0,85
Concordance attendue	NC	0,55	0,55
Valeur κ	NC	1	0,68
Accord de concordance du test	NA	Parfait	Fort

1^{ère} condition : résultats valides et confirmés de la 1^{ère} et de la 3^{ème} catégories de références.

2^{ème} condition : résultats valides et confirmés de toutes les catégories de références.

3^{ème} condition : ensemble des résultats intégrant ceux non valides.

Pour la 1^{ère} condition d'analyse, seulement l'IT de l'amarante est exploitable et le test de concordance n'est pas applicable. Pour la 2^{ème} condition d'analyse, les ITs de la colchicine et de l'hydroxyzine peuvent être aussi intégrés. Le nombre de résultats n'est pas suffisant pour qu'une analyse de ces deux premières conditions d'analyse soit réalisée.

Pour la 3^{ème} condition d'analyse, les ITs de 28 substances de référence ont été estimés ou calculés. Dans ces conditions, le seuil de l'IT peut être fixé à 1,0. Or 17 références positives sur les 21 testées dépassent ce seuil. Par conséquent, le test présente donc 17 VP et 4 FN. Ceci entraîne une sensibilité satisfaisante de 80,0 % avec une bonne concordance observée de 0,85. Dans ces conditions, l'indice Kappa (κ) donne un accord fort au test

utilisant les embryons de poisson zèbre. Ces performances sont celles attendues sur des résultats valides et confirmés, ce qui n'est pas le cas ici. Par conséquent, ces performances ne sont pas exploitables.

Dans nos conditions, un problème d'approvisionnement en œufs de poisson zèbre n'a pas permis de tester les 34 substances de référence et de confirmer la grande majorité des résultats. Seulement 3 références ont des IT valides et confirmés. Ceci ne permet pas d'appliquer un test de concordance à la première et la deuxième condition d'analyse de performance. Si l'on élargit aux résultats non valides obtenus sur 28 références, on obtient une sensibilité satisfaisante de 80 %. Ce nombre est purement indicatif et ne peut être utilisé pour valider le test utilisant les embryons de poisson zèbre. Pour cela, il faudrait poursuivre son évaluation en trouvant une autre source d'approvisionnement en œufs plus fiable pour confirmer les performances satisfaisantes de ce test sur des données validées.

Dans nos conditions, l'organisme poisson zèbre ne semble pas assez robuste pour réaliser un test de criblage.

2.2. Test utilisant les embryons de médaka

Remarque : Plusieurs étapes d'optimisation du test utilisant le médaka ont été nécessaires avant d'aboutir à la version présentée dans ce manuscrit. En effet, une durée d'exposition de 13 jours a été testée, ce qui correspond à la limite de la directive 2010/63/UE. Pour des raisons de variabilité interindividuelle, les taux de mortalité étaient faussés et peu reproductibles. La durée d'exposition a ensuite été testée à 8 jours. Mais là aussi pour des raisons de variabilité interindividuelle, l'éclosion sporadique des médakas ne permettait pas d'apprécier les malformations fonctionnelles de la majorité des témoins. Une durée d'exposition de 9 jours est optimale pour s'affranchir des variabilités interindividuelles pour le taux de mortalité et d'éclosion. Cette exposition est également compatible avec des renouvellements de milieux et de lecture pendant des jours ouvrés. La liste de substances de référence a également été testée deux fois avec une durée d'exposition de 13 jours et deux fois avec une durée de 8 jours.

La totalité des substances, soit 34 références, a pu être testée suite à la réalisation de 88 essais (Tableau 36). Toutes les valeurs de l'IT ont pu être confirmées et déterminées sauf pour 3 substances. En effet, les valeurs de la CL50 de l'éthambutol, de l'isoniazide et de la doxylamine sont supérieures à 4 000 mg/L, ce qui est la limite de nos conditions

d'expérimentation. Elles sont signalées par des cellules grisées dans le tableau de résultats. Cependant, plusieurs essais de ces 3 substances ont été réalisés, ce qui a permis d'estimer et de confirmer les valeurs de leur IT supérieures à celles indiquées dans le Tableau 36. Puisque ces 3 valeurs d'IT ont été confirmées, elles sont également prises en compte.

Tableau 36 : Résultats du test utilisant les embryons de médaka

Chemical name	Nombre total de tests	Nombre total de tests valides	CL 50 mg / L	CL 50 mg / L Intervalle de confiance à 95%	Test statistique	CE 50 mg / L	CE50 mg / L Intervalle de confiance à 95%	Test statistique	IT CL50 / CE50
6-Aminonicotinamide	2	2	2533	(1264,4-26983,31)	Probit	36,04	(33,04-39,31)	TSK	70,28
Acetohydroxamic acid	2	2	> 1000	NA	NA	-	NA	NA	NA
Acetylsalicylic acid	2	2	52,24	(44,08-59,59)	Probit	-	NA	NA	NA
Amantadine	2	1	1161,98	(1093,67-1234,55)	TSK	173,98	(157,61-192,05)	TSK	6,68
Cadmium chloride,	4	1	22,53	(19,25-26,37)	TSK	0,96	(0,81-1,13)	TSK	23,47
Captopril	2	2	1364,22	(1034,61-1798,82)	TSK	916,95	(613,62-1370,21)	TSK	1,49
Cyclophosphamide C	2	2	867,5	(798,27-942,72)	TSK	300,12	(267,95-336,16)	TSK	2,89
Ethambutol	5	3	> 2000	NA	NA	665,53	(520,91-850,07)	TSK	NA
Ethylenethiourea	2	1	125,36	(108,75-144,37)	Probit	49,03	(37,65-63,85)	TSK	2,56
Fluorouracil	2	2	406,89	(349,39-469,64)	Probit	140,9	(131,99-150,15)	Probit	2,89
Hydroxyurea	4	1	1157,53	(1040,29-1285,81)	Probit	883,96	(834,26-936,62)	TSK	1,31
Isoniazid	2	1	>4000	NA	NA	1084,45	(1008,50-1166,12)	TSK	>3,69
Lithium chloride	5	1	1198,487	(1086,14-1473,35)	Probit	722,25	(678,27-769,07)	TSK	1,66
Metoprolol	2	1	737,9	(696,55-781,70)	TSK	597,53	(562,37-634,89)	TSK	1,23
bupivacaine hydrochloride	2	2	> 1000	NA	NA	-	NA	NA	NA
Caffeine	2	1	968,75	(875,25-1172,97)	Probit	264,84	(228,15-307,44)	TSK	3,66
cefuroxime sodium	2	2	> 1000	NA	NA	-	NA	NA	NA
Colchicine	4	2	9,72	(8,01-11,85)	Probit	2,62	(2,35-2,91)	TSK	3,71
Diphenhydramine HCl	2	1	382,99	(333,46-439,88)	TSK	317,14	(155,936-644,90)	TSK	1,21
Doxylamine	2	1	>4000	NA	NA	255,78	(245,90-266,06)	TSK	>15,64
Hydroxyzine	2	1	111,96	(93,14-138,32)	Probit	57,09	(44,15-73,82)	TSK	1,96
Levamisol	4	1	987,13	(819,59-1234,62)	Probit	563,71	(446,60-711,53)	TSK	1,75
Metronidazole	2	2	> 1000	NA	NA	-	NA	NA	NA
Pyrilamine	2	1	60,46	(50,27-71,19)	Probit	52	(46,19-58,54)	TSK	1,16
Saccharin	2	2	> 1000	NA	NA	-	NA	NA	NA
Urethane	5	1	3452	(3121-3758)	Probit	1080	(940-1250)	TSK	3,20
Amaranth	2	2	> 1000	NA	NA	-	NA	NA	NA
Ascorbic acid	4	2	118,7	(100,51-140,92)	Probit	48,76	(38,26-62,13)	TSK	2,43
Azelaic acid	3	1	167	(149,8-186,3)	TSK	-	NA	NA	NA
Cefotaxime sodique	2	2	> 1000	NA	NA	-	NA	NA	NA
Ceftriaxone	2	2	> 1000	NA	NA	-	NA	NA	NA
Cromolyn disodique	2	2	> 1000	NA	NA	-	NA	NA	NA
Cyclamate sodium	2	2	> 1000	NA	NA	-	NA	NA	NA
Lactitol monohydrate	2	2	> 1000	NA	NA	-	NA	NA	NA

Les valeurs grisées de la colonne CL50 correspondent à la concentration maximale testable dans nos conditions en dessous de la valeur de CL50. Les IT correspondants grisés sont confirmés supérieurs à la valeur indiquée. NA : « Non Applicable ». TSK : Trimmed Spearman-Kärber.

Parmi les substances de référence négatives, l'acide ascorbique est la seule référence à avoir un IT calculé et confirmé d'une valeur de 2,43. Pour les autres substances négatives, aucune malformation n'a été observée chez les embryons de médaka exposés à la concentration la plus haute testée, ce qui correspond à des NOAEC de 1 000 mg/L.

Par conséquent, le seuil de l'IT a été fixé à 2,5 pour obtenir 100 % de spécificité pour l'ensemble des conditions d'analyse de performance du test (Tableau 37).

Tableau 37 : Évaluation de la concordance du test utilisant les embryons de médaka selon différentes conditions d'analyse

	1 ^{ère} condition	2 ^{ème} condition
Nombre de substances de référence	22	34
Valeur du seuil de l'IT	2,5	
Nombre de « Vrais Positifs »	8	12
Nombre de « Faux Négatifs »	6	14
Nombre de « Vrais Négatifs »	8	8
Nombre de « Faux Positifs »	0	
Spécificité	100 %	
Sensibilité	57,1 %	46,1 %
Concordance observée	0,72	0,59
Concordance attendue	0,30	0,42
Valeur κ	0,49	0,29
Accord du test	Modéré	Faible

1^{ère} condition : résultats valides et confirmés de la 1^{ère} et de la 3^{ème} catégories de références.
2^{ème} condition : résultats valides et confirmés de toutes les catégories de références.

Pour la 1^{ère} condition d'analyse intégrant uniquement les substances avec une mention de danger de reprotoxicité (1^{ère} catégorie de références positives), 22 substances sont prises en compte dont 8 VP, 6 FN et 8 VN. La sensibilité du test est modérée avec 57,1 % avec un accord du test modéré avec l'indice κ .

Pour la 2^{ème} condition d'analyse prenant également en compte les substances avec des alertes de tératogénicité confirmées (1^{ère} et 2^{ème} catégorie de substances de référence positives), 12 substances sont ajoutées aux 22 précédentes. Au total, le test obtient 12 VP, 14 FN et 8 VN. La sensibilité du test est toujours modérée avec 46,1 %. L'accord du test devient faible avec l'indice κ .

Grace à un approvisionnement de qualité d'un laboratoire de recherche, les 34 substances de référence ont pu être testées sur les embryons de médaka avec des résultats valides et confirmés. À cause de valeurs de CL50 supérieures à 4 000mg/L (concentration maximale de nos conditions expérimentales), 3 substances ont des valeurs d'IT estimées mais tout de même confirmées.

Parmi les substances de référence négatives, une seule substance obtient des embryons de médaka avec des malformations. En effet, l'acide ascorbique a une valeur de l'IT égale

à 2,43. Pour satisfaire notre exigence d'obtenir 100% de spécificité, le seuil de l'IT est fixé à 2,5, niveau plus élevé que celui fixé pour le test utilisant les embryons de poisson zèbre.

Dans la 1^{ère} condition d'analyse de performance du test, la sensibilité obtenue du test est modérée avec 57,1 % ainsi qu'un accord modéré de concordance. Dans la 2^{ème} condition d'analyse, la sensibilité du test est modérée et diminuée à 46,1 % ainsi qu'un accord faible de concordance.

Dans nos conditions expérimentales, les embryons de médaka sont suffisamment robustes pour réaliser un test de criblage. Par contre, la sensibilité de ce test est modérée avec un seuil fixé à 2,5 pour ne pas détecter l'acide ascorbique comme une substance ayant des effets tératogènes.

2.3. Test utilisant les embryons de xénope

La totalité des 34 substances a pu être testée au moins une fois sur les embryons de xénope suite à la réalisation de 97 essais. Suite à des problèmes d'approvisionnement en œufs, 9 substances n'ont pu être testées qu'une seule fois. Les valeurs de CL50 et / ou de CE50 de 5 substances n'ont pas pu être confirmées. Elles sont signalées par des cellules grisées dans le tableau de résultats (Tableau 38). Parmi les 34 références, 20 ont des valeurs d'indice tératogène valides et confirmés.

Des situations similaires à celles avec le poisson zèbre sont apparues avec le xénope. Plusieurs fois, les géniteurs n'avaient pas pondu malgré le lancement de trois accouplements en parallèle. Parfois la qualité (avec un taux de fécondation insuffisant) et la quantité en œufs a empêché le lancement de tests. Par ailleurs, plusieurs essais n'ont pas pu être validés à cause d'un pourcentage supérieur à 20% de malformations chez les groupes témoins. Ceci semble indiquer une prédisposition aux malformations spontanées. De plus, les embryons morts doivent être rapidement retirés des puits des plaques de culture afin de ne pas appauvrir en oxygène le milieu et entraîner la mort des embryons du même puits. Enfin, le dégangage des œufs de xénope reste une étape délicate : si les œufs restent ne serait-ce qu'une minute de plus dans la solution de L-Cystéine, ils ne survivent pas au dégangage.

Tableau 38 : Tableau de résultats du test réalisé sur les embryons de xénope

Chemical name	Nombre total de tests	Nombre de tests valides	CL 50 mg / L	CL 50 mg / L Intervalle de confiance à 95%	Test statistique	CE 50 mg / L	CE 50 mg / L Intervalle de confiance à 95%	Test statistique	IT CL50 / CE50
6-Aminonicotinamide	4	0	2000,00	(920,27-2541,48)	Probit	96,80	NR	Probit	20,66
Acetohydroxamic acid	4	0	>1500	NA	NA	225,75	(215,19-236,83)	TSK	>6,64
Acetylsalicylic acid	3	1	201,00	(196,26-207,36)	TSK	162,00	(156,68-166,66)	Probit	1,24
Amantadine	6	2	116,87	(104,66-130,11)	Probit	50,43	(46,42-53,65)	Probit	2,32
Cadmium chloride,	7	1	4,96	(4,19-5,60)	Probit	1,93	(1,80-2,07)	TSK	2,57
Captopril	2	2	>1000	NA	NA	>1000	NA	NA	NA
Cyclophosphamide C	3	3	>1000	NA	NA	>1000	NA	NA	NA
Ethambutol	3	3	>1000	NA	NA	>1000	NA	NA	NA
Ethylenethiourea	1	1	>1000	NA	NA	>1000	NA	NA	NA
Fluorouracil	2	0	>100	NA	NA	43,55	(41,29-45,93)	TSK	>2,30
Hydroxyurea	3	1	1440,23	(1303,80-1590,93)	TSK	428,00	(410,01-446,34)	TSK	3,37
Isoniazid	1	0	>3000	NA	NA	594,00	(519,92-680,02)	TSK	>5,05
Lithium chloride	5	4	75,12	(70,27-80,30)	TSK	26,64	(11,76-32,91)	Probit	2,82
Metoprolol	4	1	160,30	(143,43-182,09)	Probit	100,67	(96,29-105,25)	TSK	1,59
bupivacaine hydrochloride	6	1	66,67	(60,88-73,00)	TSK	15,57	(13,57-17,42)	Probit	4,28
Caffeine	1	1	473,58	(426,22-552,56)	Probit	146,42	(140,62-152,47)	TSK	3,23
cefuroxime sodium	2	2	>1000	NA	NA	>1000	NA	NA	NA
Colchicine	2	1	186,75	(177,33-196,66)	TSK	65,21	(52,97-80,66)	Probit	2,86
Diphenhydramine HCl	4	1	10,79	(9,16-12,70)	TSK	5,61	(3,82-6,89)	Probit	1,92
Doxylamine	1	1	>1000	NA	NA	>1000	NA	NA	NA
Hydroxyzine	3	1	9,89	(8,74-13,39)	Probit	3,76	(3,63-3,89)	TSK	2,63
Levamisol	4	1	64,84	(59,20-71,02)	TSK	50,77	(47,11-54,71)	TSK	1,28
Metronidazole	4	0	>3000	NA	NA	1460,00	1590,51)	Probit	>2,05
Pyrimidine	6	0	28,54	(26,05-31,52)	Probit	<15	NA	NA	>1,90
Saccharin	1	1	>1000	NA	NA	>1000	NA	NA	NA
Urethane	1	1	>1000	NA	NA	>1000	NA	NA	NA
Amaranth	1	1	>1000	NA	NA	>1000	NA	NA	NA
Ascorbic acid	1	1	>1000	NA	NA	>1000	NA	NA	NA
Azelaic acid	2	2	>1000	NA	NA	>1000	NA	NA	NA
Cefotaxime sodique	2	2	>1000	NA	NA	>1000	NA	NA	NA
Ceftriaxone	2	2	>1000	NA	NA	>1000	NA	NA	NA
Cromolyn disodique	3	3	>1000	NA	NA	>1000	NA	NA	NA
Cyclamate sodium	1	1	>1000	NA	NA	>1000	NA	NA	NA
Lactitol monohydrate	2	2	>1000	NA	NA	>1000	NA	NA	NA

Les valeurs grisées de la colonne CL50 correspondent à la concentration maximale testée en dessous de la CL50. Les valeurs grisées de la colonne CE50 correspondent à la concentration minimale testée au-dessus de la CE50. NR : « Not relevant », les intervalles de confiance n'ont pas pu être établis ou sont non pertinents. Les indices tétragènes grisés indiquent une valeur minimale et qu'un test complémentaire est nécessaire pour déterminer sa valeur exacte, ou que la substance n'a été testée qu'une seule fois. NA : « Non Applicable ». TSK : Trimmed Spearman-Kärber.

Aucune malformation n'a été observée chez les embryons de xénope exposés aux 8 références négatives testées, ce qui correspond à des NOAEC de 1 000 mg/L. Comme pour le test utilisant le poisson zèbre, le seuil peut être fixé à 1,0 pour obtenir 100 % de spécificité dans l'ensemble des conditions d'analyse de performance du test (Tableau 39).

Pour la 1^{ère} condition d'analyse intégrant uniquement les substances avec une mention de danger de reprotoxicité (1^{ère} catégorie de références positives), 14 substances de référence

sont prises en compte, dont 6 VP, 3 FN et 5 VN. Ceci entraîne une sensibilité du test assez satisfaisante de 66,7 % avec un accord modéré avec l'indice κ .

Tableau 39 : Évaluation de la concordance du test utilisant les embryons de xénope selon différentes conditions d'analyse de performance

	1 ^{ère} condition	2 ^{ème} condition
Nombre de substances de référence	14	20
Valeur du seuil de l'IT	1,0	
Nombre de « Vrais Positifs »	6	11
Nombre de « Faux Négatifs »	3	4
Nombre de « Vrais Négatifs »	5	5
Nombre de « Faux Positifs »	0	
Spécificité	100 %	
Sensibilité	66,7 %	73,3 %
Concordance observée	0,78	0,80
Concordance attendue	0,48	0,52
Valeur κ	0,59	0,58
Accord du test	Modéré	

1^{ère} condition : résultats valides et confirmés de la 1^{ère} et de la 3^{ème} catégories de références.
 2^{ème} condition : résultats valides et confirmés de toutes les catégories de références.

Pour la 2^{ème} condition prenant également en compte les substances avec des alertes de tératogénicité confirmées (1^{ère} et 2^{ème} catégorie de substances de référence positives), 6 substances de la 2^{ème} catégorie de références positives sont ajoutées. On obtient alors 11 VP, 4 FN et 5 VN. Ceci entraîne une sensibilité du test augmentée de 6,6 % pour atteindre 73,3 % avec un accord toujours modéré avec l'indice κ .

Lors de notre étude, un problème d'approvisionnement en œufs de xénope n'a pas permis de confirmer les résultats obtenus pour 20 des 34 substances de référence.

Aucune malformation n'a été détectée chez les embryons de xénope exposés aux substances de référence négatives, le seuil de l'IT est donc fixé à 1,0.

Quel que soit les conditions d'exploitation des résultats, le test utilisant le xénope a une sensibilité satisfaisante avec 66,7 % pour la 1^{ère} condition et 73,3 % pour la 2^{ème}.

Au-delà de ces performances, dans nos conditions, le manque de fiabilité des approvisionnements, les difficultés de dégantage et le suivi quotidien de la létalité rendent le test utilisant les embryons de xénope peu compatible au criblage à haut débit de substances chimiques.

2.4. Comparaison des tests évalués sur des listes différentes de substances de référence

Les problèmes d'approvisionnement en œufs de poisson zèbre et de xénope n'ont pas permis de tester une liste commune de substances de référence. Les listes de chaque test diffèrent en nombre quel que soit les conditions d'analyse des performances.

Dans la 1^{ère} condition d'analyse correspondant aux attentes d'un test valide sur des données fiables, le test utilisant le xénope a la meilleure sensibilité avec 66,7 % pour un seuil de l'IT fixé à 1,0 et avec une liste de 14 références (Tableau 40). Le test utilisant les embryons de médaka a une sensibilité modérée avec 57,1 % pour un seuil de l'IT fixé à 2,5 et avec une liste complète de 22 références. Le test utilisant le poisson zèbre a uniquement 1 référence répondant aux critères de cette condition, ce qui n'est pas suffisant pour valider un test.

Tableau 40 : Comparaison des concordances de chaque test sur des listes différentes de substances de référence

Test utilisant le	1 ^{ère} condition			2 ^{ème} condition		
	Poisson zèbre	Médaka	Xénope	Poisson zèbre	Médaka	Xénope
Nombre de références	1	22	14	3	34	20
Seuil de l'IT	1,0	2,5	1,0	1,0	2,5	1,0
Nombre de VP	0	8	6	2	12	11
Nombre de FN	0	6	3	0	14	4
Nombre de VN	1	8	5	1	8	5
Nombre de FN	0					
Spécificité	100 %					
Sensibilité	NA	57,1 %	66,7 %	NA	46,1 %	73,3 %
Concordance observée	NA	0,72	0,78	NA	0,59	0,80
Concordance attendue	NA	0,30	0,48	NA	0,42	0,52
Valeur κ	NA	0,49	0,59	NA	0,29	0,58
Accord du test	NA	Modéré	Modéré	NA	Faible	Modéré

1^{ère} condition : résultats valides et confirmés de la 1^{ère} et de la 3^{ème} catégories de références.

2^{ème} condition : résultats valides et confirmés de toutes les catégories de références.

« NA » : Non Applicable.

Dans la 2^{ème} condition d'analyse permettant d'apprécier les capacités de prédiction des effets sur des substances ayant uniquement des alertes de tératogénicité, le test utilisant les embryons de xénope a encore la meilleure sensibilité avec 73,3 % avec une liste de 20 références. Le test utilisant les embryons de médaka a une sensibilité diminuée avec 46,1 %

pour une liste complète de 34 références. Le test utilisant les embryons de poisson zèbre a seulement 3 références répondant aux critères de cette condition, ce qui n'est toujours pas suffisant pour valider un test.

En l'état, les résultats obtenus sur le test utilisant les embryons de poisson zèbre ne permettent pas de conclure sur ses performances. Les difficultés d'approvisionnement en œufs de poisson zèbre n'ont pas permis de poursuivre l'étude.

Sur la base de listes différentes de substances de référence, le test utilisant les embryons de xénope obtient les meilleures sensibilités : 66,7 % en tenant uniquement compte des références positives les plus fiables et les références négatives et 73,3 % en incluant également les références positives avec des alertes de tératogénicité. Avec un seuil plus élevé de l'IT à 2,5 et un nombre plus élevé de références, le test utilisant les embryons de médaka obtient une sensibilité modérée de 57,1 % dans la 1^{ère} condition d'analyse et de 46,1 % dans la 2^{ème} condition d'analyse.

Ces différentes interprétations illustrent l'importance du choix de la liste de substances de référence. En fonction des substances testées et de leur nombre, les performances d'un test sont différentes.

3. Comparaison des performances des tests avec les mêmes substances de référence

Pour que la comparaison des différents organismes soit la plus pertinente possible, elle se fait uniquement sur les références communes testées.

3.1. Comparaison avec une substance de référence

La colchicine est une substance de référence positive correctement identifiée comme ayant des effets tératogènes dans les trois tests. Il s'agit d'un VP. Cette substance de référence permet de comparer plus précisément les trois tests en étudiant l'ensemble des essais ayant au moins permis de calculer une valeur de CL50 ou de CE50.

Lorsque l'on observe l'ensemble des données générées pour la colchicine chez les trois tests (Tableau 41 et Figure 49), les valeurs de CL50 ne sont pas équivalentes entre les différents organismes : de l'ordre de 35 mg/L pour le test utilisant les embryons de poisson zèbre, de l'ordre de 7 mg/L pour le test utilisant les embryons de médaka et de l'ordre de

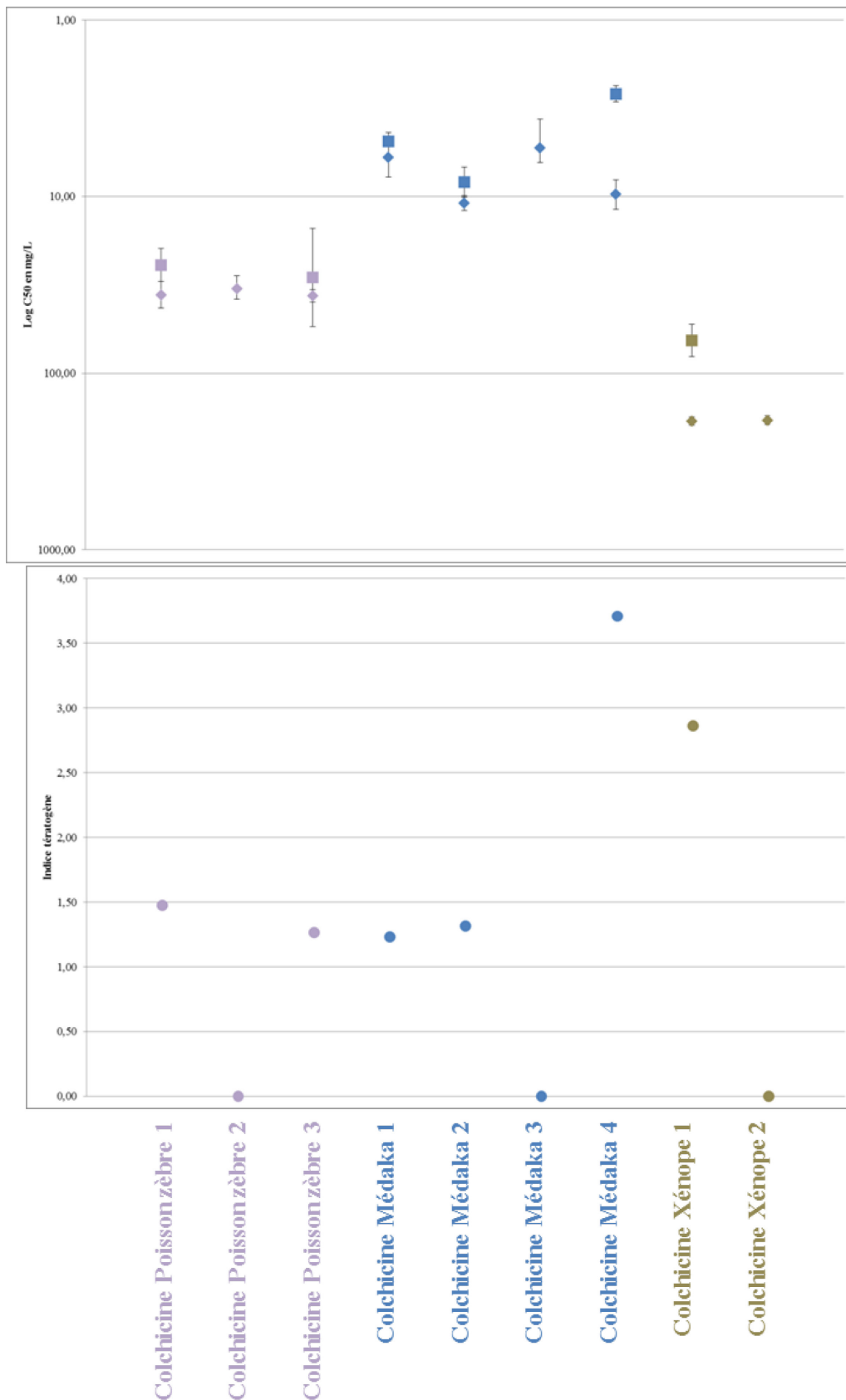


Figure 49 : Comparaison de l'ensemble des résultats de la colchicine obtenus chez les tests utilisant les embryons de poisson zèbre, de médaka et de xénope
 Les valeurs de CL50 et de CE50 sont exprimées en log10 et en ordre inversé pour faciliter la lecture et mettre en avant les effets létaux ou tératogènes. Losanges, carrés et points violets : Poisson zèbre. Losanges, carrés et points bleus : Médaka. Losanges, carrés et points marron : Xénope.

185 mg/L pour le test utilisant les embryons de xénope. Si on fait une analogie avec les seuils d'écotoxicité applicable à la ligne directrice OCDE n°210 sur poisson dont l'exposition est d'environ 30 jours en fonction de l'espèce utilisée, la colchicine pourrait être considérée écotoxique (de 1 à 10 mg/L) chez le médaka avec une mention de danger H401 ; nocif pour les organismes aquatiques (de 10 à 100 mg/L) chez le poisson zèbre avec une mention de danger H402 et sans mention de danger (>100 mg/L) chez le xénope.

Les valeurs de CL50 et de CE50 pour le test utilisant les embryons de poisson zèbre et pour le test utilisant les embryons de xénope sont très reproductibles. Par contre, un facteur 2 peut être observé avec les valeurs obtenues dans le test utilisant les embryons de médaka. Malgré ce facteur 2 entre le 1^{er} et le 2^{ème} essai, l'IT de chacun de ces tests sont similaires : 1,23 et 1,32. Entre le 2^{ème} essai utilisant les embryons de médaka et le 4^{ème}, les valeurs de CL50 sont du même ordre de grandeur (10,9 mg/L et 9,72 mg/L). Pourtant, la valeur de l'IT varie presque d'un facteur 3 (1,32 à 3,71).

Tableau 41 : Ensemble des résultats générés sur les essais sur les trois tests

Substance de référence	CL 50 en mg / L	CL 50 en mg / L min intervalle de confiance à 95%	CL 50 en mg / L max intervalle de confiance à 95%	CE 50 en mg / L	CE 50 en mg / L min intervalle de confiance à 95%	CE 50 en mg / L max intervalle de confiance à 95%	IT
Colchicine Poisson zèbre 1	36,00	30,30	42,90	24,40	19,60	30,29	1,48
Colchicine Poisson zèbre 2	33,18	27,99	38,06	~30	0,00	0,00	~1,11
Colchicine Poisson zèbre 3	36,40	33,74	39,43	28,77	15,16	54,60	1,27
Colchicine Médaka 1	5,99	4,34	7,77	4,87	NR	0	1,23
Colchicine Médaka 2	10,9	9,82	12,02	8,28	6,79	10,09	1,32
Colchicine Médaka 3	5,3	3,63	6,41	~1	0	0	~5,3
Colchicine Médaka 4	9,72	8,01	11,85	2,62	2,35	2,91	3,71
Colchicine Xénope 1	186,75	177,33	196,66	65,21	52,97	80,66	2,86
Colchicine Xénope 2	184,77	174,72	195,39	~67	0,00	0,00	~2,75

Les valeurs de CL50 et de CE50 peuvent être très différentes d'une espèce à une autre. En effet, un facteur 2 de ces valeurs, lié à la variabilité biologique, peut exister d'un essai à l'autre. Ceci conforte le choix de calculer un IT uniquement sur la base de valeurs de CL50 et de CE50 issues d'un même essai. De plus, la stabilité du calcul de la CL50 ne semble pas être indicative de l'obtention d'un IT également stable.

3.2. Comparaison des tests utilisant les trois organismes

Afin de pouvoir comparer le test utilisant les embryons de poisson zèbre aux autres tests, les résultats valides mais non confirmés sont également intégrés pour obtenir une liste commune de substances de référence. Dans ces conditions, 15 substances ont été sélectionnées (Tableau 42) : 5 références de chaque catégorie.

Tableau 42 : Résultats valides des trois tests sur 15 références communes

Test utilisant des embryons de	Poisson zèbre			Médaka			Xénope		
	CL 50 mg / l	CE 50 mg / l	IT	CL 50 mg / l	CE 50 mg / l	IT	CL 50 mg / l	CE 50 mg / l	IT
Acetylsalicylic acid	21,30	45,80	0,47	52,24	> 1000	NA	201,00	162,00	1,24
Amantadine	1240,00	504,21	2,46	1161,98	173,98	6,68	116,87	50,43	2,32
Captopril	>1000	>1000	NA	1364,22	916,95	1,49	>1000	>1000	NA
Cyclophosphamide C	784,20	198,00	8,51	867,5	300,12	2,89	>1000	>1000	NA
Ethambutol dihydrochloride	>1000	>1000	NA	>4000	665,53	>6,01	>1000	>1000	NA
bupivacaine hydrochloride	258,60	227,90	1,13	> 1000	> 1000	NA	66,67	15,57	4,28
Colchicine	36,00	24,40	1,48	9,72	2,62	3,71	186,75	65,21	2,86
Hydroxyzine	34,87	11,50	2,97	111,96	57,09	1,96	9,89	3,76	2,63
Levamisol	1003,00	382,60	2,62	987,13	563,71	1,75	64,84	50,77	1,28
Saccharin	>1000	>1000	NA	> 1000	> 1000	NA	>1000	>1000	NA
Amaranth	>1000	>1000	NA	> 1000	> 1000	NA	>1000	>1000	NA
Ceftriaxone	744,00	>1000	NA	> 1000	> 1000	NA	>1000	>1000	NA
Cromolyn disodique	>1000	>1000	NA	> 1000	> 1000	NA	>1000	>1000	NA
Cyclamate sodium	>1000	>1000	NA	> 1000	> 1000	NA	>1000	>1000	NA
Lactitol monohydrate	>1000	>1000	NA	> 1000	> 1000	NA	>1000	>1000	NA

Les indices tératogènes grisés indiquent que la substance n'a été testée qu'une seule fois. NA : Non Applicable.

Aucune malformation n'a été détectée chez les embryons des trois espèces exposés aux références négatives. En effet, l'acide ascorbique ne fait pas partie de la liste commune de substances de référence. Elle n'a été testée que dans le test utilisant les embryons de médaka. C'est d'ailleurs la valeur de son IT qui a précédemment fixé la valeur du seuil de l'IT à 2,5 pour le test utilisant les embryons de médaka. Bien évidemment, la valeur de l'IT de l'acide ascorbique doit être prise en compte lorsque les performances du test utilisant les embryons de médaka sont analysées séparément. Cependant, pour comparer les trois tests entre eux, les mêmes règles aux trois tests doivent être appliquées. Sur la base de la liste commune de substances de référence, les seuils de tératogénicité des trois tests sont fixés à 1,0 pour obtenir 100 % de spécificité avec la meilleure sensibilité possible.

Dans la 1^{ère} condition d'analyse, les 5 substances de référence de la 1^{ère} catégorie et celles de la 3^{ème} catégorie sont prises en compte (Tableau 43). L'amantadine est correctement détectée comme ayant des effets tératogènes dans les trois tests. Le cyclophosphamide est correctement détecté par les tests utilisant les embryons de poisson zèbre et de médaka,

l'éthambutol et le captopril uniquement par le test utilisant les embryons de médaka et l'acide acétylsalicylique uniquement par le test utilisant les embryons de xénope (Figure 50). Les tests utilisant le poisson zèbre et le xénope ont 2 VP avec des substances différentes. Ils ont une sensibilité faible de 40,0 %. Le test utilisant les embryons de médaka détecte 2 VP de plus et obtient la meilleure sensibilité des trois tests dans ces conditions, à savoir une sensibilité satisfaisante de 80,0 %.

Tableau 43 : Évaluation de la concordance des tests selon les conditions d'analyse de performance

Test utilisant le	1 ^{ère} condition			2 ^{ème} condition		
	Poisson zèbre	Médaka	Xénope	Poisson zèbre	Médaka	Xénope
Nombre de références	10			15		
Seuil de l'indice tératogène	1,0					
Nombre de « Vrais Positifs »	2	4	2	6	7	6
Nombre de « Faux Négatifs »	3	1	3	4	3	4
Nombre de « Vrais Négatifs »	5					
Nombre de « Faux Positifs »	0					
Spécificité	100%					
Sensibilité	40,0%	80,0%	40,0%	60,0%	70,0%	60,0%
Concordance observée	0,70	0,90	0,70	0,73	0,80	0,73
Concordance attendue	0,50	0,50	0,50	0,47	0,49	0,47
Valeur κ	0,40	0,80	0,40	0,50	0,61	0,50
Accord du test	Faible	Fort	Faible	Modéré	Fort	Modéré

1^{ère} condition : résultats valides et confirmés de la 1^{ère} et de la 3^{ème} catégories de références.

2^{ème} condition : résultats valides et confirmés de toutes les catégories de références.

Dans la 2^{ème} condition d'analyse, les 5 références de la 2^{ème} catégorie sont intégrées. Le test utilisant les embryons de médaka obtient encore la meilleure sensibilité avec 70,0 %. Il a permis de détecter 1 VP de plus que les deux autres tests pour atteindre 7 VP avec 3 FN. Les tests utilisant les embryons de poisson zèbre et de xénope obtiennent là encore les mêmes performances mais pas sur les mêmes références de la liste commune. Ils ont chacun correctement détecté 6 substances comme ayant des effets tératogènes des références positives (6 VP). Parmi elles, 3 de la 2^{ème} catégorie sont communes aux trois tests : la colchicine l'hydroxyzine et le lévamisole. Leurs ITs varient en fonction des tests. Par exemple, l'hydroxyzine obtient 2,97 dans le test utilisant les embryons de poisson zèbre, 1,96 dans celui utilisant les embryons de médaka et 2,63 dans celui utilisant les embryons de xénope. La bupivacaïne est correctement identifiée par les tests utilisant les embryons de poisson zèbre et de xénope. La saccharine est le FN commun aux trois tests. Tous les ITs des références négatives de la 3^{ème} catégorie sont nuls. Dans ces conditions, leur sensibilité de test

est modérée avec 60,0 %. Leur indice κ correspond à un accord modéré. L'ajout de substances avec des alertes de tératogénicité augmente de 20,0 % la sensibilité des tests utilisant les embryons de poisson zèbre et de xénope, tandis que celle du test utilisant les embryons de médaka augmente de 10,0 % pour atteindre 70,0 % avec un accord fort de concordance.

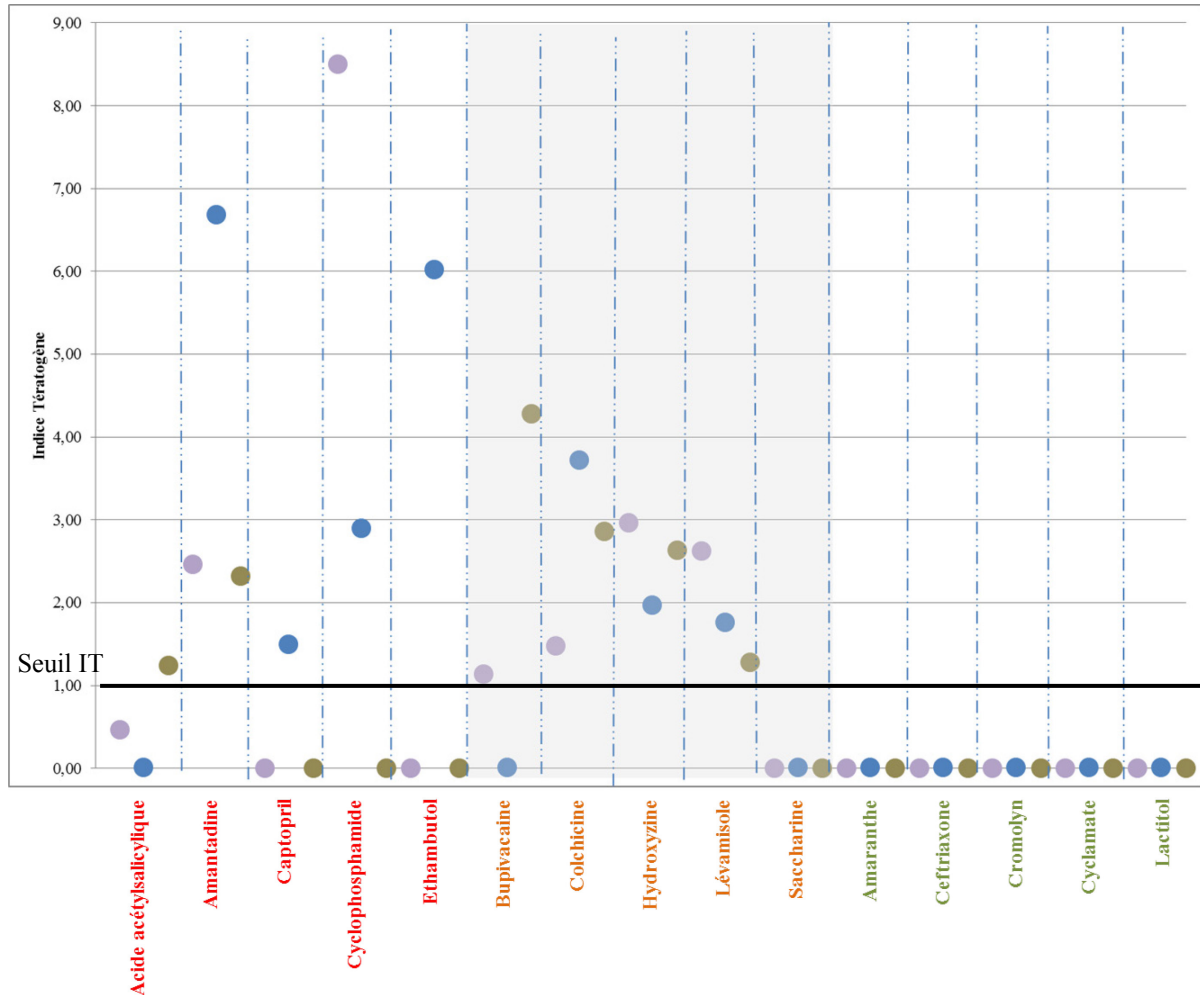


Figure 50 : Comparaison des IT des trois tests sur 15 substances de référence
Ronds violets : Poisson zèbre. Ronds bleus : Médaka. Ronds marron : Xénope.

Lorsque l'on compare les valeurs de CL50 et de CE50 obtenues dans les trois tests (Figure 51), la distribution entre les trois varie. Par exemple, le test utilisant les embryons de médaka est plus sensible à la colchicine (CL50 et CE50) que le test utilisant les embryons de poisson zèbre suivi de celui utilisant les embryons de xénope. Pour l'hydroxyzine, le test utilisant les embryons de xénope est le plus sensible suivi de celui utilisant les embryons de poisson zèbre puis celui utilisant les embryons de médaka. Le test utilisant les embryons de poisson zèbre est le plus sensible à l'acide acétylsalicylique que le test utilisant les embryons de xénope et aucune malformation n'a été observée chez les embryons de médaka exposés.

Sur la base de ces éléments, aucun test ne semble plus sensible que les deux autres. Les sensibilités des tests varient en fonction des substances présentes dans la liste.

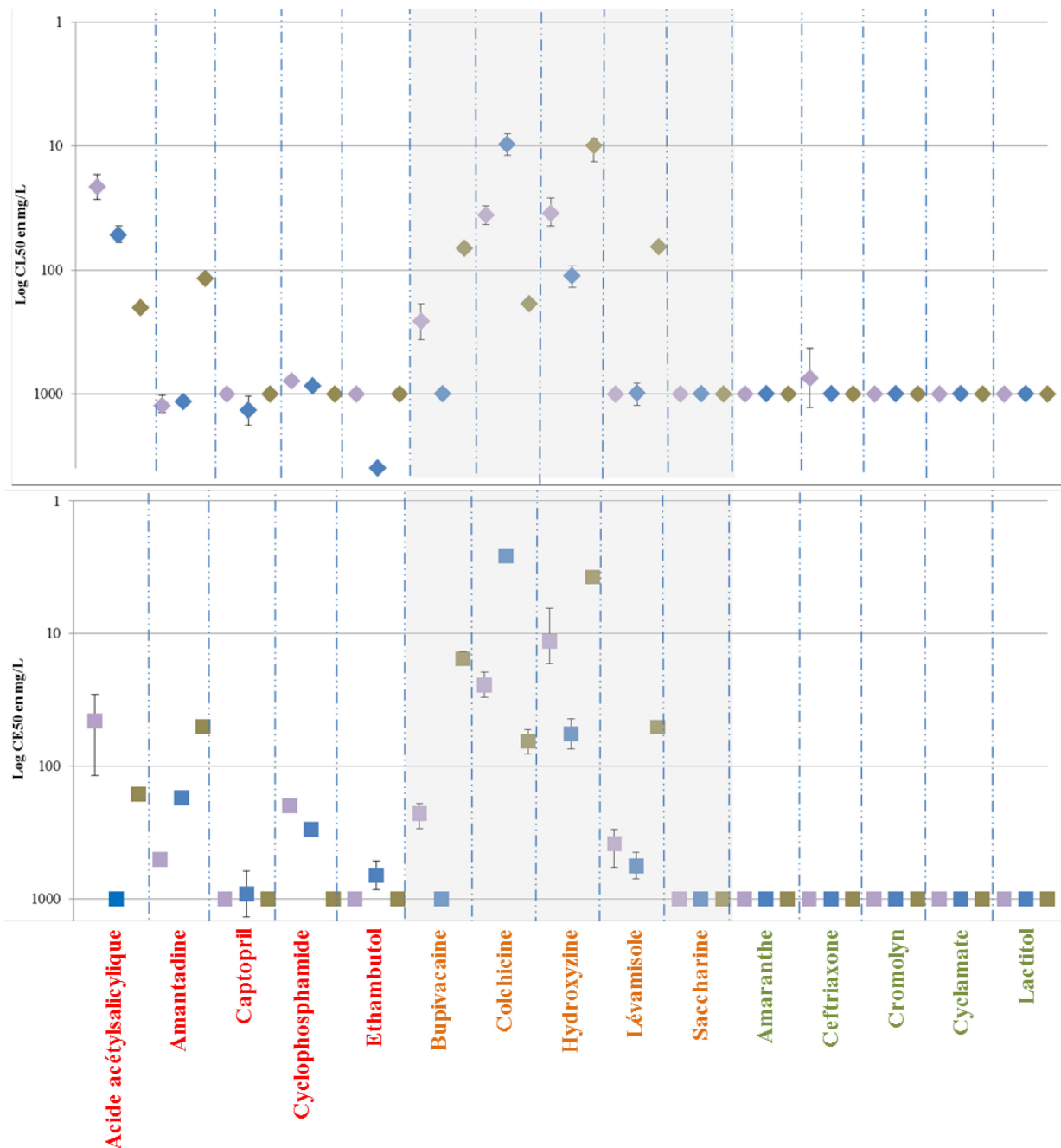


Figure 51 : Comparaison des valeurs de CL50 et de CE50 des trois tests sur 15 substances de référence
Les valeurs de CL50 et de CE50 sont exprimées en log10 et en ordre inversé pour faciliter la lecture et mettre en avant les effets létaux ou tératogènes. Losanges et carrés violets : Poisson zèbre. Losanges et carrés bleus : Médaka. Losanges et carrés marron : Xenope.

Pour comparer les trois tests sur une même liste de substances de référence, les résultats valides mais non confirmés sont également pris en compte pour intégrer les résultats obtenus dans le test utilisant les embryons de poisson zèbre. De la même manière pour appliquer les mêmes critères aux trois tests, le seuil de l'IT est fixé pour chaque test afin d'obtenir 100 % de spécificité avec la meilleure sensibilité possible. Selon ces critères, le seuil de l'IT est fixé à 1,0 pour les trois tests. En effet, aucune malformation n'a été observée chez les embryons exposés aux références négatives. Par conséquent, la valeur de leur IT n'a pas pu être calculée.

Dans la 1^{ère} condition d'analyse de performance, le test utilisant les embryons de médaka obtient une sensibilité satisfaisante la plus élevée avec 80 % contre 40 % pour les deux autres sur la base de 10 substances de référence.

Dans la 2^{ème} condition d'analyse, le test utilisant les embryons de médaka obtient la sensibilité plus élevée avec 70 % contre 60 % pour les deux autres pour un seuil fixé à 1,0 et sur une liste de 15 substances, même si les Vrais Positifs ne sont pas exactement les mêmes d'un test à un autre.

Lorsque les mêmes critères sont appliqués aux trois tests, le test utilisant les embryons de médaka obtient les meilleures performances avec une sensibilité satisfaisante entre 70 et 80 %, quel que soit les conditions d'analyse de performance.

3.3. Comparaison des tests utilisant les embryons de médaka et de xénope

Pour cette comparaison, uniquement les résultats valides et confirmés sont pris en compte. Dans ces conditions, 20 substances de référence ont été sélectionnées (Tableau 44). Parmi elles, se trouve l'éthambutol dont la valeur de l'IT a été confirmée mais seulement estimée car sa valeur de CL50 est supérieure à 4 000 mg/L.

Tableau 44 : Résultats valides et confirmés des tests utilisant les embryons de médaka et de xénope

Chemical name	Test médaka			Test xénope		
	CL 50 mg / l 9 jours	CE 50 mg / l 9 jours	IT	CL 50 mg / l 4 jours	CE 50 mg / l 4 jours	IT
Acetylsalicylic acid	52,24	> 1000	NA	201,00	162,00	1,24
Amantadine	1161,98	173,98	6,68	116,87	50,43	2,32
Cadmium chloride,	22,53	0,96	23,47	4,96	1,93	2,57
Captopril	1364,22	916,95	1,49	>1000	>1000	NA
Cyclophosphamide C	867,5	300,12	2,89	>1000	>1000	NA
Ethambutol	>4000	665,53	>6,01	>1000	>1000	NA
Hydroxyurea	1157,53	883,96	1,31	1440,23	428,00	3,37
Lithium chloride	1198,487	722,25	1,66	75,12	26,64	2,82
Metoprolol	737,9	597,53	1,23	160,30	100,67	1,59
bupivacaine hydrochloride	> 1000	> 1000	NA	66,67	15,57	4,28
cefuroxime sodium	> 1000	> 1000	NA	>1000	>1000	NA
Colchicine	9,72	2,62	3,71	186,75	65,21	2,86
Diphenhydramine HCl	382,99	317,14	1,21	10,79	5,61	1,92
Hydroxyzine	111,96	57,09	1,96	9,89	3,76	2,63
Levamisol	987,13	563,71	1,75	64,84	50,77	1,28
Azelaic acid	167	> 1000	NA	>1000	>1000	NA
Cefotaxime sodique	> 1000	> 1000	NA	>1000	>1000	NA
Ceftriaxone	> 1000	> 1000	NA	>1000	>1000	NA
Cromolyn disodique	> 1000	> 1000	NA	>1000	>1000	NA
Lactitol monohydrate	> 1000	> 1000	NA	>1000	>1000	NA

La valeur grisée de la colonne CL50 correspond à la concentration maximale testable dans nos conditions en dessous de la valeur de CL50. L'IT correspondant grisés est confirmé supérieur à la valeur indiquée. NA : « Non Applicable ».

Sur cette liste de substances de référence commune, aucune référence négative n'obtient de valeur de l'IT. Par conséquent, le seuil de l'IT pour les deux tests est fixé à 1,0.

Dans la 1^{ère} condition d'analyse, 9 substances positives de la 1^{ère} catégorie et 5 substances négatives de la 3^{ème} catégorie sont prises en compte (Tableau 45). Le test utilisant les embryons de médaka a détecté 8 VP et celui utilisant les embryons de xénope 2 de moins. Parmi elles, 5 sont communes aux deux tests. Pour 2 VP, le chlorure de lithium et le métoprolol, les IT obtenus dans chaque test sont du même ordre de grandeur (Figure 52). Pour 2 autres VP, le test utilisant les embryons de médaka obtient un IT plus important que celui obtenu dans le test utilisant les embryons de xénope. En effet, l'amantadine obtient 6,68 contre 2,32 et le chlorure de cadmium de 23,47 contre 2,57. Par contre, l'hydroxyurée obtient un IT presque 3 fois plus élevé dans le test utilisant les embryons de xénope (3,37) que celui du test utilisant les embryons de médaka (1,31). L'éthambutol, le captopril et le

Tableau 45 : Comparaison des performances des tests utilisant les embryons de médaka et de xénope sur une même liste de références selon la méthode Kappa

Test utilisant le	1 ^{ère} condition		2 ^{ème} condition	
	Médaka	Xénope	Médaka	Xénope
Nombre de références	14		20	
Seuil de l'indice tératogène	1,0			
Nombre de « Vrais Positifs »	8	6	12	11
Nombre de « Faux Négatifs »	1	3	3	4
Nombre de « Vrais Négatifs »	5			
Nombre de « Faux Positifs »	0			
Spécificité	100%			
Sensibilité	88,9%	66,7%	80,0%	73,3%
Concordance observée	0,93	0,78	0,85	0,80
Concordance attendue	0,52	0,48	0,55	0,52
Valeur κ	0,85	0,59	0,67	0,58
Accord du test	Parfait	Modéré	Fort	Modéré

1^{ère} condition : résultats valides et confirmés de la 1^{ère} et de la 3^{ème} catégories de références

2^{ème} condition : résultats valides et confirmés de toutes les catégories de références.

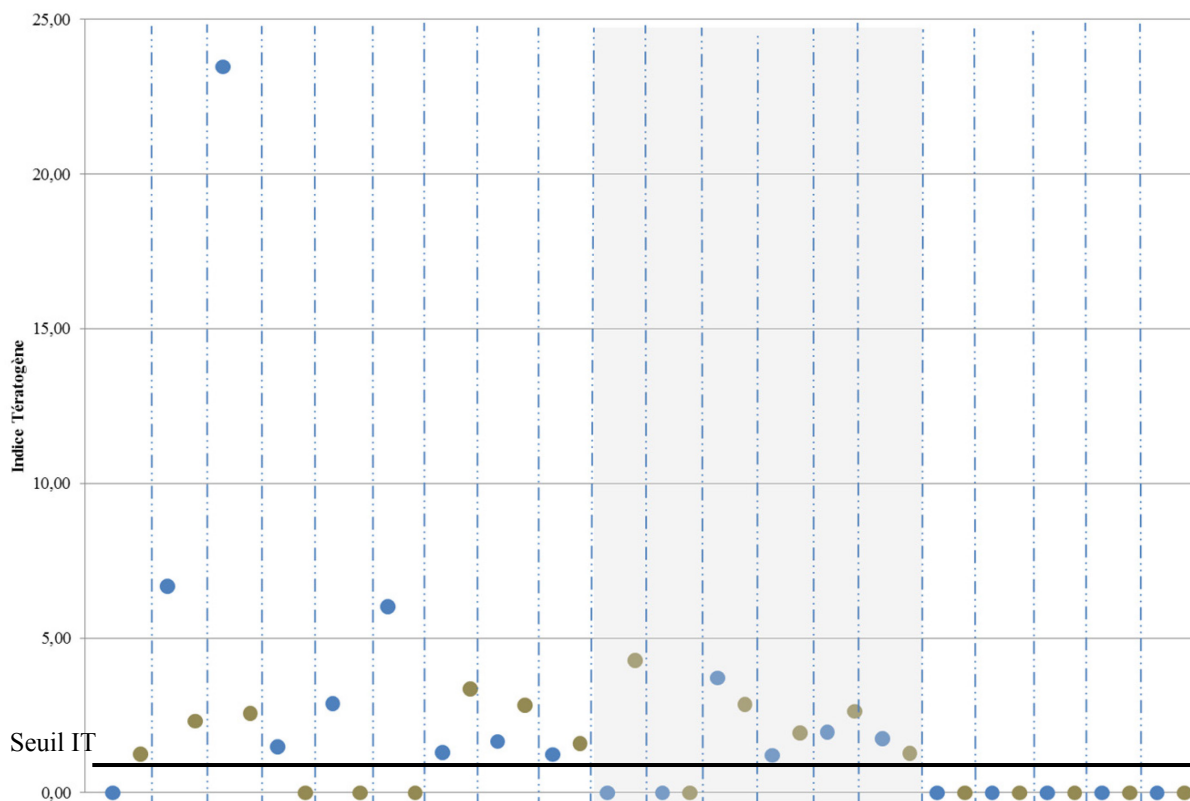


Figure 52 : Comparaison des IT de 20 substances de référence testées chez le médaka et le xénope
Ronds bleus : Médaka. Ronds marron : Xénope

L'acide acétylsalicylique est uniquement détecté dans le test utilisant les embryons de xénope. Le test utilisant les embryons de médaka obtient la meilleure performance avec une sensibilité satisfaisante de 88,9 % et un accord du test parfait. Le test utilisant les embryons de xénope obtient une sensibilité un peu moins élevée avec 66,7 % et un accord du test modéré.

Dans la 2^{ème} condition d'analyse, 6 substances de la 2^{ème} catégorie de références sont ajoutées. Le test utilisant les embryons de médaka obtient à nouveau la meilleure performance avec une sensibilité diminuée de 8,9 % pour atteindre 80,0 % avec un accord du test fort. La sensibilité du test utilisant les embryons de xénope est augmentée de 6,6 % pour atteindre 73,3 % avec un accord du test modéré. Leurs valeurs d'IT obtenus pour les 4 nouveaux VP communs aux deux tests sont du même ordre de grandeur. Le cefuroxime n'est détecté dans aucun des tests. Il s'agit du FN commun.

Lorsque l'on compare les CL50 et les CE50 obtenus dans les deux tests (Figure 53), la distribution entre les deux varie. Bien que les ITs soient comparables entre les deux tests pour l'amantadine, le chlorure de lithium, le métoprolol, le diphenhydramine, l'hydroxyzine et le lévamisol, les valeurs de CL50 et de CE50 sont plus basses dans le test utilisant les embryons de xénope. Pour ces substances, le test utilisant les embryons de xénope est donc plus sensible que celui utilisant les embryons de médaka à la fois pour les effets létaux et tératogènes sans que cela entraîne des ITs plus importants que ceux obtenus dans le test utilisant les embryons de médaka. Dans le cas de la colchicine, l'inverse est vrai : la valeur de CL50 obtenue dans le test utilisant le médaka (9,72 mg/L) est presque 20 fois inférieure à celle obtenue dans le test utilisant les embryons de xénope (186,75 mg/L).

Dans la 1^{ère} condition d'analyse de performance, le test utilisant les embryons de médaka obtient une sensibilité plus élevée (88,9 % avec un accord du test parfait) que celle du test utilisant les embryons de xénope (66,7 % avec un accord du test modéré) sur la base de 14 substances de référence.

Dans la 2^{ème} condition d'analyse, le test utilisant les embryons de médaka obtient à nouveau une sensibilité plus élevée (80,0 % avec un accord du test fort) que celle du test utilisant le xénope (73,3 % avec un accord du test modéré) sur la base de 20 substances de référence.

Par ailleurs, les valeurs de CL50 ou de CE50 ne semblent pas extrapolables d'une espèce à l'autre.

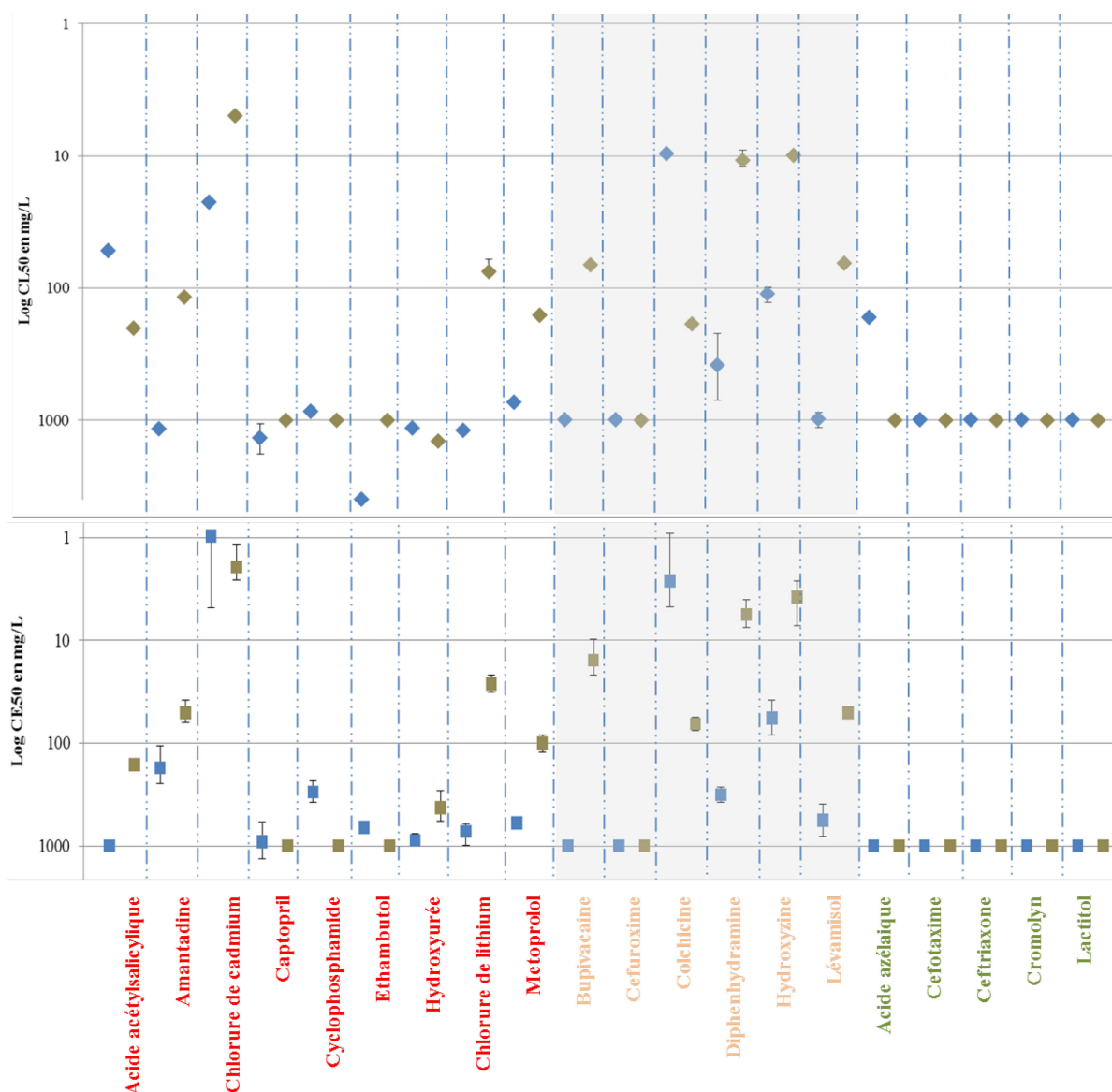


Figure 53 : Comparaison des valeurs de CL50 et de CE50 de 20 substances de référence obtenues dans les tests utilisant les embryons de médaka et de xénope

Les valeurs de CL50 et de CE50 sont exprimées en log10 et en ordre inversé pour faciliter la lecture et mettre en avant les effets létaux ou tératogènes. Losanges et carrés bleus : Médaka. Losanges et carrés marron : Xénope.

L'évaluation des trois tests de tératogénicité a été réalisée selon les mêmes principes sur les 34 substances de référence sélectionnées précédemment. Les organismes sont exposés jusqu'aux limites de développement embryonnaire précisées par la directive 2010/63/UE. À la fin de l'essai, un indice tératogène (IT) est obtenu pour chaque substance en faisant le rapport entre la concentration létale pour 50 % des individus (CL50) et la concentration entraînant des malformations chez 50 % des embryons survivants (CE50). Un seuil est appliqué à l'IT pour obtenir 100 % de spécificité. Lorsque la valeur de l'IT est supérieure à ce seuil, la substance est considérée comme tératogène chez l'espèce considérée, ce qui consiste

une alerte de tératogénicité pour les mammifères. Si la valeur de l'IT est inférieure à ce seuil, cela ne préjuge en rien de l'innocuité de la substance en question.

Lorsque l'on analyse séparément les résultats des tests sur des listes différentes de substances, le test utilisant les embryons de xénope obtient une meilleure sensibilité que celui utilisant les embryons de médaka. En l'état, les résultats valides mais non confirmés obtenus sur le test utilisant les embryons de poisson zèbre ne permettent pas de conclure sur ses performances, même si celles-ci semblent également prometteuses.

Lorsque l'on analyse les résultats obtenus pour la colchicine, une substance Vrai Positive (VP) commune aux trois tests, les valeurs de CL50 et de CE50 peuvent varier d'une espèce à une autre mais aussi d'un essai à un autre réalisés sur la même espèce. Néanmoins, cette variation de valeurs de CL50 et de CE50 n'engendre pas systématiquement des variations des valeurs de l'IT. Ceci conforte le choix de calculer un IT uniquement à partir de valeurs de CL50 et de CE50 obtenues dans le même essai pour s'affranchir de la variabilité inter-essai.

Lorsque les trois tests sont comparés sur une liste commune de substances et quel que soit la condition d'analyse de performance, le test utilisant les embryons de médaka obtient les meilleures performances avec une sensibilité moyenne satisfaisante de 79,7 %. Lorsque les tests utilisant les embryons de poisson zèbre et de xénope obtiennent la même sensibilité ce n'est pas avec les mêmes VP. Individuellement, les tests ne sont pas sensibles aux mêmes substances. Ceci confirme l'importance de valider un test sur une liste de substances de référence avec un nombre conséquent et avec des modes d'action variées.

Dans nos conditions et contrairement à l'espèce médaka, les difficultés d'approvisionnement en œufs de poisson zèbre et de xénope n'ont pas permis de générer des résultats valides et confirmés sur l'ensemble de la liste de substances de référence sur ces espèces.

Les meilleures performances du test utilisant les embryons de médaka ainsi que la robustesse des œufs de médaka et ses facilités d'approvisionnement dans nos conditions permettent de sélectionner le poisson médaka pour la poursuite de notre étude d'évaluation de criblage de la tératogénicité.

4. Étude de la spécificité du test utilisant les embryons de médaka

Comme cela a été décrit dans cette partie au Chapitre 2 : 2.2., la comparaison des trois tests sur une même liste de substances de référence a permis de sélectionner le test le plus sensible : celui utilisant les embryons de médaka. Sur l'ensemble de la liste de substances de référence, le test a une sensibilité modérée de 57,1 %. Cette valeur est due à l'exigence d'obtenir 100 % de spécificité du test pour ne pas éliminer à tort une substance négative dans une architecture de criblage des substances. L'objectif premier est d'éliminer avec certitude une substance ayant des effets tératogènes. Les substances tératogènes n'ayant pas été détectées à cette étape poursuivront leur évaluation et pourront être éliminées à une étape ultérieure. Pour obtenir ces 100% de spécificité, le seuil de l'IT est fixé à 2,5 pour ne pas détecter la substance de référence négative l'acide ascorbique, qui a obtenu une valeur de l'IT de 2,43.

En l'état et sur la base de nos 34 substances de références avec des résultats valides et confirmés, le test utilisant les embryons de médaka élimine avec certitude un peu plus de la moitié des substances tératogènes avec une mention de danger de reprotoxicité. Il élimine avec certitude un peu moins de la moitié de l'ensemble des substances tératogènes avec mention de danger ou une alerte de tératogénicité.

L'objectif de cette partie est d'équilibrer le nombre de substances de référence positives et négatives afin que l'IT calculé pour chaque substance contribue de manière équivalente au calcul de la spécificité et de la sensibilité du test. Pour cela, des substances hydrosolubles internes à L'Oréal pour lesquelles aucune alerte de tératogénicité n'a été obtenue, constituent la 4^{ème} et dernière catégorie de notre liste de substances de référence.

4.1. Ajout de substances de référence négatives

Jusqu'à présent, la liste de substances de référence est principalement constituée par des références positives pour mettre en évidence les capacités d'un organisme à reproduire les malformations observées *in vivo* (Tableau 46). Maintenant que l'organisme le plus robuste et le test le plus sensible associé ont été sélectionnés, la liste de substances de référence peut être complétée avec des références n'induisant pas de malformations. Cet ajout permet d'apprécier la spécificité du test, c'est-à-dire sa capacité à correctement prédire une substance de référence négative comme telle. Cet ajout permet d'équilibrer le nombre de substances de référence positives et négatives afin que l'IT calculé pour chaque substance contribue de

manière équivalente au calcul de la spécificité et de la sensibilité du test. En effet, pour l'instant dans la 1^{ère} condition d'analyse de performance, les références positives représentent 63,6 % des substances. Il faudrait idéalement ajouter 6 substances à la 3^{ème} catégorie de références pour avoir autant de substances positives que de substances négatives. Néanmoins, il est difficile d'obtenir des données d'innocuité, c'est-à-dire d'absence d'effets, sur les substances chimiques. Dans la 2^{ème} condition d'analyse de performance, le déséquilibre entre les références positives et celles négatives est encore plus important. En effet, les références positives représentent plus de $\frac{3}{4}$ des substances avec 76,4 %.

Tableau 46 : Proportion des substances de référence positives et négatives en fonction de la liste initiale et de la liste élargie ainsi que des conditions d'analyse de performance des tests

Références	Nombre	Catégorie	Nombre	Liste initiale		Liste élargie	
				1 ^{ère} condition	2 ^{ème} condition	1 ^{ère} condition	2 ^{ème} condition
Positives	26	1 ^{ère}	14	63,6%	76,4%	63,6%	60,4%
		2 ^{ème}	12				
Négatives	17	3 ^{ème}	8	36,4%	23,6%	36,4%	39,6%
		4 ^{ème}	9				

Le choix s'est alors porté sur 9 substances internes à L'Oréal pour lesquelles une absence d'effets tératogènes, de variation ou de maternotoxicité a été observée sur un test réalisé selon la ligne directrice OCDE n°414 (Étude de la toxicité pour le développement prénatal), même à la concentration la plus haute testée. Ces données sur rongeurs ont été générées avant mars 2013, date de l'interdiction du recours aux essais sur animaux de laboratoire pour l'évaluation des ingrédients cosmétiques. Ces substances, codées de LO1 à LO9, constituent la 4^{ème} catégorie de références. Cette dernière catégorie regroupe les substances ayant un résultat fiable d'absence d'effets tératogènes sur rongeurs. Cependant ces substances ne possèdent que cette donnée pour être classées dans cette catégorie. Par conséquent, cette donnée n'est pas confirmée par ailleurs.

L'intégration de la 4^{ème} catégorie de références permet d'obtenir une liste élargie. Cela modifie les proportions entre l'ensemble des références positives et l'ensemble des références négatives. Lors de la 2^{ème} condition d'analyse de performance du test, les références positives représentent un peu plus de la moitié des substances avec 60,4 %. Les proportions sont alors similaires à celles de la 1^{ère} condition d'analyse et un peu plus équilibrées entre les références positives et celles négatives. La contribution des ITs de chaque substance de référence positive ou négative est ainsi à peu près équivalente pour le calcul de la spécificité et de la sensibilité du test de tératogénicité utilisant les embryons de médaka.

Au total, la liste élargie comprend 43 références : 26 substances de référence positives avec des données de tératogénicité ou une mention de danger de reprotoxicité et 17 substances de référence négatives.

4.2. Résultats obtenus sur l'ensemble des substances de référence négatives

Les 9 nouvelles substances de référence négatives de la 4^{ème} catégorie ont été évaluées dans le test utilisant les embryons de médaka dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment. L'ensemble des résultats obtenus sur les 17 substances de référence de cette liste sont répertoriés dans le Tableau 47.

Tableau 47 : Résultats du test utilisant les embryons de médaka sur les substances de référence négatives

CAS #	Chemical name	Nombre total de tests	Nombre total de tests valides	CL 50 mg / l 9 jours	CL 50 mg / l 9 jours Intervalle de confiance à 95%	Test statistique	CE 50 mg / l 9 jours	CLE50 mg / l 9 jours Intervalle de confiance à 95%	Test statistique	IT
915-67-3	Amaranth	2	2	> 1000	NA	NA	> 1000	NA	NA	NA
62624-30-0	Ascorbic acid	4	2	118,7	(100,51-140,92)	Probit	48,76	(38,26-62,13)	TSK	2,43
123-99-9	Azelaic acid	3	1	167	(149,8-186,3)	TSK	> 1000	NA	NA	NA
64485-93-4	Cefotaxime sodique	2	2	> 1000	NA	NA	> 1000	NA	NA	NA
73384-59-5	Ceftriaxone	2	2	> 1000	NA	NA	> 1000	NA	NA	NA
15826-37-6	Cromolyn disodique	2	2	> 1000	NA	NA	> 1000	NA	NA	NA
139-05-9	Cyclamate sodium	2	2	> 1000	NA	NA	> 1000	NA	NA	NA
81025-04-9	Lactitol monohydrate	2	2	> 1000	NA	NA	> 1000	NA	NA	NA
LO1	Anthraquinone 1	2	2	73,8	(40,37-136,41)	Probit	> 1000	NA	NA	NA
LO2	Anthraquinone 2	4	1	77,16	(66,14-90,01)	TSK	42,61	(37,68-48,18)	TSK	1,81
LO3	Composé nitré 1	3	1	163,45	(146,89-182,02)	Probit	85,69	(81,57-89,59)	Probit	1,91
LO4	Composé nitré 2	2	2	> 1000	NA	NA	> 1000	NA	NA	NA
LO5	Composé nitré 3	2	2	> 1000	NA	NA	> 1000	NA	NA	NA
LO6	Composé phénolique 1	2	2	> 1000	NA	NA	> 1000	NA	NA	NA
LO7	Composé phénolique 2	3	1	997,01	(904,81-1230,85)	Probit	650,38	(623,53-677,00)	Probit	1,53
LO8	Dérivé d'aniline	2	1	472,59	(369,68-604,14)	TSK	> 1000	NA	NA	NA
LO9	Pyrazolone	3	1	48,79	(41,81-56,93)	TSK	37,75	(34,99-40,24)	Probit	1,29

NA : « Non Applicable ». TSK : Trimmed Spearman-Kärber.

Parmi la 4^{ème} catégorie de références, près de la moitié des références soit 4 substances ont obtenu des valeurs d'IT supérieures à 1,0 : l'anthraquinone 2 (1,81), le composé nitré 1 (1,91), le composé phénolique 2 (1,53) et la pyrazolone (1,29) (Figure 54). Ces valeurs d'IT supérieures à 1,0 signifient que quelques malformations ont été observées chez les embryons de médaka à des concentrations sublétales. Parmi la 3^{ème} catégorie de références, l'IT n'a pas pu être déterminé pour 7 substances car aucune malformation n'a été observée chez les embryons de médaka à aucune concentration testée. La dernière substance de cette catégorie, l'acide ascorbique, a obtenu une valeur d'IT égale à 2,4. Il s'agit de la valeur la plus élevée de l'ensemble des références négatives. Par conséquent, le seuil de l'IT reste fixé à 2,5 pour maintenir 100 % de spécificité.

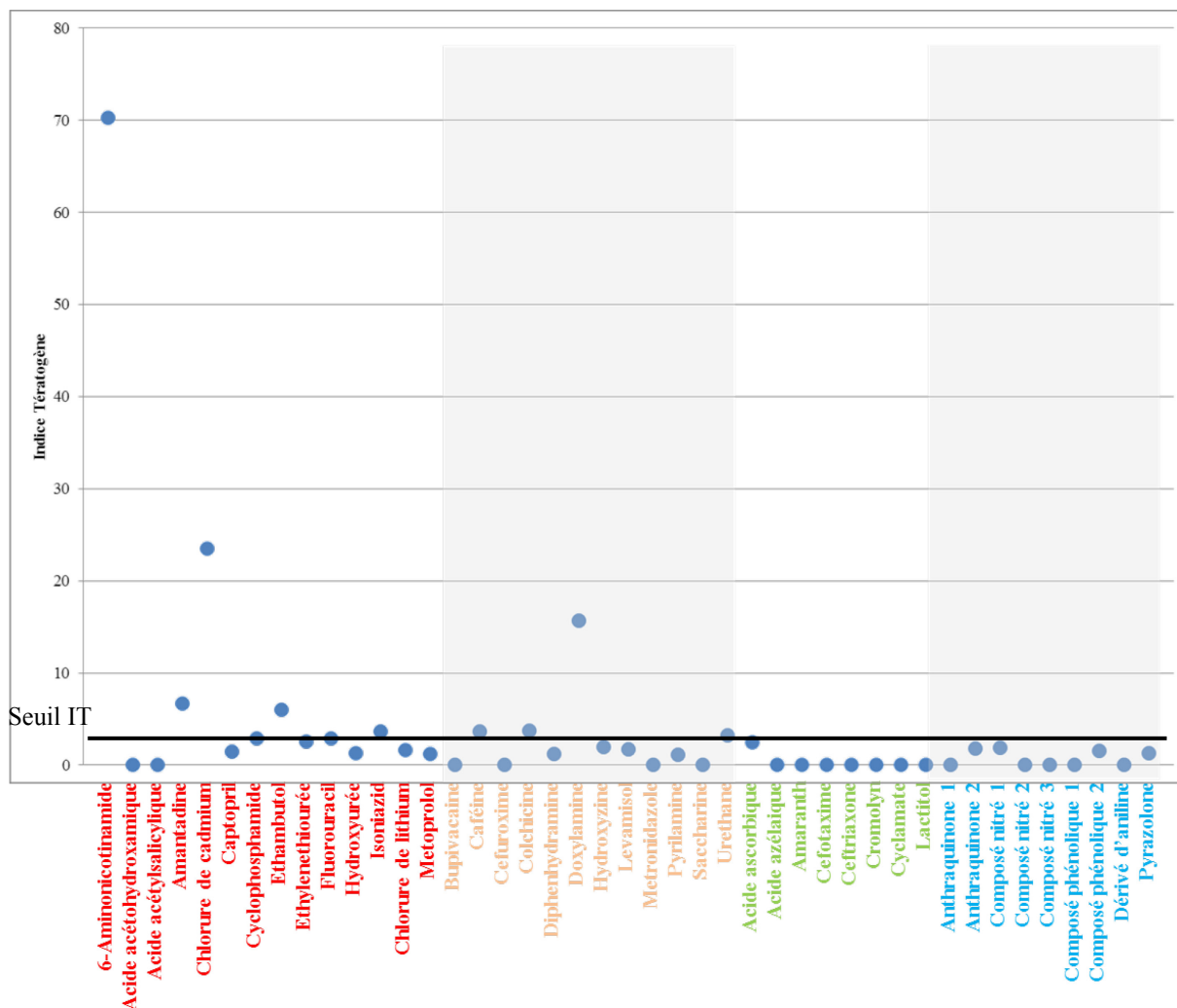


Figure 54 : Indices tératogènes des 43 références obtenus dans le test utilisant les embryons de médaka

Avec ce seuil, les performances du test ne sont pas modifiées : 57,1 % de sensibilité dans la 1^{ère} condition d'analyse et 46,1 % dans la 2^{ème} condition. Par contre, les contributions des ITs pour les calculs de spécificité et de sensibilité sont plus équilibrées.

Lorsque l'on observe l'ensemble des valeurs de CL50 pour les 43 substances de référence testées sur le médaka (Figure 55), plus de ¾ des substances positives de la 1^{ère} catégorie de références (78,6 %) ont obtenu une valeur de CL50. Un peu plus de la moitié substances positives suspectées d'être tératogènes de la 2^{ème} catégorie de références (58,3 %) ont obtenu une valeur de CL50. Enfin, ¼ des substances négatives de la 3^{ème} catégorie de références (25,0 %) obtiennent une valeur de CL50. Ceci semble indiquer que les substances tératogènes les plus fortes sont les plus létales. Or la valeur la plus faible de CL50 est obtenue avec la colchicine (2^{ème} catégorie de références positives) pour une valeur de 9,72 mg/L. Deux substances de la 1^{ère} catégorie, l'acide acétylsalicylique et le chlorure de cadmium, ainsi qu'une substance de la 3^{ème} catégorie la pyrilamine ont des valeurs de CL50 situées entre 10

et 100 mg/L. A l'inverse, les substances qui ont les plus faibles valeurs de CE50 n'obtiennent pas forcément les valeurs d'IT les plus élevées. Par exemple, la colchicine (2^{ème} catégorie de références positives) obtient « seulement » 3,71 de valeur d'IT avec une valeur de CE50 égale à 2,62 mg/L. Aussi, la doxylamine (2^{ème} catégorie de références positives) a une valeur de CE50 de 255 mg/L pour une valeur de l'IT supérieure à 15,64.

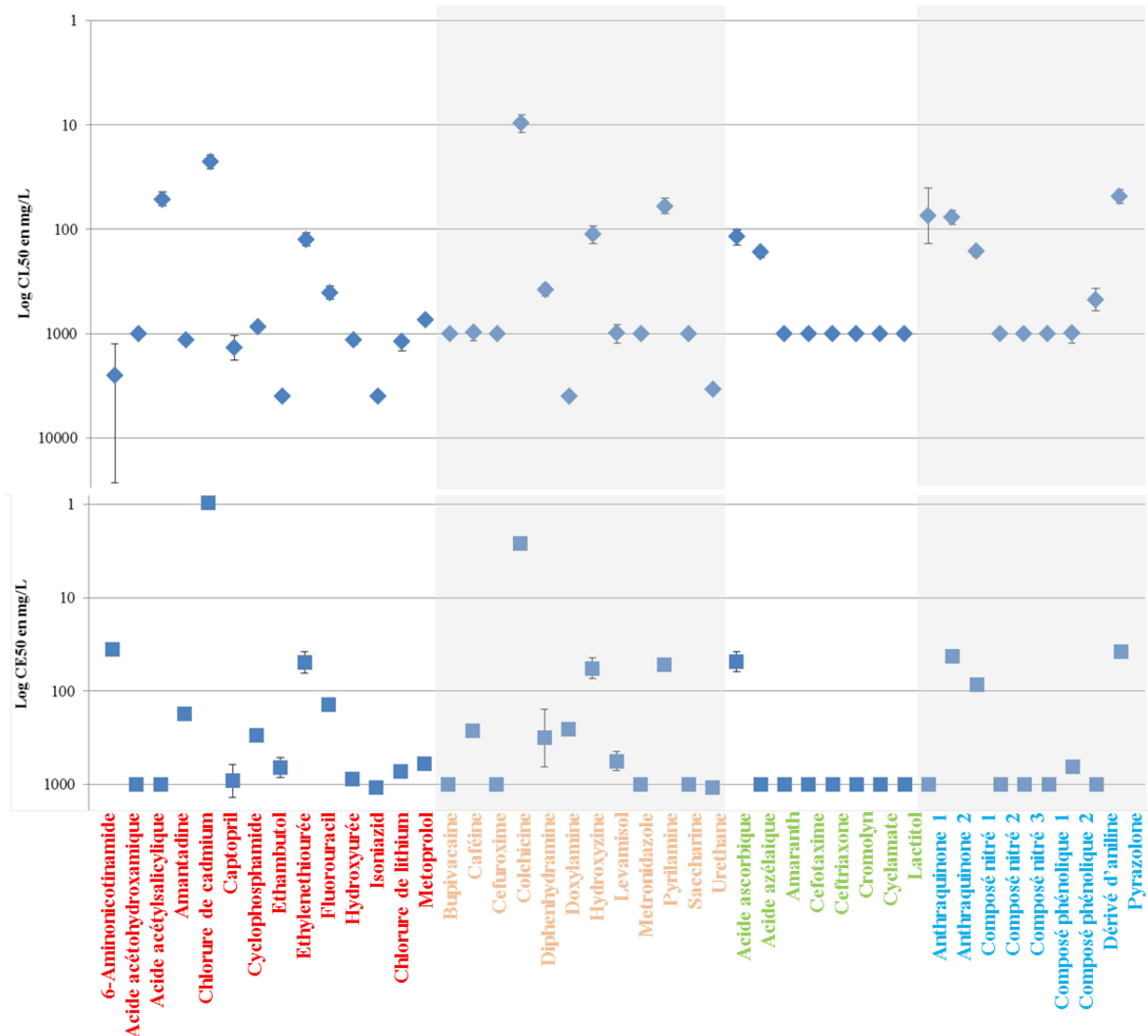


Figure 55 : Représentation graphique des valeurs de CL50 et de CE50 générées sur les 43 références dans le test utilisant les embryons de médaka

Les valeurs de CL50 et de CE50 sont exprimées en log10 et en ordre inverse pour faciliter la lecture et mettre en avant les effets létaux ou tératogènes.

Cette analyse des différentes valeurs de CL50 et de CE50 confirme l'importance d'avoir recours à un indice tératogène faisant le rapport de ces deux valeurs pour mettre en évidence le pouvoir tératogène d'une substance, qui n'est pas forcément lié à une valeur faible de CL50 ou de CE50.

Remarque : Ce test a fait l'objet d'un poster présenté lors du 4th Aquatic Animal Models for Human Disease (Durham, NC / USA) en janvier 2008 (Annexe V). A cette date, le seul critère de catégorisation des substances de référence externes à L'Oréal était la présence ou l'absence d'une mention de danger de reprotoxicité pour l'Homme dans les FDS de 2007. Les références internes sélectionnées par nos toxicologues avaient été alors évaluées non tératogènes par leur soin, sans que des données détaillées soient fournies sur le test. En conséquence, le nombre et la catégorisation des substances de référence divergent entre le poster de 2008 et ce manuscrit. Ces travaux ont également fait l'objet d'un autre poster présenté au 7th World Congress on alternatives and animal use in the life sciences (Rome, Italie) en septembre 2009 (Annexe VI).

L'évaluation du test utilisant les embryons de médaka sur une liste de substances de référence enrichie en substances de référence négatives ayant des données d'absence d'effets tératogènes chez le rat a permis d'apprécier sa capacité à correctement prédire négative une substance de référence négative. Parmi les 9 substances de référence internes à L'Oréal, 4 d'entre elles ont obtenu une valeur de l'IT, ce qui signifie que des malformations ont été observées chez les embryons exposés à ces substances. Ces valeurs se situent entre 1,29 et 1,91 en dessous du seuil de l'IT fixé à 2,5 pour maintenir 100 % de spécificité : toutes les substances de référence négatives sont correctement identifiées comme négatives. Par conséquent, les performances du test ne sont pas modifiées : 57,1 % de sensibilité dans la 1^{ère} condition d'analyse et 46,1 % dans la 2^{ème} condition. Par contre, la contribution des ITs de chaque substance de référence positive ou négative du test est maintenant à peu près équivalente pour le calcul de la spécificité et de la sensibilité du test de tératogénicité utilisant les embryons de médaka.

Dans ces conditions, si une substance testée a une valeur de l'IT supérieure à 2,5, elle sera suspectée d'avoir des effets tératogènes chez au moins une espèce de mammifères et d'obtenir une mention de danger H360D, H360FD, H361d, H361fd ou H410, H411, H412 et H413. Si sa valeur de l'IT est inférieure à 2,5, cela ne préjuge en rien de l'innocuité de la substance pour le développement des mammifères.

Troisième partie : Discussion

Pour déterminer la pertinence d'un test, il faut l'évaluer sur une liste de substances de référence spécifique à l'effet recherché. À cet effet, l'établissement d'une liste de substances tératogènes peut s'avérer ardu étant donné la complexité de l'évaluation de la tératogénicité. L'évaluation du risque d'une substance chimique pour les besoins réglementaires est réalisée sur des organismes modèles mammifères. Cependant, les tests utilisant ces derniers ne sont pas suffisamment prédictifs séparément ou associés pour identifier directement un agent tératogène. C'est le jugement d'expert du toxicologue qui aboutit à une mention de danger pour la reprotoxicité en rassemblant l'ensemble des données disponibles. Par conséquent, des divergences sur ces mentions de danger peuvent exister entre les différentes sources. Pour établir la liste de substances de référence de ce manuscrit, les critères de catégorisation des substances peuvent être discutés. Même une substance tératogène avec des données fiables et reproductibles de tératogénicité peut ne pas être identifiée comme ayant des effets tératogènes chez l'espèce sensible à son effet. En effet, plusieurs paramètres peuvent modifier les résultats de tératogénicité comme les conditions expérimentales, le choix et la mesure des malformations à identifier ou encore la méthode d'interprétation des effets tératogènes.

Les résultats de ce manuscrit montrent que le test de tératogénicité sur les embryons de médaka est pertinent et fiable pour l'évaluation des agents tératogènes. Les conditions fixées permettent d'identifier correctement et avec certitude un agent tératogène sur deux sur la base de la liste de substances de référence évaluées. Ce test peut être considéré comme un nouveau test d'écotoxicité aquatique chronique et un test de criblage alternatif à l'expérimentation animale.

Cependant les mesures d'effets de ce test pourraient être quantifiées et de manière automatisée pour les rendre objectifs et reproductibles dans n'importe quel laboratoire. Cette automatisation pourrait permettre d'ajouter de nouveaux paramètres d'effets et augmenter la sensibilité du test sans augmenter le coût ou la durée du test. Une fois le test optimisé, ses performances pourraient être à nouveau évaluées sur une liste élargie de substances de référence pour obtenir une meilleure représentativité des agents tératogènes. Le champ d'application du test pourrait être élargi à d'autres aspects de la reprotoxicité. Certaines perturbations endocriniennes de l'axe stéroïde sexuel (axes œstrogénique et androgénique) pourraient être intégrées par le recours à une lignée transgénique avec des

marqueurs fluorescents pour mettre en évidence des évènements clés menant à des altérations de la fertilité. Le test de tératogénicité utilisant les embryons de médaka reste un test de criblage d'exclusion et il doit être associé à d'autres outils pour procéder à l'évaluation non réglementaire de la tératogénicité voire de la reprotoxicité.

Chapitre 1 : Substance de référence tératogène ou non ?

Dans les conditions présentées précédemment dans les résultats, le test de tératogénicité utilisant les embryons du poisson médaka obtient une sensibilité modérée de 57,1 % dans la 1^{ère} condition d'analyse ne prenant en compte que les substances positives ayant une mention de danger de reprotoxicité pour l'Homme confirmée par une autre classification institutionnelle. Sa sensibilité globale, prenant également en compte les substances positives ayant uniquement des alertes de tératogénicité ou des mentions de danger non confirmées, est légèrement diminuée pour atteindre 46,1 %. Cette sensibilité modérée est due au seuil élevé fixé à 2,5 pour obtenir 100 % de spécificité. Cette particularité permet de cribler par exclusion des substances et d'avoir la certitude de détecter uniquement des substances tératogènes. Cette sensibilité s'explique par la présence de 14 Faux Négatifs sur les 26 substances de référence positives. Étant donné la complexité d'interprétation des données de tératogénicité, on peut alors se demander s'il s'agit bien tous de vrais Faux Négatifs.

L'évaluation du risque des substances chimiques est notamment basée sur des données issues des tests *in vivo* sur des organismes modèles mammifères. Les rats et les lapins sont les deux organismes classiquement utilisés. Les différences inter-espèces sont bien connues pour rendre difficile l'extrapolation d'un effet chez une espèce modèle à l'Homme. C'est pourquoi ces différents tests ne permettent pas de conclure directement sur l'innocuité ou sur les effets tératogènes d'une substance chimique pour l'Homme. Par conséquent, le toxicologue analyse l'ensemble des données disponibles dans la littérature scientifique, les bases de données ou encore les résultats de tests *in vitro* et *in vivo*. Pour un même agent tératogène, ce jugement, peut différer d'un expert à l'autre. Ceci explique qu'il existe des discordances entre plusieurs sources d'étiquetage, entre une mention de danger de reprotoxicité et les bases de données ou les résultats publiés dans la littérature. Au regard de l'ensemble des informations disponibles, il peut parfois être difficile de déterminer si la substance en question est tératogène ou non.

Sur la base des discordances d'informations, des choix ont été faits pour catégoriser les substances de référence de notre liste de validation de test. Une 1^{ère} catégorie de références regroupant les substances possédant au moins une mention de danger de reprotoxicité confirmée soit par une autre mention de danger de reprotoxicité soit par une alerte de tératogénicité. La 2^{ème} catégorie de références regroupe les substances possédant des alertes de tératogénicité sans mention de danger de reprotoxicité pour l'Homme. La 3^{ème} catégorie de références regroupe les substances pour lesquelles aucune alerte de tératogénicité n'a été identifiée dans nos sources d'information. Néanmoins, ces choix ne sont peut-être pas les plus adaptés. Par exemple, les critères de catégorisation des substances pourraient être plus restrictifs, ce qui entraînerait une modification des performances du test de tératogénicité utilisant les embryons de poisson médaka.

Mise à part la fiabilité des données de tératogénicité permettant la catégorisation des substances, d'autres paramètres intrinsèques au test d'évaluation ainsi que l'interprétation des résultats peuvent modifier les capacités d'un test à détecter correctement et de manière sensible une substance chimique tératogène.

1. Prédicativité des tests utilisant des organismes modèles mammifères d'effets tératogènes chez l'Homme

Les tests de tératogénicité pour la protection de la santé humaine sont classiquement réalisés sur des rongeurs (rats, souris, hamsters), sur des lagomorphes (lapins) et, dans le cas de certains médicaments, sur des primates non humains (macaques crabier, macaques rhésus, ouistiti commun). Ce sont tous des mammifères placentaires (euthériens) comme l'Homme. Ces organismes modèles ont un développement embryonnaire interne. Ils sont alors complètement dépendants de leur mère. Le placenta, avec le liquide amniotique et le cordon ombilical assurent des fonctions nutritive, respiratoire, excrétrice, endocrine et immunitaire. Toutes les espèces précitées, utilisées pour les tests de tératogénicité, possèdent un placenta hémochorial : c'est-à-dire que les villosités placentaires fœtales pénètrent jusque dans les vaisseaux sanguins maternels. C'est la barrière hémato-placentaire, qui sépare le sang maternel du sang fœtal. Elle protège le fœtus de la grande majorité des agressions extérieures (virus, bactéries, médicaments, substances chimiques, ...). Cependant, certaines substances chimiques peuvent traverser cette barrière et entraîner des malformations. Ces organismes

modèles semblent donc pertinents pour apprécier la capacité d'un agent tératogène à traverser la barrière hémato-placentaire.

Malgré cette particularité commune, les tests utilisant les rongeurs, les lagomorphes et les primates non humains ne prédisent pas parfaitement les effets tératogènes chez l'Homme. Dès 1983, Brown et Fabro ont analysé la concordance entre les données de tératogénicité humaines et celles sur animaux de laboratoire de l'US FDA et du Council on Environmental Quality (Tableau 48) (Brown & Fabro 1983). Cette étude est basée sur 38 substances tératogènes chez l'Homme et sur 165 substances pour lesquelles aucun effet malformatif n'a été rapporté chez l'Homme. Sur cette liste de substances de référence, les tests utilisant la souris obtiennent une sensibilité satisfaisante de 85 % pour une spécificité faible de 35 %, ceux utilisant le rat obtiennent une sensibilité de 80 % pour une spécificité modérée de 50 %, ceux utilisant le lapin obtiennent une sensibilité de 60 % pour une spécificité de 70 % et enfin ceux utilisant le singe obtiennent une sensibilité faible de 30 % pour une spécificité de 80 %. Les résultats obtenus montrent que la souris est l'organisme modèle le plus sensible aux malformations tout en identifiant une forte proportion de Faux Positifs. A l'inverse, le singe est peu sensible aux agents tératogènes chez l'Homme mais il est plus spécifique avec 80 % de prédiction correcte des références négatives. Séparément, les tests utilisant ces organismes modèles sont peu prédictifs et spécifiques d'effets tératogènes chez l'homme. En associant deux tests utilisant des espèces différentes ou plus, la sensibilité est augmentée mais la spécificité reste moyenne avec 50 %. Ceci signifie qu'une substance sans effet tératogène chez l'Homme est identifiée comme tératogène chez au moins un organisme modèle.

Tableau 48 : Concordance entre les données de tératogénicité humaines et celles sur animaux de laboratoire

Source : (Brown & Fabro 1983)

Human Teratogens*		Human Non-Teratogens†	
Test Species	% With Positive Response (Correct Positives)	Test Species	% With No Positive Response (Correct Negatives)
Mouse	85%‡	Mouse	35%
Rat	80%	Rat	50%
Rabbit	60%	Rabbit	70%
Hamster	45%	Hamster	35%
Monkey	30%	Monkey	80%
Two or more species	80%	Two or more species	50%
Any one species	97%	All species	28%

From USFDA.³

*38 compounds: "reports of birth defects in humans associated with intake."

†165 compounds: "for which human teratologic effects have not been reported."

‡From the published information, the exact meaning of an 85% response rate is not clear. It could mean, for example, 85% of the agents were positive in at least one mouse study, or of all tests of these agents in the mouse, 85% were positive.

En 2005, Bailey *et al.* ont fait une étude similaire de comparaison des prédictivités des tests utilisant des organismes modèles mammifères. Ils ont analysé les données de 11 groupes de substances tératogènes chez l'Homme issues de tests de tératogénicité réalisées sur les 5 espèces précitées en ajoutant 7 autres espèces modèles (chiens, chats, cochons, furets, cobayes, moutons et vaches) (Bailey *et al.* 2005). Ils obtiennent des résultats similaires soit une sensibilité moyenne des espèces de 61 %.

L'objectif des tests *in vivo* utilisant des organismes modèles mammifères est d'évaluer le risque qu'une substance soit tératogène chez l'Homme. Ils doivent participer à prouver l'innocuité d'une substance pour qu'elle puisse être mise sur le marché. Ceci implique de détecter tous les agents tératogènes c'est-à-dire d'obtenir une sensibilité de 100 %, quitte à éliminer à tort des substances sans effet tératogène. Dans ces conditions, une spécificité moyenne est acceptable. Les tests réalisés sur les rats semblent présenter les meilleures performances. En effet, ils ont la sensibilité la plus élevée comparée à celles des autres tests utilisant des organismes modèles mammifères, tout en conservant une spécificité à 50 % (une substance sans effet sur deux est à tort détectée comme tératogène). Même en combinant les tests réalisés sur chacune des 5 espèces, le 100 % de sensibilité n'est pas atteint (97 %). Cette absence de 100 % de sensibilité signifie que tous les agents tératogènes ne sont pas détectés par ces organismes modèles.

Comme cela a été cité précédemment, il existe plus de 1 500 agents pouvant induire des malformations congénitales chez l'animal mais seulement une quarantaine d'entre eux sont connus pour induire également des malformations chez l'Homme (Shepard 2010). Le plus souvent, un agent tératogène chez l'Homme l'est également chez au moins une espèce animale. L'inverse n'est pas vrai. Par exemple, la colchicine (médicament luttant notamment contre la fièvre méditerranéenne familiale) entraîne chez le rat, la souris et le hamster des malformations de la face et du système nerveux central (Ingalls *et al.* 1968; Petit & Isaacson 1976; Ferm 1963). Par contre, le suivi de 179 grossesses de femmes enceintes prenant de la colchicine n'a pas indiqué de risque augmenté de malformations par rapport aux 197 grossesses témoins (Ben-Chetrit & Levy 1998). De même, l'hydroxyzine (médicament antihistaminique) entraîne chez le rat des malformations du palais et du squelette (King & Howell 1966) alors qu'une étude prospective de 53 femmes ayant pris de l'hydroxyzine pendant leur grossesse n'a pas montré de risque augmenté de malformations (Einarson *et al.* 1997). La spécificité modérée de ces tests *in vivo* implique qu'une substance détectée tératogène chez l'animal n'est qu'une fois sur deux tératogène également chez l'Homme.

Cette démarche de l'évaluation du risque des substances chimiques pour montrer leur innocuité est la démarche inverse au test de criblage que nous voulons développer, qui doit être 100 % spécifique pour ne détecter que les substances réellement tératogènes.

La prédictivité partielle de ces tests *in vivo* peut s'expliquer par les différences génétiques ou toxicocinétiques (une des hypothèses, qui expliqueraient l'absence d'effets tératogènes de la Thalidomide chez la souris). Les différences anatomiques rendent également les comparaisons inter-espèces plus difficiles. Par exemple, les malformations de la queue, courantes chez ces espèces modèles, n'ont pas d'équivalent chez l'Homme. Elles peuvent tout de même indiquer des malformations générales du squelette.

La voie d'exposition de la substance lors d'un test sur l'organisme modèle peut elle aussi être différente de celle chez l'Homme. En effet, pour être certain de la dose d'exposition, la substance est parfois administrée par injection intrapéritonéale, en intraveineuse ou par sonde gastrique. Par exemple, l'acide acétohydroxamique (traitement des calculs rénaux) entraîne par voie intrapéritonéale chez le rat des défauts de fermeture du tube neural, des fentes labiales, des malformations des pattes et de la queue. Cependant ce médicament est prescrit chez l'Homme par voie orale à des concentrations 50 fois inférieures à celles du test chez le rat (Chaube & Murphy 1966). De plus, aucune donnée n'indique que ce médicament, couramment utilisé, soit également tératogène chez l'Homme. La pertinence de l'étude peut être questionnée tant sur la voie d'administration que sur la concentration testée.

La concentration testée est en effet déterminante dans l'apparition d'un effet tératogène. Or, dans la plupart des tests de tératogénicité, la dose testée la plus élevée doit provoquer des effets de toxicité chez les mères ou chez la progéniture. Ceci n'est pas toujours applicable à l'usage chez l'Homme (Shanks et al. 2009).

Les tests utilisant les organismes modèles mammifères, séparément ou en combinaison, permettent une prédiction partielle des effets tératogènes chez l'Homme. Les tests utilisant ces organismes ont une sensibilité entre 30 % et 85 % pour une spécificité modérée entre 35 % et 80 %. Ces performances ne permettent pas de conclure directement sur une substance testée. Les méthodes d'expérimentation (voie d'administration, concentration, ...) peuvent parfois ne pas être pertinentes par rapport à l'usage de la substance testée chez l'Homme. La pertinence des données de tératogénicité peut alors être remise en cause.

Pour valider une méthode alternative à l'expérimentation animale, il faudrait donc idéalement se baser sur des données humaines issues d'études épidémiologiques, d'études de

cas, etc... et non sur des données issues de ces organismes modèles mammifères. Bien évidemment, ces données humaines sont rarement disponibles.

2. Catégorisation des substances composant la liste de références

L'objectif du test développé dans cette étude est d'identifier les substances interdites dans les ingrédients cosmétiques (substances tératogènes chez l'Homme ou susceptibles d'obtenir une mention de danger de reprotoxicité) sans éliminer de manière erronée une substance sans effet tératogène.

Pour valider un test de tératogénicité, les substances de la liste de référence doivent être pertinentes : les références positives doivent avoir des données fiables d'effets tératogènes et les références négatives des données fiables d'absence d'effets tératogènes. Comme cela a été développé précédemment, il existe des discordances entre les différentes sources d'information concernant la tératogénicité d'une substance. Par conséquent, des critères ont été appliqués aux différentes substances sélectionnées pour les placer dans des catégories en fonction de la fiabilité de leurs données de tératogénicité. La 1^{ère} catégorie de substances de référence positives regroupe les substances ayant une mention de danger de reprotoxicité. La 2^{ème} catégorie de substances de référence positives regroupe les substances ayant des alertes de tératogénicité. La 3^{ème} catégorie de substances de référence négatives regroupe les substances n'ayant pas d'alertes de tératogénicité. La 4^{ème} catégorie de substances de référence négatives regroupe les substances n'ayant pas montré d'effets tératogènes dans un test *in vivo* de tératogénicité sur rongeurs.

Cette catégorisation selon les critères choisis entraîne l'identification de 14 Faux Négatifs chez les 26 substances classées comme positives. Ce nombre élevé de FN entraîne une sensibilité modérée du test de tératogénicité utilisant le médaka. Les critères de classement d'une substance dans une catégorie pourraient être modifiés pour que les données de tératogénicité soient confirmées par un maximum de sources d'information.

2.1. Critères de classement d'une substance dans la 1^{ère} catégorie de références

Parmi les 14 substances de référence de la 1^{ère} catégorie, 6 sont identifiées dans le test utilisant le médaka comme des Faux Négatifs. Pour 2 d'entre elles, l'acide acétohydroxamique et l'acide acétylsalicylique aucune malformation n'a été observée chez les embryons de médaka exposés (IT = 0). Pour 4 d'entre elles, le captopril (IT = 1,49),

l'hydroxyurée (IT = 1,31), le chlorure de lithium (IT = 1,66) et le métoprolol (IT = 1,23) des malformations ont été observées chez les embryons de médaka exposés. Cependant leurs valeurs de l'IT sont comprises entre 1,2 et 1,7, en dessous du seuil de l'IT fixé à 2,5.

Lorsque l'on regarde plus précisément les informations disponibles de l'acide acétylsalicylique et du chlorure de lithium, elles possèdent de nombreuses alertes de tératogénicité justifiant leur place dans la 1^{ère} catégorie. Néanmoins, elles ont un dossier REACH enregistré avec la mention « conclusive but not sufficient for classification » pour la mention de danger de reprotoxicité. Ceci signifie qu'au moins un test de tératogénicité a été conduit dans des conditions de qualité suffisante pour conclure à leur absence d'effet tératogène.

Il pourrait donc être pertinent d'ajouter un autre critère (présence de la mention spécifique « conclusive but not sufficient for classification » concernant la reprotoxicité dans le dossier REACH) pour déclasser une substance avec plusieurs alertes de tératogénicité de la 1^{ère} catégorie de références à la 2^{ème}. L'ajout de ce critère modifierait uniquement les résultats obtenus dans la 1^{ère} condition d'analyse de performance du test. Dans ce cas, l'acide acétylsalicylique et le chlorure de lithium ne seraient plus des Faux Négatifs de la 1^{ère} catégorie de références. La sensibilité de ce test serait donc augmentée passant de modérée avec 57,1 % à satisfaisante avec 60,0 %. Cette sensibilité est alors comparable à celle des organismes modèles mammifères. A la différence non négligeable que le test utilisant le médaka possède 100 % de spécificité pour permettre une prise directe de décision sur le criblage de la substance lorsqu'elle est identifiée comme ayant des effets tératogènes. Par contre, ces deux substances restent des FN de la 2^{ème} catégorie de références positives. Par conséquent, cela ne modifie pas les résultats de la 2^{ème} condition d'analyse de performance du test.

2.2. Critères de classement d'une substance dans la 2^{ème} catégorie de références

Cette 2^{ème} catégorie de substances de référence positives regroupe les substances les plus délicates à classer, celles ayant des alertes de tératogénicité dans au moins une des sources d'information sélectionnées. Cette classification est délicate car les alertes de tératogénicité utilisées n'ont pas toutes la même source ou la même qualité de données.

Parmi les 12 substances de référence de la 2^{ème} catégorie, 8 sont identifiées dans le test utilisant les embryons de médaka comme des Faux Négatifs. Parmi ces FN, la moitié obtient

des valeurs d'IT inférieures à 2,5 et l'autre moitié ne provoque aucune malformation dans nos conditions.

L'analyse globale des alertes de tératogénicité non institutionnelles sur l'ensemble des catégories indique que le DART scheme de l'OECD Toolbox, sur la liste de substances de référence, donne généralement une information sur la famille chimique de la substance et rarement sur la substance elle-même. Ceci entraîne des alertes de tératogénicité sur la quasi-totalité des substances de la 2^{ème} catégorie à l'exception de la saccharine. Par conséquent, cet outil ne semble pas être pertinent pour constituer une alerte de tératogénicité, même s'il s'agit d'un outil institutionnel. La base de données REPROTOX basée sur des publications scientifiques regroupe la grande majorité de celles utilisées dans l'étude bibliographique. Cependant REPROTOX apporte un jugement d'expert sur l'ensemble des données en comparant l'ensemble des tests. Contrairement à l'étude bibliographique moins exhaustive, REPROTOX va mettre en évidence les données générées dans une espèce qui n'ont pas pu être reproduites dans une autre étude. Ainsi, une alerte peut apparaître dans l'étude bibliographique et ne pas être confirmée dans REPROTOX comme dans le cas de la diphenhydramine (FN), de la doxylamine (VP avec une mention de danger H412 pour les espèces aquatiques) et du métronidazole (FN). Le catalogue Shepard apporte parfois des informations complémentaires à REPROTOX pour créer une alerte de tératogénicité. Par exemple, le chlorure de lithium et le 6 aminonicotinamide ne sont pas répertoriés dans REPROTOX mais sont présents dans le catalogue Shepard. Néanmoins, l'étude bibliographique reste pertinente lorsqu'une substance n'est répertoriée ni dans REPROTOX ni dans le catalogue Shepard comme dans le cas du chlorure de cadmium, du métoprolol et de l'acide ascorbique.

Parmi les alertes de tératogénicité non institutionnelles, la base de données REPROTOX semble la plus fiable et la plus complète, suivie du catalogue Shepard. En l'absence de données dans ces deux bases, l'étude bibliographique reste pertinente si elle est suffisamment exhaustive. Par contre, l'outil DART scheme ne semble pas être suffisamment spécifique à une substance pour être intégré dans nos critères de catégorisation des substances de référence.

Si ces modifications étaient apportées à notre liste, 6 substances (le cefuroxime, la diphenhydramine, le lévamisol, le métronidazole, le pyrilamine et la saccharine) ne seraient pas retenues dans la 2^{ème} catégorie de références positives et ne feraient donc pas partie de la liste de substances de référence. Or ce sont tous des Faux Négatifs dans le test utilisant les

embryons de médaka. Le test n'aurait alors dans la 2^{ème} catégorie de références positives que 2 FN, la bupivacaïne et l'hydroxyzine.

En cumulant les modifications de la 1^{ère} et de la 2^{ème} catégories de références positives, le test utilisant les embryons de médaka obtiendrait toujours une sensibilité modérée avec 60 % dans la 2^{ème} condition d'analyse de performance, prenant en compte l'ensemble des substances positives. Les performances ne seraient donc pas fondamentalement modifiées mais les différentes catégories seraient plus équilibrées les unes par rapport aux autres : 12 substances pour la 1^{ère} catégorie, 8 pour la 2^{ème}, 8 pour la 3^{ème} et 9 pour la 4^{ème}.

2.3. Critères de classement d'une substance dans la 3^{ème} catégorie de références négatives

La troisième catégorie regroupe les substances n'ayant aucune alerte de tératogénicité. Ce seul critère ne semble pas être suffisamment restrictif pour sélectionner des substances de référence négatives. En effet, une absence d'alerte de tératogénicité n'indique pas si un test de tératogénicité a été réalisé et si une absence d'effet tératogène a été observée. Sans ces données d'absence d'effets tératogènes, il n'est pas certain que ces effets n'existent pas. C'est le cas d'une seule substance de la 3^{ème} catégorie : l'acide ascorbique (Vitamine C). Il ne possède aucune alerte de tératogénicité dans nos sources d'information mais il ne possède pas non plus d'étude de tératogénicité disponible chez l'animal. Par ailleurs, les études cliniques n'ont apparemment pas révélé d'augmentation significative des effets malformatifs liés à l'acide ascorbique. Cependant ces données restent insuffisantes et le doute subsiste. Par principe de précaution, « l'utilisation de la vitamine C ne doit être envisagée au cours de la grossesse que si nécessaire » (Vidal 2014). Cette absence de données de tératogénicité pourrait expliquer que l'acide ascorbique ne soit listé ni dans la base de données REPROTOX ni dans le catalogue Shepard. En conséquence, cette substance ne semble pas pertinente pour être intégrée dans les substances de référence négatives.

Les critères de classement d'une substance dans la 3^{ème} catégorie de références (substance ne présentant aucune alerte de tératogénicité) pourraient être encore plus restrictifs en ne sélectionnant que les substances pour lesquelles une absence d'effets tératogènes a été démontrée.

L'ajout de ce critère entrainerait le retrait de l'acide ascorbique de la liste de substances de référence, qui est d'ailleurs la seule substance sans alerte de tératogénicité non institutionnelle. Or, le seuil de l'IT a été fixé à 2,5 pour ne pas détecter l'acide ascorbique

comme ayant des effets tératogènes. En l'absence de l'acide ascorbique (substance non pertinente comme référence négative), le seuil de l'IT du test utilisant les embryons de médaka pourrait être abaissé à 2,0 pour ne pas détecter le composé nitré 1 de la 4^{ème} catégorie et maintenir une spécificité de 100 %. Comme cela a été précisé précédemment, les substances de référence négatives de la 4^{ème} catégorie possèdent des données d'absence d'effet tératogène chez les rongeurs exposés à la dose la plus élevée. Dans l'absolu, la diminution du seuil de l'IT devrait augmenter la sensibilité du test en détectant des Faux Négatifs. Or, ce n'est pas le cas dans nos conditions : aucune substance de référence positive n'a obtenu une valeur de l'IT entre 2,0 et 2,5.

La suppression de l'acide ascorbique de la 3^{ème} catégorie à cause de son manque d'informations d'absence d'effet tératogène entraînerait la diminution du seuil de l'IT à 2,0 sans que cela modifie les performances du test utilisant les embryons de médaka.

Selon la catégorisation actuelle des substances de référence, le test de tératogénicité utilisant les embryons de poisson médaka identifie de manière erronée 14 substances classées positives comme n'ayant pas d'effets tératogènes (14 FN). Les critères utilisés de catégorisation ne semblent pas suffisamment restrictifs et les sources d'information trop variées. Ce résultat mène à regarder plus en détails l'ensemble des informations disponibles afin de déterminer celles les plus discriminantes, ainsi que d'ajouter des critères de catégorisation. Cette analyse permet également de déterminer si toutes les substances sélectionnées pour la liste de substances de référence sont pertinentes.

Un critère, pouvant être ajouté à ceux de la 1^{ère} catégorie de substances de référence positive, est l'exclusion des substances ayant la mention spécifique « conclusive but not sufficient for classification » pour la mention de danger de reprotoxicité dans un dossier REACH enregistré, malgré qu'elle possède plusieurs alertes de tératogénicité. Pour qu'une substance soit classée dans la 2^{ème} catégorie, une alerte de tératogénicité institutionnelle devrait être confirmée par une autre alerte dans la base REPROTOX ou le catalogue Shepard. La 3^{ème} catégorie de substances de référence négatives ne devrait contenir que des substances sans alerte de tératogénicité pour lesquelles au moins un test de tératogénicité a été réalisé démontrant une absence d'effet tératogène.

L'application de ces nouveaux critères de catégorisation ne remet pas en cause les comparaisons réalisées précédemment entre les trois espèces. En effet, les mêmes critères de

catégorisation ont été appliqués aux trois tests et permettent de mettre en évidence les différences de sensibilité entre ces tests. Cependant, avec l'application de ces nouveaux critères, le seuil de l'IT du test utilisant les embryons de médaka serait diminué à 2,0 et la sensibilité serait légèrement augmentée pour atteindre 60,0 % dans la 1^{ère} condition d'analyse de performance et 60,0 % dans la 2^{ème} condition. Le nombre de substances dans chaque catégorie de références serait également plus équilibré.

Plusieurs sources d'information de tératogénicité existent qu'elles soient réglementaires, institutionnelles, issues des bases de données ou encore de la littérature scientifique. Cependant, elles ne comportent pas toutes ni le même niveau d'information, ni la même qualité de la donnée de tératogénicité. Avec l'ensemble de ces informations, il n'est pas aisé de catégoriser une substance selon ses effets de tératogénicité. Il faut rester critique et prendre le temps nécessaire pour analyser chaque donnée ou alerte de tératogénicité avant de l'ajouter à une liste de substances de référence. Il faut alors se demander si la source d'information est fiable ? Est-ce que la donnée est de qualité ? Est-ce que cette donnée est confirmée par une autre ? etc... Comme démontré dans ce chapitre, la catégorisation des substances a un impact direct sur les performances d'un test.

3. Paramètres modifiant les résultats de tératogénicité

Comme pour les tests de tératogénicité utilisant des organismes modèles mammifères, l'espèce ainsi que la souche utilisées dans une méthode alternative à l'expérimentation animale vont modifier les résultats de tératogénicité. De manière plus générale, les conditions expérimentales peuvent également induire un biais dans l'apparition de malformations spontanées. Il est alors difficile de distinguer ces malformations spontanées dues aux conditions expérimentales de celles provoquées par l'exposition à la substance à tester. L'identification des malformations va également dépendre du type de malformations à rechercher ou du paramètre de mesure de chacune de ces malformations. Enfin la méthode et les critères d'interprétation des résultats de tératogénicité vont conditionner l'identification d'une substance tératogène. Voici quelques exemples directement liés au test de tératogénicité utilisant les embryons de poisson.

3.1. Conditions expérimentales

Comme tous les poïkilothermes, le métabolisme et la vitesse du développement embryonnaire des poissons sont directement dépendants de la température de leur environnement. Une récente étude a montré l'influence de la température d'incubation sur la viabilité, le taux d'éclosion et le taux de malformations spontanées chez les embryons du poisson zèbre (Figure 56) (Pype et al. 2015). La température optimale du développement embryonnaire est de 28,5°C (Kimmel et al. 1995). Lorsque la température d'incubation est élevée à 36,5°C, les embryons de poissons zèbre meurent quasiment tous entre 72 hpf (heure post fécondation) et 96 hpf. Par ailleurs, le taux d'éclosion est stimulé entre 30,5°C et 34,5°C avec un maximum à 32,5°C pour atteindre presque 100 %. Par contre, à 36,5°C, le taux d'éclosion est complètement inhibé. Comme les malformations morphologiques et fonctionnelles sont plus facilement observables sur les alevins que sur les œufs, il est donc courant d'augmenter la température d'incubation pour accélérer le développement embryonnaire. Or à partir de 32,5°C, des malformations spontanées de la queue apparaissent à une fréquence significative de 20 %. A 36,5°C, le taux de quasiment toutes les malformations est augmenté de manière significative. Pour le poisson zèbre, la température ne doit donc pas dépasser 32,5°C pour ne pas entraîner de malformations spontanées pouvant masquer celles induites par la substance à tester. Pour le médaka, une étude a déterminé que la température idéale pour le médaka est de 28°C (Rosemore & Welsh 2012). Lors de la mise au point de notre test sur les embryons de médaka, j'ai également déterminé la même température idéale de 28°C permettant l'obtention d'un taux d'éclosion optimal à J9 (~80 %) sans entraîner de surmortalité ou de malformations spontanées.

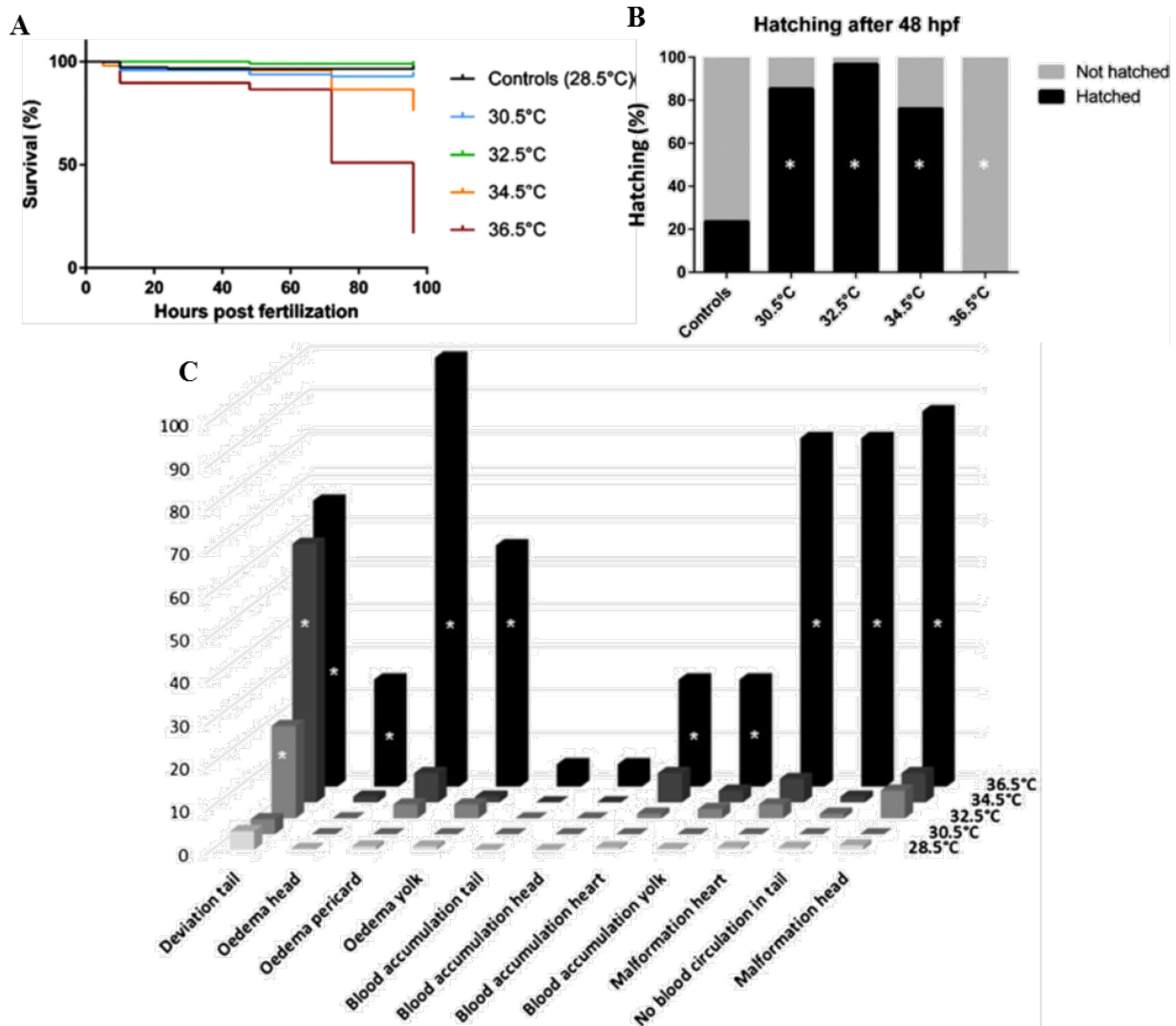


Figure 56 : Influence de la température d'incubation d'embryons de poisson zèbre sur leur viabilité (A), leur taux d'éclosion (B) et le taux de malformations spontanées (C)
Source : Pype et al. 2015

La densité d'individus peut également influencer le taux d'éclosion. Chez le médaka incubé à 28°C, le taux d'éclosion est optimum (83 %) lorsque les embryons sont placés individuellement dans des plaques de culture de 48 puits (Figure 57). Ce taux est légèrement diminué à 79 % lorsque les embryons sont placés par 2 et il chute à 5 % lorsque les embryons sont placés par 3 (Rosemore & Welsh 2012). Dans notre test de tératogénicité utilisant les embryons de médaka, 2 lots de 10 embryons ont été incubés dans des plaques de culture 6 puits contenant 10 mL de milieu par puits. Ces conditions correspondent à celles du test d'écotoxicité classique. La densité est ainsi d'1 embryon pour 1 mL.

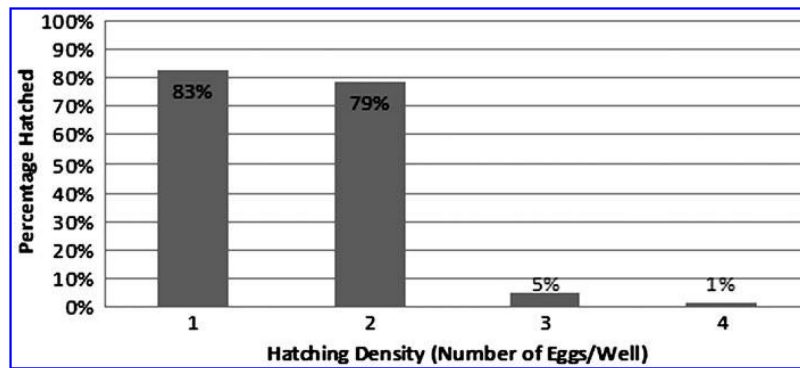


Figure 57 : Influence de la densité de culture des embryons de médaka, placés dans des plaques de culture de 48 puits, sur le taux d'éclosion

Source : Rosemore & Welsh 2012

La taille des puits influence également l'apparition spontanée de malformations. Par exemple, Selderslaghs *et al.* ont mis en évidence une corrélation entre l'augmentation du taux de malformations axiales et la diminution du diamètre des puits des plaques d'incubation (Figure 58) (Selderslaghs *et al.* 2009). En effet, au cours d'un essai, l'appauvrissement du milieu en oxygène ou en sels minéraux ou l'acidification du milieu par la respiration des embryons de poisson peuvent également entraîner l'apparition de malformations. Pour écarter ce biais, le renouvellement des milieux a été quotidien jusqu'à la fin du test (144 hpf). L'étude a montré que le pourcentage de déformations axiales est d'environ 7 % dans les plaques de culture de 24 puits, d'environ 19 % dans les plaques de culture de 48 puits pour atteindre 70 % dans les plaques de culture de 96 puits. Ce phénomène n'est pas clairement expliqué. Ceci peut être dû au recours à de petits volumes dans les plaques de culture à 96 puits : le milieu peut alors être rapidement dégradé (taux d'oxygène, acidification, etc...) pendant les 24 h entre 2 renouvellements de milieu. Le stress occasionné par cet espace restreint peut également être une explication.

Dans le test de tératogénicité utilisant les embryons de médaka, le taux d'éclosion pourrait être augmenté et le taux de malformations spontanées pourrait être diminué en plaçant individuellement les embryons dans 2 mL de milieu dans des plaques de culture de 24 puits. La densité serait alors divisée par 2. En dessous de 2 mL de milieu de culture, la température d'incubation de 28°C et la ventilation de l'enceinte climatique pourraient entraîner une trop forte évaporation du milieu entre 2 renouvellements et par conséquent, une modification de la concentration de la substance à tester. Néanmoins, ces nouvelles conditions pourraient également éviter les contaminations bactériennes pouvant entraîner la mortalité de la totalité des embryons d'un même puits. Avec une exposition individuelle des embryons, une seule lecture du test pourrait n'être nécessaire qu'à la fin du test.

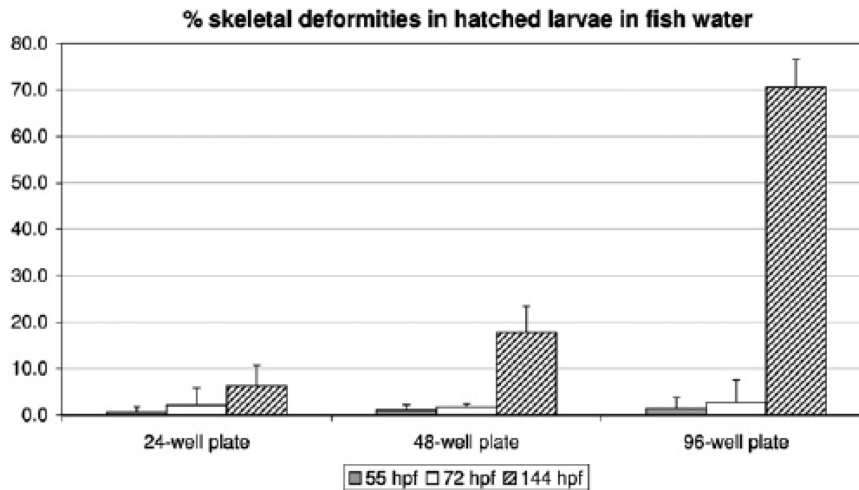


Figure 58 : Pourcentages moyens (N=3 tests) des alevins de poisson zèbre avec des déformations squelettiques en fonction de leur conditionnement en plaques de culture de 24, 48 et 96 puits, à 55, 72 et 144 heures post fécondation.

Source : Selderslaghs *et al.* 2009

L'étude de Selderslaghs *et al.* montre également l'influence du stade de développement des embryons au moment de l'observation des malformations : plus la recherche des malformations est tardive, plus des malformations sont facilement identifiables. Par exemple, les malformations du squelette sont observées chez 5 % des alevins 72h juste après l'éclosion. 72h plus tard, chez les mêmes alevins, les malformations du squelette sont observées chez 70 % d'entre eux (Selderslaghs *et al.* 2009). Ceci peut s'expliquer par le fait que juste après l'éclosion les déformations axiales peuvent être ambiguës car l'alevin est en train de se « déplier » de sa position dans l'œuf. Il peut alors garder une certaine courbure sans lien avec une malformation. Si cette même courbure est observée à 144 hpf, le doute ne subsiste plus et l'alevin peut alors être considéré comme ayant une malformation du squelette. Le test de tératogénicité utilisant les embryons de médaka pourrait être prolongé d'une journée ou deux pour éviter ces ambiguïtés. Il faudrait alors faire en sorte que l'ensemble des manipulations puissent être réalisées pendant des jours ouvrés.

Les conditions expérimentales (température, taille des puits, nombre d'individus par puits, stades de développement, etc...) peuvent donc grandement influencer l'apparition de malformations spontanées. Il est donc nécessaire de trouver les conditions optimales pour engendrer le minimum de malformations spontanées. Ainsi si le « bruit de fond » des malformations d'un test est quasi nul, l'apparition de malformations chez des organismes exposés à une substance sera plus facilement discriminée.

3.2. Choix et mesure des malformations à identifier

La conservation des grandes étapes du développement au cours de l'évolution permet d'observer chez les embryons de poisson des malformations similaires à celles observées chez l'Homme. Comme indiqué précédemment, les malformations les plus courantes chez l'Homme concernent le système cardiovasculaire. Certaines anomalies cardiovasculaires sont détectables chez les embryons de poisson comme des altérations du rythme (bradycardies, tachycardies, arythmies, ...) ou des hémorragies. Par contre, l'architecture du cœur est différente chez le poisson et chez l'Homme. Par conséquent, on ne peut pas parler de malformations identiques ou équivalentes. Cependant une malformation cardiaque chez le poisson pourra constituer une alerte pour l'Homme. Sur le même principe, certaines anomalies du système nerveux peuvent être observées chez le poisson comme une altération des capacités motrices ou une hyperactivité et constituer une alerte d'altération du développement du système nerveux chez l'Homme. Par contre, on ne parlera pas de retard mental ou d'autisme chez l'embryon de poisson. De manière générale, l'embryon de poisson semble être un modèle intéressant pour prédire certains effets tératogènes chez l'Homme. L'ensemble des organes et parties du corps de l'embryon de poisson peuvent être observés et, en fonction de la malformation identifiée, les résultats d'effets tératogènes obtenus dans un test de tératogénicité sur poisson peuvent constituer des alertes pour le développement chez l'Homme ou être directement prédictif d'un effet tératogène chez l'Homme.

Le nombre de critères d'évaluation de la tératogénicité pris en compte est très variable d'un test à l'autre. Par exemple, le test Zebrafish Embryo Culture (variante du ZET) compte 23 paramètres à identifier (Brannen et al. 2010). Certains de ces paramètres font l'objet d'une analyse subjective associée à une description comme pour le comportement et la pigmentation. Pour certains paramètres, un score est attribué selon la sévérité de la malformation. C'est le cas des malformations de la queue, du cœur ou encore du cerveau. Enfin pour d'autres paramètres, une mesure objective est réalisée comme par exemple une mesure de la longueur de l'alevin, de l'angle entre la tête et le tronc ou encore la fréquence cardiaque. Pour que le test de tératogénicité réalisé sur des embryons de médaka puisse être utilisé comme un test de criblage, seules les malformations évidentes et facilement observables avec un minimum de manipulation ont été prises en compte. Il s'agit dans notre test de détecter des malformations majeures physiques (anomalies du squelette, des yeux, de la tête, de la pigmentation, présence d'œdèmes et modification de la taille de l'alevin) mais aussi des anomalies fonctionnelles (nage non coordonnée, hyperventilation, modification du rythme cardiaque ou immobilité

anormale). Ces paramètres sont ceux les plus couramment utilisés dans les tests de tératogénicité sur les embryons de poisson (Brannen et al. 2010; Teixido et al. 2013; Weigt et al. 2011). Ces choix permettent de limiter le temps passé à l'observation des malformations ainsi que les différences d'interprétation entre différents manipulateurs n'ayant pas la même expérience des embryons du médaka. Comme l'objectif du test de criblage est uniquement d'éliminer une vraie substance tératogène quel que soit la malformation engendrée et quel que soit la sévérité de cette malformation, aucun score n'a été appliqué aux différents paramètres d'effet tératogène. Le résultat final du test de criblage est l'identification ou non d'un effet tératogène. D'autres paramètres pourraient être analysés dans notre test, cependant pour des raisons techniques nous avons choisi de les écarter. Cependant, le test reste évolutif et si de nouveaux paramètres plus pertinents sont identifiés et compatibles avec les exigences d'un test de criblage, ils pourraient être intégrés à notre test.

Le choix des malformations à identifier est également déterminant dans l'identification d'effets tératogènes. Par exemple, l'analyse des otolithes (concrétion minérale située dans le système vestibulaire de l'oreille interne des vertébrés, permettant notamment l'équilibre de l'organisme) est peu souvent intégrée dans les tests de tératogénicité utilisant le poisson. Or la mesure de la taille de chaque vésicule otique a permis à Ito *et al.* de mettre en évidence les effets tératogènes de la Thalidomide chez le poisson zèbre (Ito et al. 2010). Cependant, les vésicules otiques ne sont pas toujours évidentes à observer, cela dépend de la position de l'embryon mais aussi de l'éclairage de la loupe. Dans cette étude, sans l'observation de ce paramètre, la Thalidomide aurait été considérée comme un Faux Négatif (FN).

L'absence d'un paramètre pertinent pour une substance peut donc entraîner son identification comme FN dans le test. Parmi les FN du test utilisant le médaka, l'ajout d'autres paramètres auraient peut-être permis d'identifier certains d'entre eux. Par exemple, la prise de captopril (ACE inhibiteur, substance de la 1^{ère} catégorie de référence positive) entraîne chez l'Homme des atteintes rénales ainsi que des malformations des os du crâne (Burrows & Burrows 1998). Chez le rongeur, il entraîne essentiellement des retards de croissance ainsi que des retards d'ossification (Al-Shabanah et al. 1991). Dans nos conditions, le captopril entraîne également des modifications de la taille des alevins de médaka ainsi que des déformations axiales. Sa valeur d'IT est de 1,49 inférieure au seuil de 2,5 fixé pour le test. La mesure de paramètres supplémentaires pourrait permettre d'augmenter la sensibilité du test. Par exemple, une double coloration des alevins de médaka avec du rouge d'alizarine S pour le squelette et avec du bleu alcian pour le cartilage permettrait de mettre en évidence un retard d'ossification (Figure 59) (Strecker et al. 2013). Le captopril pourrait ainsi obtenir une valeur

de l'IT supérieure à 2,5. Il ne serait plus identifié comme un FN dans le test utilisant les embryons de médaka. Cependant, cette technique de coloration du squelette n'est à ce jour pas compatible avec les exigences de rapidité (plus de 72h sont nécessaires pour obtenir la coloration des alevins) et de faible coût d'un test de criblage.

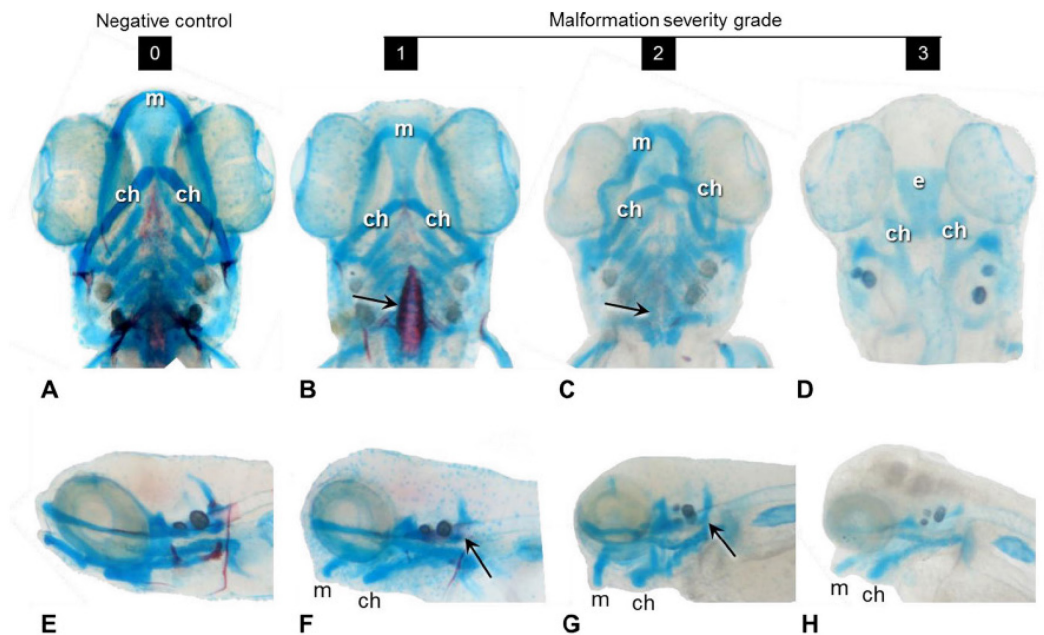


Fig. 8 Photomicrographs of zebrafish larval heads: **a–d** ventral and **e–h** lateral view. **a** and **e** 144-h-old larvae from negative controls with normal development (severity, 0); **b** and **f** illustrate larvae with slight malformations (severity, 1); **c** and **g** examples of strong malformations (severity, 2); and **d** and **h** very strong malformations or even lack of detectable skeletal elements (severity, 3). In **a** and **e**, all cartilages and bones appear normally shaped and developed. In **b** and **f**, Meckel's cartilage (*m*) is smaller and misshapen. The position of the ceratohyals (*ch*) and the angle between the two ceratohyals is modified. The *arrow* (see also in **f**) indicates a more ossified notochord front in **b** and a less

strongly ossified notochord front in **f**. A more ossified notochord tip is often observed after disulfiram exposure. The embryos in **c** and **g** show severe malformation of the entire pharyngeal skeleton (Meckel's cartilage and ceratohyals) and a lack of ossification of the notochord tip (*arrow*). The embryos shown in **d** and **h** are strongly malformed: In **d**, the pharyngeal skeleton is completely absent, and the neurocranium is also strongly deformed, but still detectable (*e* ethmoid plate; *t* compressed trabeculae cranii). In **h**, parts of the pharyngeal skeleton are visible, but all elements were categorized severity 3 (from Strecker et al. 2013)

Figure 59 : Mise en évidence de différents degrés de sévérité de malformations squelettiques chez des alevins de poisson zèbre mis en évidence par coloration

Source : Strecker et al. 2013

Le captopril, en tant qu'ACE inhibiteur, diminue la pression sanguine. La recherche d'anomalies cardiaques par l'analyse d'images ou d'une séquence vidéo pourrait permettre d'identifier la captopril comme un Vrai Positif. Dans cette perspective, le type d'anomalie cardiaque choisi serait également déterminant pour l'identification d'effets tératogènes. En effet, le résultat pourrait être différent en fonction du paramètre mesuré : malformation structurelle, volume sanguin, fréquence cardiaque (nombre de battements par minute), rythme cardiaque (mesure qualitative des différentes phases du rythme), etc... (Mohanty & Boettger-Tong 2005; Bugel et al. 2014; Nguyen et al. 2008). En fonction du type de mesure d'anomalies cardiaques (Figure 60), le stade de développement des embryons modifie le résultat. Par exemple, la fréquence cardiaque du poisson zèbre est d'environ 140 battements par minute (bpm) à 2 jpf et atteint près de 190 bpm à 4 jpf. Le seuil appliqué à ces paramètres pour définir à partir de quelle valeur ce paramètre diffère significativement du groupe témoin ou des données historiques (1, 2 ou 3 SD par exemple) va également influencer le résultat. De plus, le choix du type de mesure d'anomalies cardiaques est également déterminant. Par exemple, la fréquence cardiaque est elle aussi influencée par nombreux paramètres comme le stress ou des changements d'environnement par exemple. Par conséquent, ce type de mesure nécessite des conditions standardisées pour rester spécifique de la détection d'une anomalie cardiaque et pour être fiable. Pour ces différentes raisons, une modification significative de la fréquence cardiaque par rapport au groupe témoin ne peut consister qu'une alerte de tératogénicité. En effet, la modification de la fréquence cardiaque peut également être indicative d'une altération du système nerveux parasymphatique. Par contre, la détection d'une anomalie de structure du cœur chez le poisson permet bien de mettre en évidence un effet tératogène ciblant le système cardiovasculaire. Ceci pourrait être indicatif de potentielles malformations cardiaques chez l'Homme même si les structures du cœur du poisson et de l'Homme sont différentes.

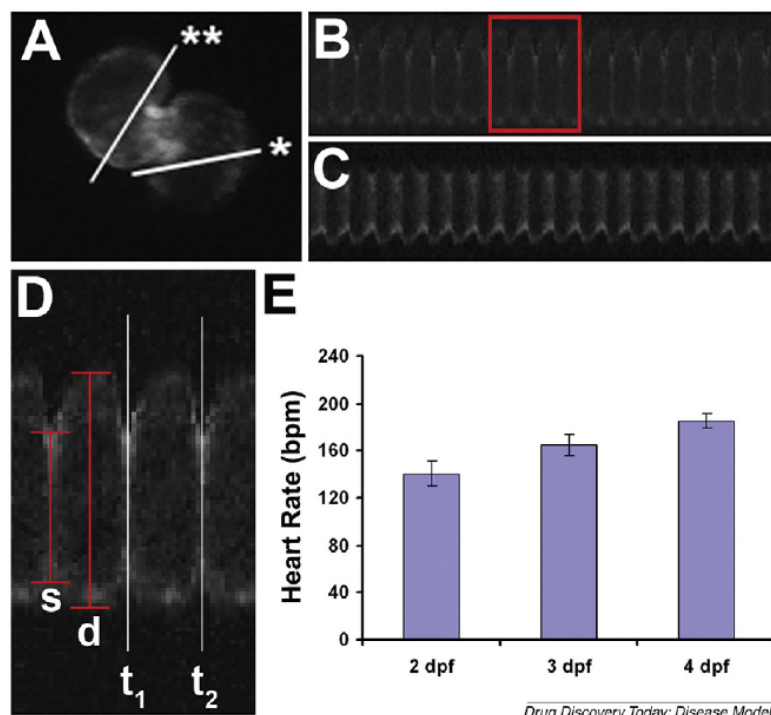


Figure 1. zCAS analysis for embryonic fish cardiac function. **(A)** *Tg(mlc2:GFP)* heart of 2 dpf zebrafish embryo. Asterisk and double asterisk mark regions of the atrium and ventricle scanned. **(B)** Representative atrial cardiac contraction profile. **(C)** Representative ventricular cardiac contraction profile. **(D)** Magnified view of atrial contraction from (B). Heart rate determined by measuring time between two systolic phases, t_1 and t_2 . d , end-diastolic diameter; s , end-systolic diameter. **(E)** Heart rate measured by the zCAS program during fish development. dpf, days post fertilization.

Figure 60 : Exemples d'analyse des fonctions cardiaques chez les embryons de poisson zèbre

Source : Nguyen et al. 2008

Les anomalies du système nerveux sont le troisième type de malformations congénitales chez l'Homme. Par conséquent, l'analyse comportementale des alevins serait un paramètre pertinent à ajouter au test pour augmenter sa sensibilité. Comme pour la mesure d'anomalie cardiaque fonctionnelle, l'identification d'une altération du comportement n'est pas forcément spécifique à l'exposition à une substance neurotoxique mais pourrait également permettre d'identifier d'autres altérations. En effet, le comportement est influencé par de nombreux facteurs comme l'environnement mais aussi des malformations du squelette ou encore d'organes internes comme le cœur ou les reins.

Différents comportements sont observables chez les alevins de poisson (Tableau 49) (Ahmad et al. 2012). Certains peuvent être induits par un stimulus tactile ou lumineux ou encore par un mouvement.

Tableau 49 : Différents types de comportements observables chez les alevins de poisson zèbre*Source : Ahmad et al. 2012*

Behaviour	Time	Stimulus	Reference
Coiling	17-21 hpf	None	Saint-Amant & Drapeau (1998); Brustein et al. (2003); Downes & Granato (2006); McKeown et al. (2009)
Touch-induced escape response	22-27 hpf	Touch	McKeown et al. (2009); Chen et al. (2012); McClenahan et al. (2012)
Evoked swimming	27 hpf until hatching	Touch	Saint-Amant & Drapeau (1998); Low et al. (2012)
Photomotor response	30 hpf	Light intensity	Kokel et al. (2010)
Optokinetic response (OKR)	73-80 hpf	Moving objects	Qian et al. (2005a,b); Rinner et al. (2005); Brockerhoffn (2006); Huang & Neuhauss (2008)
Optomotor response	5 dpf	Moving objects	Krauss & Neumeyer (2003); Maaswinkel & Ti (2003); Orger & Baier (2005); Creton (2009)
Shadow response	8 dpf	Approaching object	Kimmel et al. (1974); Watkins et al. (2004)
Turning behaviour	6-9 dpf	Touch, approaching object, sudden change of light conditions, sound	Budick & O'Malley (2000); McClenahan et al. (2012)
Prey capture	9 dpf	Prey	Budick & O'Malley (2000); Lorent et al. (2001); McElligott & O'Malley (2005); McClenahan et al. (2012)

Le comportement des alevins peut être quantifié par la mesure de différents paramètres (Figure 61), comme la distance parcourue (Chiffre et al. 2014), la vitesse de la nage, par le temps passé dans une zone particulière (Blaser & Peñalosa 2011) ou encore le mouvement des yeux (Ben-Simon et al. 2009).

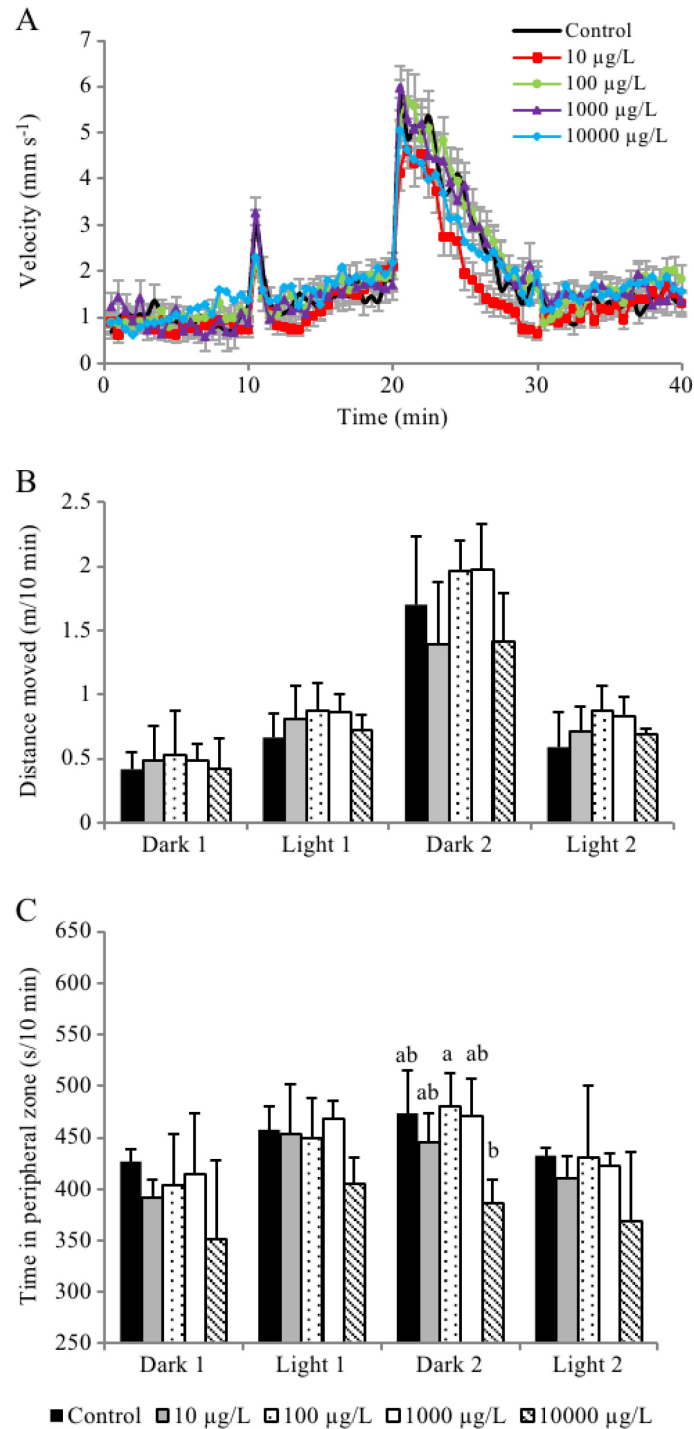


Fig. 1 Photomotor response of medaka larvae exposed for 72 h to valproate. Larvae were video-tracked during two sequences of 10-min light and 10-min dark. **a** Velocity, **b** distance moved and **c** time in the peripheral zone calculated for each 10-min light or dark period. The legend in **c** corresponds to the three panels. Values are reported as mean \pm SEM ($N=30$) for velocity and mean \pm SD ($N=30$) for distance and time spent in the peripheral zone. *Different letters* indicate significant differences (RM-ANOVA and Newman–Keuls tests or ANOVA and Tukey’s tests; $p < 0.05$), while no letter was added when no significant difference was observed

Figure 61 : Exemples d’analyse du comportement chez des alevins de médaka par mesure de vitesse (A), de distance parcourue (B) et de temps passé dans une zone (C)

Source : Chiffre et al. 2014

Il existe de nombreux protocoles pour évaluer le comportement des embryons de poisson zèbre (Figure 62). Or les résultats obtenus varient en fonction du protocole utilisé. Aussi, les résultats obtenus dépendent de la souche d'embryons utilisée (Vignet et al. 2013), du stade de développement (de Esch et al. 2012) mais aussi en fonction des conditions d'élevage (Zellner et al. 2011) ou de l'heure de la mesure (MacPhail et al. 2009).

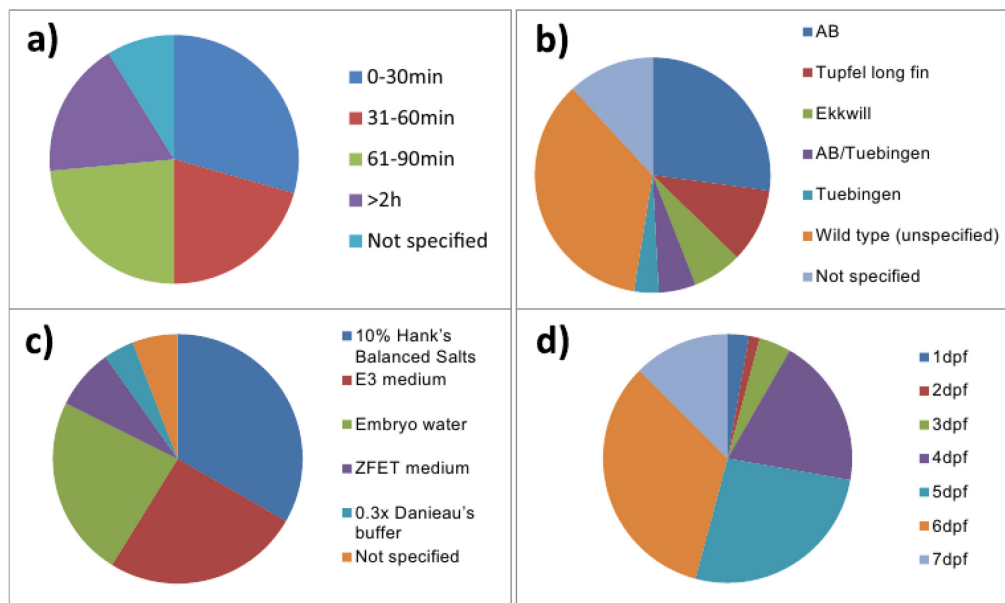


Figure 62 : Diversité des paramètres des différents tests d'analyse du comportement utilisant le poisson zèbre a) durée de la mesure b) lignée utilisée c) milieu de culture d) stade de développement
Source : Legradi et al. 2014

Au niveau du comportement, il existe une différence majeure entre le poisson zèbre et le médaka. Juste après l'éclosion, l'alevin de médaka est capable d'une nage active. Ce n'est pas le cas de l'alevin de poisson zèbre, qui éclot à un stade de développement plus précoce. Par conséquent, il va rester plusieurs heures après son éclosion au fond du puits jusqu'à 120 hpf avant d'avoir une nage active (Figure 63) (Braunbeck et al. 2014; Legradi et al. 2014). Contrairement au poisson zèbre, l'analyse du comportement peut être réalisée juste après l'éclosion chez le médaka.

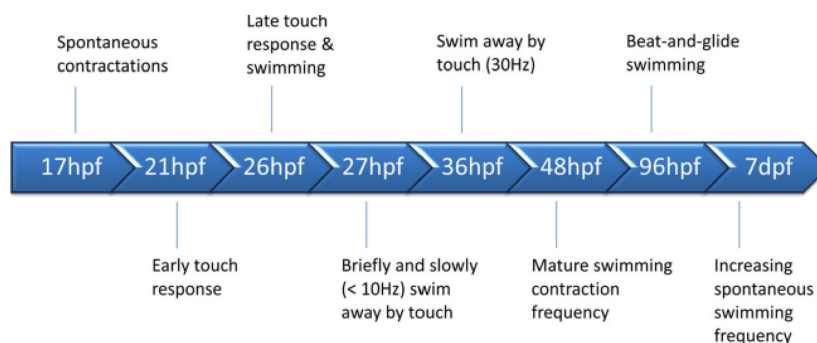


Figure 63 : Évolution du comportement des alevins de poisson zèbre en fonction du nombre d’heures post fertilisation

Source : Legradi et al. 2014

En 2013, une étude a montré qu’une anomalie du comportement (nage ou réponse au toucher) était positivement corrélée avec la présence d’anomalies du développement embryonnaire (anomalies cardiovasculaires, malformations physiques majeures et malformations des organes internes) (Figure 64). L’analyse comportementale pourrait au-delà de la détection d’une altération du système nerveux central également détecter d’autres malformations difficiles à observer comme les malformations des organes internes, des reins par exemple.

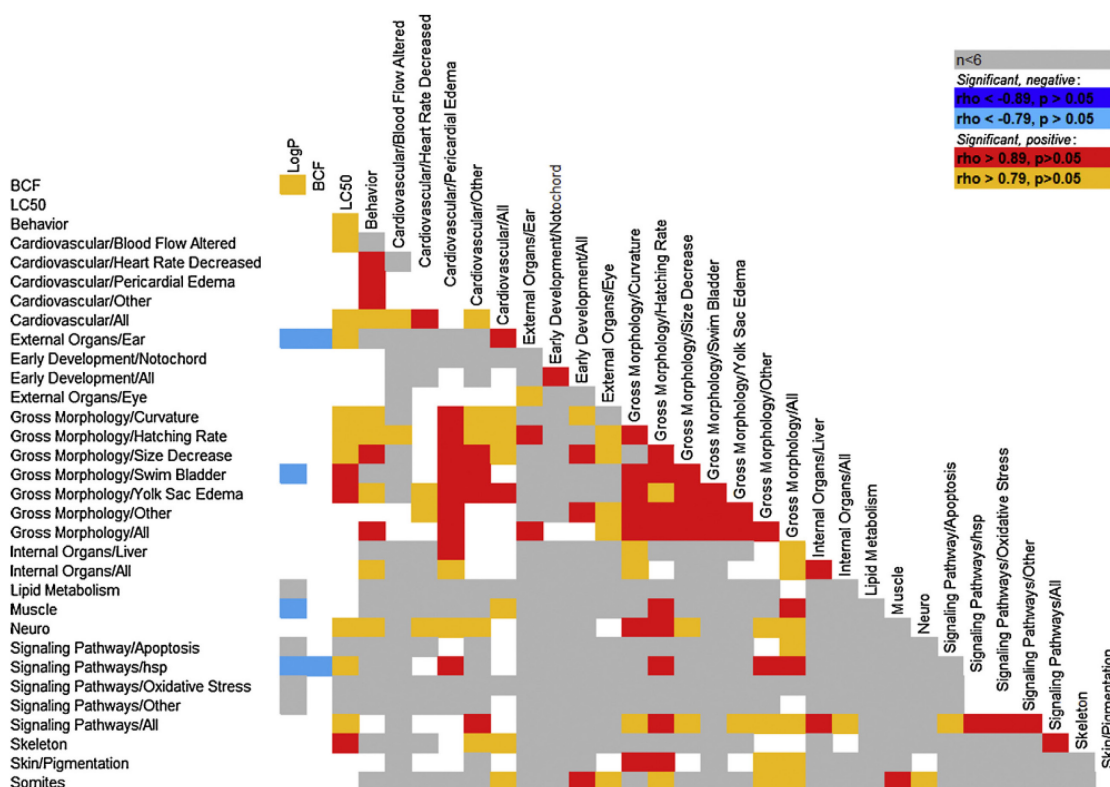


Fig. 3. Spearman correlation plot comparing zebrafish toxicity endpoints. Statistically significant correlations between individual zebrafish toxicity endpoints were determined by Spearman analysis. Highlighting of intersections indicate statistical significance ($p < 0.05$). Intersections marked with red highlighting are positively correlated with $\rho > 0.89$, orange are positive with $\rho > 0.79$, dark blue are negative with $\rho < -0.89$ and light blue are negative with $\rho < -0.79$. Gray formatting indicates that less than 6 chemicals overlapped between the two outcomes. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

Figure 64 : Corrélation entre les différents critères d’effets tératogènes chez le poisson zèbre

Source : Ducharme et al. 2013

Ainsi, l'analyse comportementale pourrait permettre la détection de certains Faux Négatifs du test de tératogénicité utilisant les embryons de médaka, connus pour perturber le système nerveux chez les rongeurs. Par exemple, une exposition à l'hydroxyurée (IT = 1,31) ou au chlorure de lithium (IT = 1,66) entraînent notamment des atteintes du système nerveux central chez le rongeur (Chaube & Murphy 1968; Giles & Bannigan 2006). Une exposition au métoprolol entraîne des atteintes des muscles squelettiques chez le rat par voie orale (données issues de la FDS de chez SIGMA-ALDRICH). Comme l'analyse comportementale permettrait également de détecter des malformations majeures physiques, des malformations des organes internes ou encore des anomalies cardiaques, cette identification d'une malformation fonctionnelle pourraient détecter de manière indirecte d'autres FN du test.

L'ajout de ces nouveaux paramètres (l'analyse de la fréquence cardiaque ou du comportement) permettrait d'augmenter la sensibilité du test de tératogénicité utilisant les embryons de médaka en diminuant le nombre de FN identifiés. A l'heure actuelle, le test intègre une seule mesure quantitative des malformations (taille des alevins). Par conséquent, il serait intéressant d'étendre ces mesures quantitatives à l'ensemble des paramètres d'effet précités par analyse d'images de chaque médaka à la fin du test. Cette objectivation des paramètres d'effet permettrait de gagner en précision des mesures notamment pour l'analyse de la fréquence cardiaque et de l'analyse comportementale. Elle permettrait également de rendre le test plus reproductible. En effet, les résultats ne seraient alors plus dépendants de l'expérience de l'opérateur et pourraient être reproduits dans d'autres laboratoires.

Le choix des malformations à identifier, leur nombre ainsi que le type de mesures influencent directement les résultats de tératogénicité. Ces résultats peuvent ensuite être interpréter selon différentes méthodes.

3.3. Méthode d'interprétation des effets tératogènes

L'analyse des observations réalisées sur les embryons de médaka est traduite par le calcul de l'indice tératogène (CL50 / CE50). Le seuil au-dessus duquel une substance est considérée comme tératogène est fixé à 2,5 pour obtenir 100 % de spécificité selon la liste de substances de référence.

L'indice tératogène est couramment utilisé dans les tests de tératogénicité (Teixido et al. 2013; Brannen et al. 2010; Weigt et al. 2011; Barjhoux et al. 2014; Strecker et al. 2013; Ducharme et al. 2013; Selderslaghs et al. 2012). Cet indice est adapté à l'évaluation du danger d'une substance dans un test de criblage. Il peut s'exprimer de différentes manières, comme

en faisant le rapport entre la CL50 et la CE50 ou encore entre la CL25 et la NOAEC (Brannen et al. 2010). Le premier rapport CL50 / CE50 est la méthode la plus courante mais aussi la plus contraignante car elle nécessite d'utiliser plus de produit et de concentrations. En effet, cet IT dépend de la gamme de concentrations testées, qu'il est possible de réaliser. Pour les substances peu solubles dans les conditions expérimentales, les concentrations ne pourront pas par exemple être augmentées pour atteindre les 100 % de mortalité. L'IT n'est alors pas déterminé. Le deuxième rapport CL25 / NOAEC s'apparente plus à une démarche d'évaluation du risque (exposition à un danger) avec des paramètres similaires à ceux exigés par le règlement REACH. En effet, la mesure de la NOAEL est requise pour les tests sur rongeurs à partir de 10 tonnes de substances chimiques mises sur le marché européen par an. La mesure de la CE10 est requise sur les tests réalisés sur les espèces aquatiques à partir de 100 tonnes de substances chimiques commercialisées par an. D'autres indices ont été développés comme le « dorsal and axis index » et le « index of axis deficiency » (Kao & Elinson 1988; Hu et al. 2015) pour intégrer des scores de sévérité de malformation ou encore le ratio de « adult/developmental (A / D) toxicity » pour comparer aux données chez l'adulte (Brown, 2002). Leur utilisation, essentiellement dans le test FETAX, est plus anecdotique et pas adaptée à nos conditions.

Une autre méthode d'analyse des résultats d'effet tératogène existe bien qu'elle soit moins répandue. C'est l'approche de la dose de référence (BMD). Elle est basée sur la forme de la courbe dose-réponse et sur les marges de sécurité. Il s'agit d'une démarche d'évaluation du risque. Cette démarche permet de déterminer une concentration à laquelle un changement pertinent de morphologie normale peut être attendu. La dose de référence de tératogénicité est généralement définie entre 5 et 10 % d'apparition de malformations chez les individus exposés à la substance.

Les valeurs de l'IT dépendent aussi de la méthode de calcul de la CL50 et de la CE50. Ces dernières sont classiquement calculées dans les tests de toxicologie et d'écotoxicité avec le log Probit et à défaut par le Trimmed Spearman Karber (TSK) (Stadler 2011). Elles peuvent également être calculées grâce à l'équation de Hill. Suivant la méthode de calcul utilisée, les valeurs ne seront pas exactement identiques.

Les valeurs de CL50 et de CE50 du test de tératogénicité utilisant les embryons de médaka ont été calculées de la manière la plus répandue avec la méthode de calcul de régression log Probit. Quand les conditions de validité de cette méthode n'étaient pas remplies, la méthode Trimmed Spearman Karber a été utilisée. Notre démarche se caractérise essentiellement par la fixation du taux de spécificité à 100 %. Cette contrainte entraîne

généralement une diminution de la sensibilité du test, ce qui est l'inverse de la démarche des tests de tératogénicité d'une évaluation du risque, ayant pour objectif de déterminer l'innocuité d'une substance. Par conséquent, un test 100 % spécifique va identifier moins de substances ayant des effets tératogènes mais celles identifiées le seront de manière certaine. Le test de criblage basé sur l'évaluation du danger permet ainsi de prendre une décision sur l'exclusion des substances testées sans prendre le risque d'éliminer à tort une substance sans effet tératogène. Ce test a pour vocation d'être intégré dans une batterie de tests pour l'évaluation de la tératogénicité.

Les différents organismes modèles mammifères quel qu'ils soient, ne permettent pas, séparément ou en combinaison, de conclure directement sur la substance testée. Pour valider une méthode alternative à l'expérimentation animale, il faudrait donc idéalement se baser sur des données humaines issues d'études épidémiologiques, d'études de cas, etc... et non sur des données issues de ces organismes modèles mammifères. Bien évidemment, ces données humaines sont rarement disponibles.

Pour mettre au point notre méthode alternative correspondant aux besoins de l'industrie cosmétique, une liste de substances de référence a été constituée, en s'appuyant sur plusieurs sources d'information (réglementaires, institutionnelles, bases de données et littérature scientifique). Ces bases de données regroupent à la fois des données sur des organismes modèles mammifères et des données humaines. Selon la catégorisation actuelle de nos 43 substances, le test de tératogénicité utilisant des embryons de poisson médaka n'identifie pas les effets tératogènes de 14 substances classées reprotoxiques (14 FN). Cependant, les alertes de tératogénicité de 6 de ces substances n'ont pas été confirmées par ailleurs, ce qui peut remettre en cause leur pertinence pour être considérées comme des substances de référence positives. De même, il semble nécessaire qu'une substance de référence négative possède des données d'absence d'effet tératogène pour faire partie de cette catégorie. Une substance de nos références négatives ne possède pas cette donnée d'absence d'effet et par conséquent ne semble pas non plus pertinente pour faire partie de la liste de substances de référence. Ces différents éléments montrent l'importance de la sélection de substances de référence pour la validation d'un test de tératogénicité sur la base de données les plus fiables possible.

Les performances d'un test de tératogénicité sont influencées par les conditions expérimentales (température, nombre d'individus par puits, taille du puits, stades de développement de l'observation des malformations, etc...). Par conséquent, des conditions expérimentales mal adaptées peuvent entraîner des malformations spontanées difficilement distinguables de celles dues à la substance testée. La mise au point de ces conditions expérimentales est donc une étape cruciale du développement d'un test. Les conditions expérimentales du test utilisant les embryons de médaka pourraient être améliorées en réalisant une exposition individuelle des médakas dans des plaques de culture 24 puits et en allongeant le test d'une journée ou deux pour s'affranchir de certaines ambiguïtés d'interprétation de la courbure des alevins juste après l'éclosion. Pour augmenter la sensibilité du test, l'identification de deux autres types d'anomalies pourrait être ajoutée : la mesure d'anomalies cardiaques et celle du comportement des alevins. L'identification de ces deux types d'anomalies est de plus en plus utilisée sans que de standardisation ne soit encore établie. Cette absence d'harmonisation peut mener pour une même substance chimique à des résultats de tératogénicité différents en fonction des paramètres choisis pour la mesure. Là encore, ces paramètres doivent être choisis avec précaution. Enfin, la méthode d'analyse des effets tératogènes comme l'indice tératogène (CL50 / CE50, CL25 / NOAEC, etc...) ou le benchmark dose, les outils de calcul (méthode statistique log Probit, Trimmed Spearman Karber, l'équation de Hill, etc...) mais aussi les contraintes imposées au test comme l'obtention d'une spécificité de 100 % vont modifier l'identification d'une substance comme tératogène ou non.

L'ensemble des étapes du développement d'un test de tératogénicité vont influencer l'identification d'une substance tératogène, de l'établissement de la liste de substances de référence jusqu'à la méthode d'analyse des résultats, en passant par les conditions expérimentales, le choix et la mesure des malformations à identifier.

Chapitre 2 : Caractéristiques du test de tératogénicité utilisant les embryons de poisson médaka

Le test de tératogénicité utilisant les embryons de médaka, présenté dans ce manuscrit, est un nouveau test d'écotoxicité aquatique chronique mais aussi un test de criblage d'effets tératogènes alternatif à l'expérimentation animale. Les limites et les avantages de ces types de test vont être discutés. Ensuite les performances du test ainsi que les optimisations envisageables seront également exposées.

1. Test d'écotoxicité aquatique chronique

Le test de tératogénicité réalisé sur les embryons de médaka utilise une espèce recommandée par l'OCDE pour l'évaluation environnementale des substances chimiques. Ainsi, il s'agit d'un nouveau test d'écotoxicité aquatique chronique. Par conséquent, il partage les mêmes contraintes de solubilisation des substances chimiques dans un milieu aqueux que ce type de test (aiguë et chronique). Généralement, les tests d'écotoxicité utilisent une seule voie d'exposition des substances à tester, c'est-à-dire la baignation et cette exposition est continue tout au long de l'essai. Cette baignation est problématique dans le cas de substances peu hydrosolubles (faible fraction hydrosolubilisée et disponible pour les organismes, adsorption aux parois, etc...), particulières (précipitation dans le milieu), photosensibles, thermolabiles ou encore volatiles. Pour ce type de substances, les données peuvent être peu reproductibles d'un laboratoire à un autre (Busquet et al. 2014). De nouveaux systèmes passifs d'exposition sont en cours de développement comme le « o-ring » (Smith et al. 2010; Vergauwen et al. 2015). Il s'agit de tubes de silicone dans lesquels la substance lipophile à tester est mise en équilibre avec du méthanol. Les o-rings sont ensuite placés dans le milieu d'exposition et la substance lipophile diffuse de manière passive dans le milieu par l'intermédiaire du méthanol. Ce système a notamment été testé avec des substances très lipophiles comme les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). Les différentes études ont montré que les substances étaient bien diffusées dans le milieu d'exposition. Cependant la technique reste encore longue (40h pour charger le o-ring avec la substance) et laborieuse.

Les résultats obtenus avec ce type de substances peuvent être difficiles à interpréter en l'absence d'une mesure analytique des concentrations testées. Pour développer notre test

utilisant les embryons de médaka, seules des substances hydrosolubles ont été sélectionnées. Ce choix a exclu un certain nombre de substances tératogènes chez l'Homme telles que la Thalidomide, le DES ou encore l'acide rétinoïque, etc.

En tant que nouveau test d'écotoxicité, les différentes valeurs de CL50 et d'IT obtenues dans le test utilisant les embryons de médaka sont comparées avec les seuils de toxicité aiguë pour déterminer la complémentarité de ce nouveau test avec ceux d'écotoxicité aiguë (Figure 65). Pour faciliter la lecture du graphique, les substances ayant obtenues une valeur de l'IT égale à 0 ne sont pas représentées. Cette figure montre une répartition relativement homogène des substances quel que soit la catégorie des substances de référence. Il ne semble pas y avoir de relation entre une valeur de CL50 faible et un IT élevé, c'est-à-dire entre une substance écotoxique et une substance à fort pouvoir tératogène. A l'exception du 6 aminonicotinamide, du chlorure de cadmium et de la doxylamine, les valeurs de l'IT sont inférieures à 10.

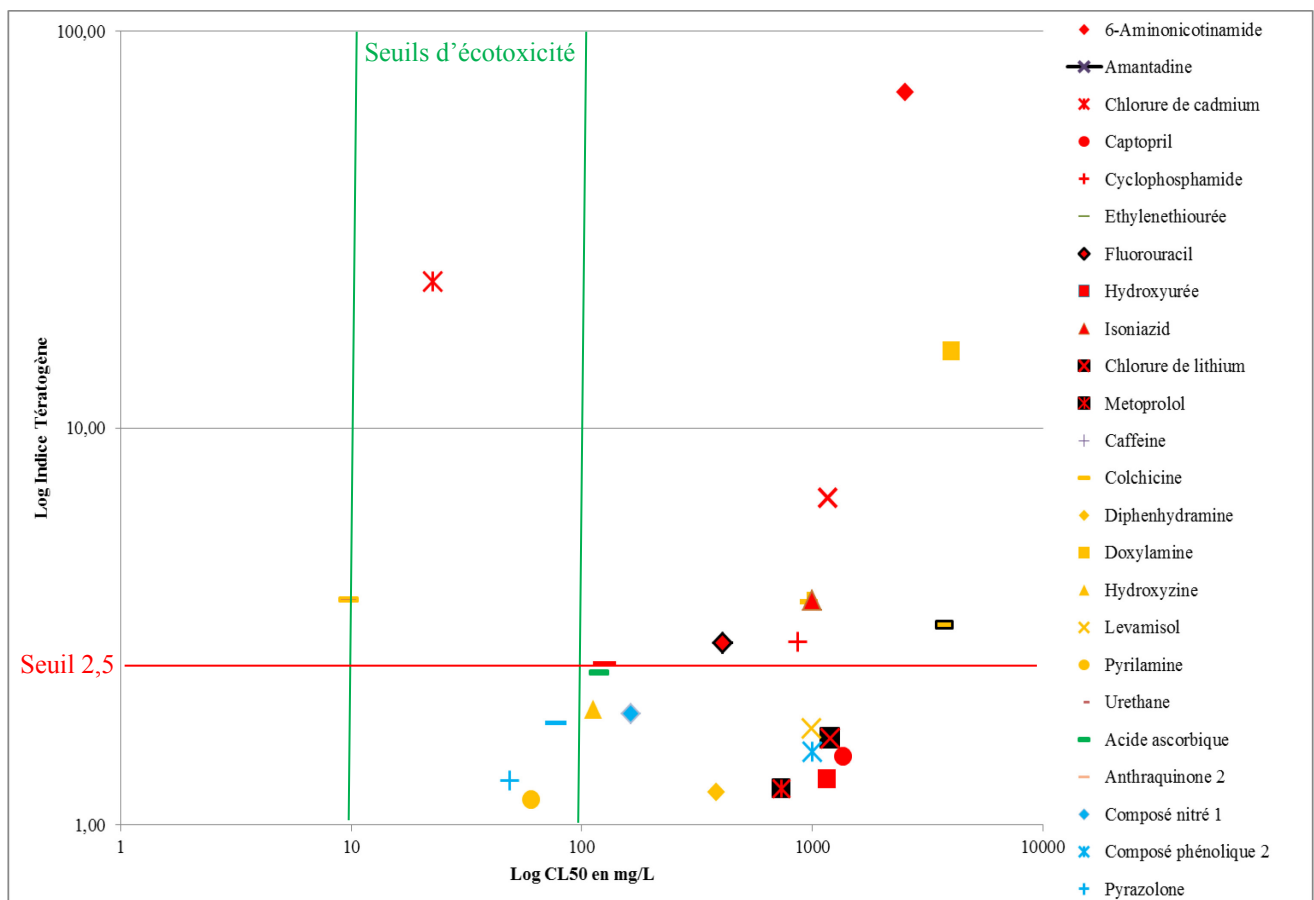


Figure 65 : Répartition des valeurs de l'IT des substances de référence du test utilisant les embryons de médaka supérieures à 0 en fonction de leur valeur de CL50

Parmi les substances de notre liste de références, seule la colchicine pourrait être considérée comme écotoxique (valeur de CL50 entre 1 et 10 mg/L) avec une mention de danger H401. Le chlorure de cadmium, la pyrilamine, l'anthraquinone 2 et la pyrazolone pourraient être considérés comme nocifs pour les organismes aquatiques (valeurs de CL50 entre 10 et 100 mg/L) avec une mention de danger H402. Tous les dossiers REACH, et par conséquent toutes les substances chimiques du marché européen, doivent avoir des données d'écotoxicité aigue sur daphnies. Si la substance chimique est commercialisée à plus de 10 tonnes par an, des données d'écotoxicité aigue sur poisson sont également exigées. Des données de toxicité à long terme ne sont pas systématiquement présentes dans un dossier REACH. Elles ne sont exigées qu'à partir de 100 tonnes par an. Sur la base des données de CL50 des substances de référence de notre liste, les substances tératogènes ne seraient pas préalablement éliminées par un test d'écotoxicité aigue.

Le test de tératogénicité utilisant les embryons de médaka semble donc être complémentaire aux tests classiques d'écotoxicité aigus.

2. Test de criblage alternatif à l'expérimentation animale

Comme précisé précédemment, le test de tératogénicité utilisant les embryons de médaka est un test alternatif à l'expérimentation animale car les embryons de poisson, sur lesquels nous travaillons, ne sont pas considérés par la directive européenne 2010/63/UE. Par conséquent, ce test répond aux exigences de l'industrie cosmétique. Pour autant, ce test ne permet pas de tester l'impact potentiel des substances chimiques sur la fertilité, sur la lactation ou encore des effets transgénérationnels. Ces autres aspects de la reprotoxicité nécessitent de recourir à des stades adultes sexuellement matures, ce qui n'est pas autorisé pour l'évaluation d'ingrédients cosmétiques. Cependant des ingrédients cosmétiques peuvent tout de même présenter ces données, s'ils sont utilisés à d'autres usages qu'à celui cosmétique, usages pour lesquels ces évaluations de reprotoxicité seraient requises. Comme chez l'Homme, le système uro-génital des poissons continue à se développer après les stades embryonnaires. Par conséquent, les malformations morphologiques et / ou fonctionnelles de ce système pourront difficilement être mises en évidence par une simple observation macroscopique des alevins dans un test de criblage alternatif à l'expérimentation animale.

Le premier objectif d'un test toxicologique de criblage est de permettre l'évaluation d'un grand nombre de substances chimiques et la priorisation des substances sur la base de

leur danger de tératogénicité. Pour cela, le test utilisant les embryons de médaka est défini avec une spécificité de 100 %. Une partie des résultats de ce test permet de prendre directement une décision : si une substance a une valeur de l'IT supérieure au seuil défini lors de l'analyse des données obtenues pour la liste de substances de référence, elle est fortement suspectée d'avoir des effets tératogènes et elle sera éliminée. Si la valeur de son IT est inférieure à ce seuil, le développement de cette substance chimique pourra se poursuivre, sans préjuger de son innocuité pour l'Homme à partir de ces seules données générées sur ce modèle poisson.

Le deuxième objectif est d'augmenter le débit du test tout en diminuant le coût par rapport aux différents tests de reprotoxicité requis par le règlement REACH (Tableau 50). Les tests d'évaluation de la tératogénicité utilisant les organismes modèles mammifères s'étendent sur une période de 3 à 20 semaines d'exposition et coûtent entre 54 600 € et 665 200 € (estimations de 2012). La période d'exposition est réduite entre 3 et 4,5 semaines dans le cadre des lignes directrices OCDE n° 210 et n° 211. Leur coût varie entre 27 000 € et 45 000 € (Rovida & Hartung 2009; Knight & Rovida 2014). Dans leur ensemble ces tests sont donc longs et coûteux et ne permettent généralement pas l'évaluation de plusieurs substances en parallèle.

Tableau 50 : Comparaison de la durée, du nombre d'animaux utilisés et du coût des différents tests requis par le règlement REACH pour l'évaluation de la reprotoxicité

Protection	de l'Homme				des organismes aquatiques	
	421	422	414	443	210	211
Ligne directrice OCDE n°	421	422	414	443	210	211
Nombre d'animaux	560	412	784	1100	400	60
Durée d'exposition (en semaines)	12	12	3	20	4,5	3
Coût en k€	54,6	92	63,1	665,2	45	27

Sources : Rovida & Hartung 2009; Knight & Rovida 2014

Le test de tératogénicité utilisant les embryons de médaka est donc bien moins long avec une période d'exposition de 1,3 semaines. La petite taille des embryons de médaka permet de les exposer dans des petits volumes (10 mL), dans des plaques de culture multipuits par exemple. Les quantités de substance nécessaires à la réalisation des tests sont donc réduites. Cette miniaturisation du test par rapport aux tests précités permet également de tester plusieurs substances en parallèle. Son débit peut être estimé à une centaine de substances évaluées par an. L'inconvénient de la « miniaturisation » de ce test est le phénomène d'évaporation due à l'utilisation de petits volumes et aux enceintes climatiques, régulées à 28°C. Sans régulation de l'hygrométrie, les embryons de médaka pourraient alors être exposés

à une concentration supérieure à la concentration nominale. La méthode conduisant à la détermination de l'indice tératogène minimise l'impact de ce phénomène sur les résultats. En effet, l'IT est un rapport entre deux concentrations d'effet (tératogénèse et létalité) générées dans les mêmes conditions expérimentales. Ainsi, l'indice tératogène met uniquement en évidence l'écart de concentration entre les effets létaux et ceux tératogènes observés chez 50 % des individus exposés à la substance à évaluer.

Une partie des coûts élevés des tests cités dans le Tableau 50 est consacrée aux mesures analytiques des concentrations ou doses de la substance testée. Dans le cas de notre test de criblage, ces mesures ne sont pas réalisées car elles sont incompatibles avec des besoins de priorisation de substances nouvellement synthétisées. En effet, ces mesures nécessitent souvent le développement d'une méthode analytique spécifique à chaque substance, ce qui peut être long et coûteux. Le coût du test utilisant les embryons de médaka présenté dans ce manuscrit peut être estimé à moins de 10 000 € par substance, ce qui reste moins coûteux que les tests cités dans le Tableau 50.

Cependant, le non recours aux mesures chimiques analytiques de la substance testée ne permet pas de déterminer la réelle absorption de cette substance par les embryons de poisson. Pourtant, cette absorption dans l'organisme peut être très différente d'une substance à une autre et pourrait expliquer certaines identifications incorrectes de substances de référence (Faux Négatifs ou Faux Positifs). Par exemple, Gustafson *et al.* a montré un faible pourcentage d'absorption du fluconazole par le poisson zèbre (5,1 % de la concentration nominale). Ce faible taux d'absorption pourrait expliquer l'absence d'effet tératogène observée dans le test ZET alors que cette substance est tératogène chez la souris. A l'inverse, le fort pourcentage d'absorption de la loratadine par le poisson zèbre (4 500 % de la concentration nominale) pouvait expliquer la détection d'effets tératogènes dans le test ZET alors que la loratadine n'est pas tératogène chez l'Homme et les rongeurs. De manière étonnante, cette absorption des substances par les embryons de poisson zèbre ne semble pas être corrélée au caractère lipophile de ces substances (Gustafson 2011). La mesure analytique de la substance dans l'organisme reste nécessaire pour déterminer l'absorption de cette substance.

Comme l'objectif de ce test de criblage est la priorisation des substances sur la base de leur danger intrinsèque, les modes d'action des substances testées ne sont pas recherchés. Ceci permet de conserver le même débit de test ainsi que de ne pas augmenter le coût du test.

3. Performances du test utilisant les embryons de médaka

Le test utilisant les embryons de médaka a été préféré à ceux utilisant les embryons de poisson zèbre ou de xénope pour sa facilité d'obtention et sa robustesse. Dans nos conditions, l'approvisionnement en œufs de médaka a été régulier tout au long de l'année. Ceux-ci étaient de bonne qualité et livrés en quantité suffisante. Ils s'avèrent également robustes à la manipulation et ne nécessitent pas de traitement chimique avant le lancement d'un essai, contrairement aux œufs de xénope qui nécessite une étape de dégangage. Par ailleurs, une étude récente, qui compare les performances de tests de tératogénicité sur les stades embryolairvaires de poisson zèbre et de médaka montre, elle aussi, la meilleure robustesse du médaka pour la détection des effets de 2 HAPs (Perrichon et al. 2014).

Le second critère pour la sélection du test utilisant les embryons de médaka est sa meilleure sensibilité sur une liste commune de substances testées. Sa sensibilité modérée obtenue sur l'ensemble des substances tératogènes de la 1^{ère} catégorie (57,1 %) est comparable à celles des tests de tératogénicité utilisant des organismes modèles mammifères. Elle est également comparable à celles des autres méthodes alternatives à l'expérimentation animale validées par l'EURL-ECVAM (Tests MicroMass, Whole Embryo Culture et Embryonic Stem cell Test). Cependant le test utilisant les embryons de médaka obtient une spécificité de 100 % avec une valeur seuil de l'IT élevée avec 2,5. Cette sensibilité modérée pourrait être augmentée par l'ajout de nouveaux paramètres de mesure d'effets tératogènes comme les anomalies cardiaques ou comportementales.

Le test utilisant les embryons de médaka a permis l'identification du cyclophosphamide (IT = 2,89), qui nécessite une étape de métabolisation pour exercer son action tératogène. Les métabolites actifs du cyclophosphamide sont obtenus suite à l'action de différents cytochromes P450 (CYP2A6, 2B6, 2C8/9, 2C18/19, 2E1, 3A4, 3A5) (Weigt et al. 2011). Les embryons de médaka possèdent donc au moins une partie suffisante de ces cytochromes permettant la métabolisation du cyclophosphamide. En 2010, une étude sur les capacités métaboliques du poisson zèbre a montré qu'il possède des cytochromes communs avec l'Homme et d'autres spécifiques (Figure 66). Les cytochromes présents chez le poisson zèbre sont actifs dès les premiers stades de développement (Goldstone et al. 2010). Un an plus tard, l'équipe de Weigt *et al.* a confirmé ses capacités métaboliques par l'identification de 10 substances pro-tératogènes nécessitant l'action de différentes familles de cytochromes P450 (Weigt et al. 2011).

Zebrafish	A	Human
CYP1A		CYP1A1/1A2
CYP1B1		CYP1B1
CYP1C1,2	B	-
CYP1D1		CYP1D1P
CYP2Ks		CYP2W1
CYP2N13		CYP2J2
CYP2Ps		CYP2J2
CYP2R1		CYP2R1
CYP2U1		CYP2U1
CYP2V1		CYP2J2
CYP2X1-10		-
CYP2Y3,4		CYP2A/B/F/S
CYP2AA1-12		-
CYP2AD2,3,6		CYP2J2
CYP2AE1,2		-
CYP3A65		CYP3A-se1,-se2 ^a
CYP3C1-4		CYP3A3,4,7
CYP4F43		CYP4F
CYP4V7,8		CYP4V2
CYP4T8		-
CYP5A1		CYP5A1
CYP7A1		CYP7A1
CYP7B1		CYP7B1
CYP7C1		-
CYP8A1		CYP8A1
CYP8B1-3		CYP8B1
CYP11A1,2		CYP11A1
CYP11C1		-
CYP17A1,2		CYP17A1
CYP19A1,2		CYP19A1
CYP20A1		CYP20A1
CYP21A1		CYP21A2
CYP24A1		CYP24A1
CYP26A1		CYP26A1/C1
CYP26B1		CYP26B1
CYP26C1		-
CYP27A3-7		CYP27A1
CYP27B1		-
CYP27C1		-
CYP39A1		CYP39A1
CYP46A1		CYP46A1
CYP46A2,4,5		-
CYP51A1		CYP51A1

^a pseudogene (single remnant exon)

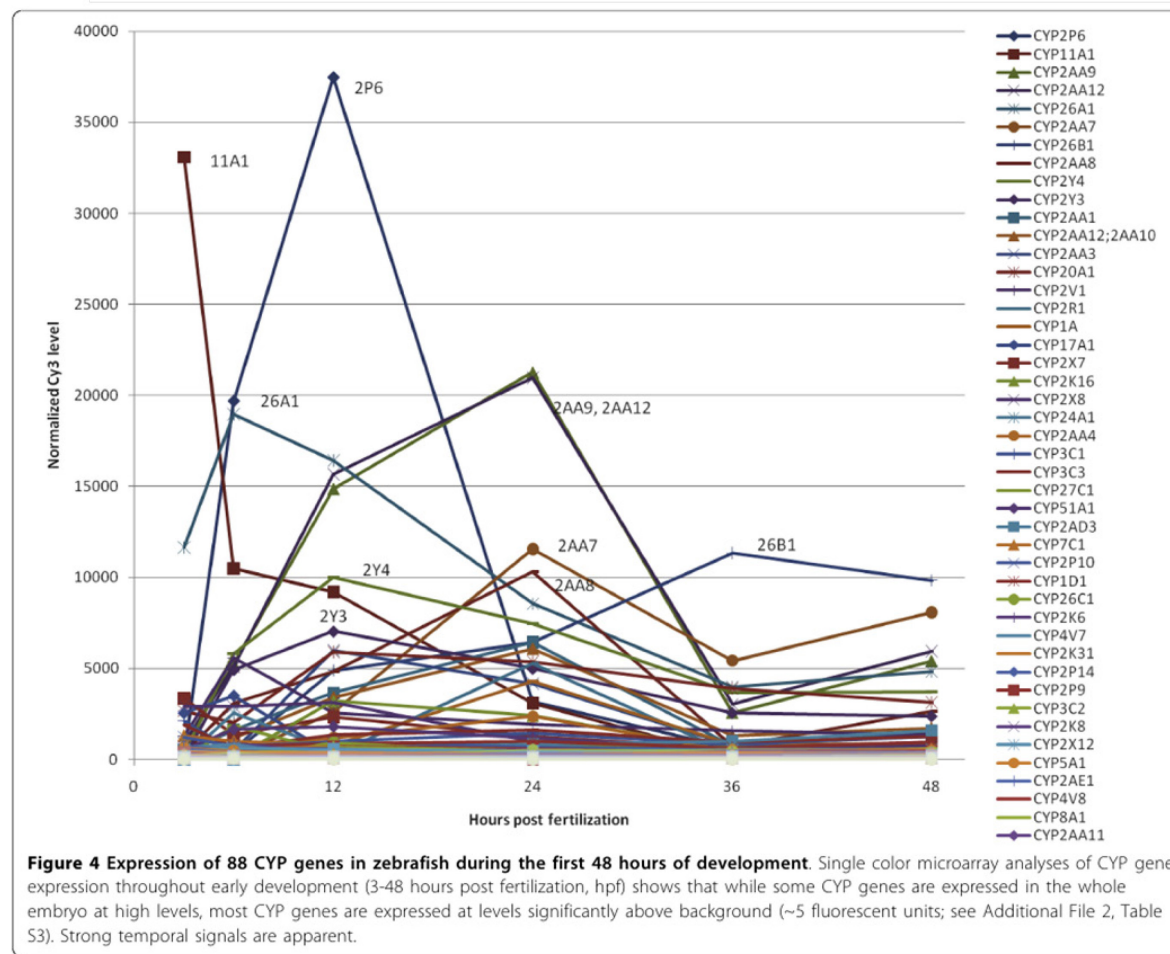


Figure 66 : Comparaison des cytochromes présents chez le poisson zèbre et chez l'Homme (A) et leur expression chez les embryons de poisson zèbre

Source : Goldstone et al. 2010

Le test de tératogénicité utilisant les embryons de médaka a été sélectionné pour la robustesse de ses œufs ainsi que pour la meilleure sensibilité de ce test par rapport à ceux utilisant le poisson zèbre et le xénope. Par ailleurs, le test utilisant les embryons de médaka a permis de montrer que le médaka à ces stades de développement possède certaines capacités métaboliques.

Cependant, avec les critères actuels de catégorisation des substances, le test utilisant les embryons de médaka obtient 14 Faux Négatifs avec un seuil de l'IT fixé à 2,5. En appliquant des critères plus restrictifs comme ceux proposés précédemment, 7 substances ne semblent pas assez pertinentes pour faire partie de la liste de substances de référence et 2 substances (le chlorure de lithium et l'acide acétylsalicylique) passent de la 1^{ère} catégorie de références positives tératogènes à la 2^{ème} catégorie regroupant les substances suspectées d'être tératogènes. Cette nouvelle répartition des substances dans les différentes catégories de références permet d'obtenir une catégorisation des substances plus représentative de celle retrouvée dans la littérature scientifique (cas de la saccharine par exemple). Dans ces nouvelles conditions plus restrictives, le test utilisant les embryons de médaka obtiendrait une sensibilité satisfaisante légèrement augmentée avec 60,0%.

Chapitre 3 : Perspectives pour le test de tératogénicité utilisant des embryons de médaka

Le test de tératogénicité sur les embryons de médaka est pertinent pour l'identification de substances tératogènes hydrosolubles, fiable dans sa réalisation tout au long de l'année et ses résultats sont répétables (les valeurs d'IT ont pu être confirmées). Cependant, plusieurs optimisations, dont l'observation de nouveaux paramètres, permettraient de le rendre plus sensible. La quantification de l'ensemble des mesures permettrait également d'améliorer sa reproductibilité et le rendrait transférable dans d'autres laboratoires. Il serait également intéressant d'élargir la liste de substances de référence à des substances plus lipophiles. Ceci permettrait d'obtenir une meilleure représentativité des agents tératogènes en fonction de leur usage, de leur nature chimique, de leurs modes d'action et de leurs effets. Enfin, l'identification de substances tératogènes pourrait être étendue à celles de perturbateurs endocriniens avec le recours à des lignées de médaka transgéniques possédant des marqueurs fluorescents pour faciliter la lecture des paramètres d'effet. Le test de tératogénicité utilisant le médaka devrait être intégré dans une stratégie d'évaluation globale de la tératogénicité voire de la reprotoxicité.

1. Quantification et automatisation des mesures d'effet

Pour rendre le test de tératogénicité utilisant les embryons de médaka plus reproductible et robuste, les mesures des paramètres d'effet pourraient être quantitatives et automatisées. La quantification des mesures permettrait de standardiser les mesures et *in fine* les résultats du test en s'affranchissant de la subjectivité des mesures, donnée par l'opérateur dont l'expérience peut également varier d'une personne à l'autre. L'automatisation de cette quantification permettrait de ne pas augmenter le temps opératoire et ainsi conserver le même débit et le même coût du test. Cette automatisation nécessite la standardisation des images pour permettre l'application systématique d'algorithmes. C'est pourquoi l'acquisition des images d'embryons de médaka devrait également être standardisée. Idéalement, le positionnement des embryons devrait également être standardisé pour être certain de pouvoir réaliser l'ensemble des mesures sur chaque individu. Pour faciliter ces différentes étapes,

l'exposition des embryons de médaka devrait être individuelle et non pas par lots de 10 embryons par puits.

La première difficulté à surmonter pour automatiser la mesure des différents paramètres est le positionnement de l'alevin ou de l'œuf. L'observation classique à la loupe par un manipulateur permet de tourner l'œuf ou l'alevin pour chaque partie du corps à analyser. De plus, cette observation nécessite parfois des paramètres d'observation différents en fonction de la structure à mesurer. Plusieurs projets sont en développement pour permettre le positionnement de petits organismes sous microscope. Parmi eux, le système VAST de la société Union Biometrica semble le plus prometteur (Figure 67) (Zhu et al. 2014; Zhu et al. 2014). Le système est composé de plusieurs modules. Le 1^{er} module permet de sélectionner un poisson zèbre dans une plaque de culture multipuits. Le 2nd module permet de positionner et d'orienter un alevin de poisson zèbre sous un microscope. Le dernier module permet de placer l'alevin dans une nouvelle plaque de culture multipuits. Actuellement, la taille du capillaire permet le positionnement d'alevins de poisson zèbre. Cependant cette taille ne permet pas le positionnement d'œufs de poisson zèbre ou d'alevins présentant des malformations sévères (œdèmes, déformations axiales...). Par conséquent, à l'heure actuelle, le système ne permet pas de positionner l'ensemble des individus obtenus à la fin d'un test de tératogénicité. De plus, ce système n'est pas adapté à des organismes un peu plus épais que le poisson zèbre comme le médaka ou le xénope.

Une fois les embryons positionnés de manière manuelle ou automatisée, un système d'acquisition automatisé serait nécessaire pour standardiser les images ou les vidéos des embryons afin de permettre leur analyse automatisée. Il pourrait être envisagé un système où une caméra se déplacerait au-dessus de chaque puits et donc de chaque embryon pour réaliser ces acquisitions.

Lorsque les images ou les vidéos des embryons sont obtenus, ils peuvent être analysés. De manière générale, les outils d'analyse d'images ou de vidéos ne sont pas standardisés et dépendent du langage informatique, des logiciels utilisés mais aussi de la taille et de la qualité de l'image ou de la vidéo. De plus, le développement des algorithmes est spécifique à chaque espèce et à chaque stade de développement. C'est pourquoi les méthodes d'analyse d'un même paramètre peuvent être très différentes de l'une à l'autre.

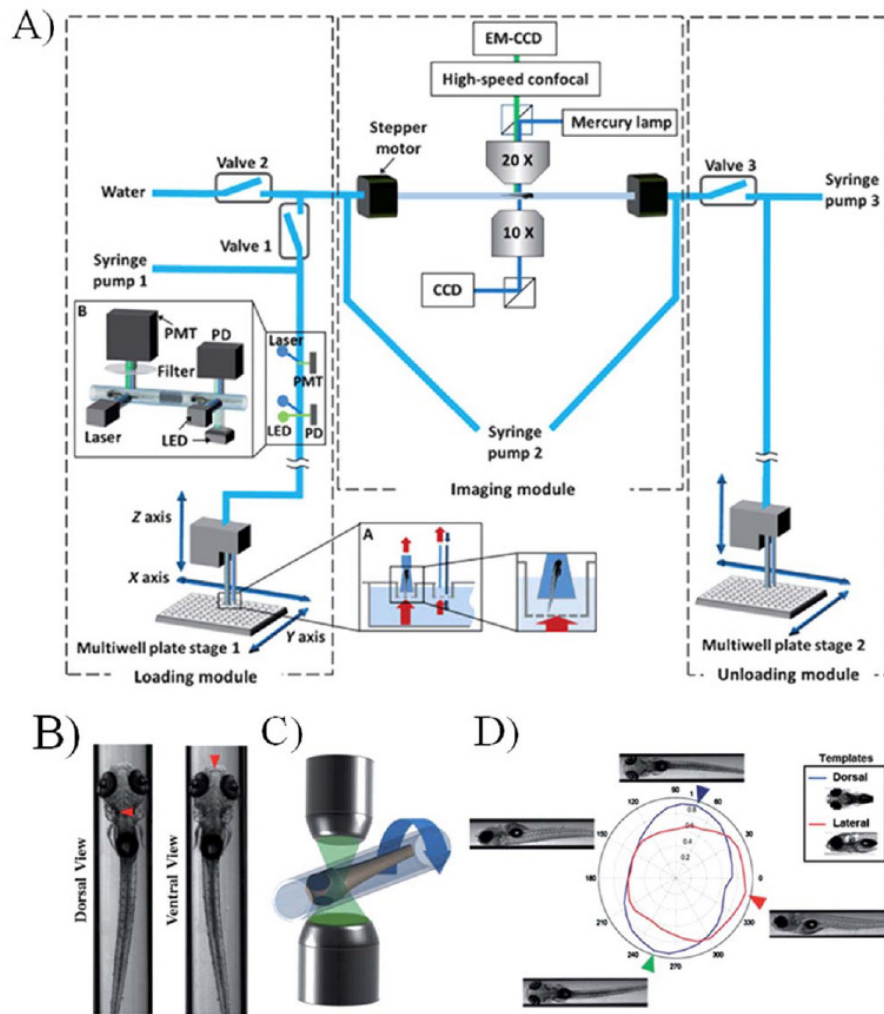


Figure 8. VAST platform for high-throughput zebrafish larvae manipulation and image detection. **A:** The schematic diagram of the VAST system. The system consisted of three robotic modules: the loading module can load zebrafish larvae from a multiwell plate for detection and positioning; the imaging module was featured with a high-speed confocal camera, enabling high quality, and rapid focusing and imaging; and the unloading module can dispense larvae back to a multiwell plate. **B–D:** in a microcapillary, larvae orientation can be easily adjusted for imaging. Reproduced from (Ref. 74) with permission of The Royal Society of Chemistry. [Color figure can be viewed in the online issue which is available at wileyonlinelibrary.com]

Figure 67 : Exemple de système automatisé de positionnement d’alevin de poisson zèbre (Système VAST)

Source : Zhu et al. 2014

Le développement d’algorithmes (traitement automatisé des supports informatiques comme des images ou des vidéos) devrait permettre l’identification des différentes malformations observées sous loupe chez des œufs et des alevins de médaka au cours du test de tératogénicité utilisant les embryons de médaka. Ces algorithmes devraient également permettre d’identifier la mortalité des embryons. De plus, le traitement automatisé de ces supports permet d’ajouter d’autres paramètres à mesurer comme l’analyse des otolithes sans que cela n’augmente le temps requis par un opérateur et donc, le coût ou la durée du test. L’ajout de nouveaux paramètres permettrait également d’augmenter la sensibilité du test. Il

pourrait s'agir de l'identification d'anomalies cardiovasculaires et de celles comportementales par l'analyse de vidéos.

Pour le calcul de la valeur de la CL50, la mortalité devra également être mesurée de manière automatique. Ceci serait envisageable par le traitement d'une vidéo où la zone du cœur chez un alevin de médaka serait identifiée et où les modifications de pixels correspondant à une fréquence cardiaque seraient ensuite quantifiées. Cette quantification d'une fréquence cardiaque semble une technique assez fiable pour détecter la mortalité et ce, même chez des alevins présentant différents types de malformation (Figure 68) (Puybureau et al. 2015). Ce type de traitement de vidéos pourrait être élargi à l'identification de différentes anomalies cardiovasculaires évoquées précédemment et ainsi que d'anomalies du comportement. L'ajout de ces nouvelles mesures permettrait probablement d'augmenter la sensibilité du test.

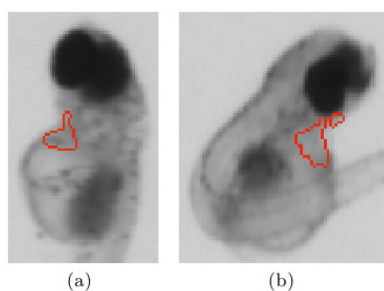


Figure 68 : Détection de la fréquence cardiaque chez un alevin de médaka présentant un œdème péricardique (a) et chez un autre présentant plusieurs malformations dont une de la tête et de la queue (b)

Source : Puybureau et al. 2015

Le test de tératogénicité utilisant les embryons de médaka intègre déjà une mesure quantitative, celle de la taille des alevins. Néanmoins, cette mesure n'est pas standardisée et pourrait donc gagner en répétabilité et en reproductibilité par l'utilisation d'un algorithme. Différentes techniques d'analyse d'image existent pour la mesure automatisée de la taille de l'alevin. Par exemple, Lantz-McPeak *et al.* ont utilisé deux mesures différentes pour évaluer la taille d'un alevin de poisson zèbre : la taille totale (distance entre l'extrémité de la tête et l'extrémité de la queue) et la taille de la « fibre » (taille tenant compte du périmètre et de l'aire du corps) (Figure 69). Cependant ces deux mesures différentes ont permis de mettre en évidence de la même manière des effets tératogènes provoqués par la caféine (Lantz-McPeak et al. 2015).

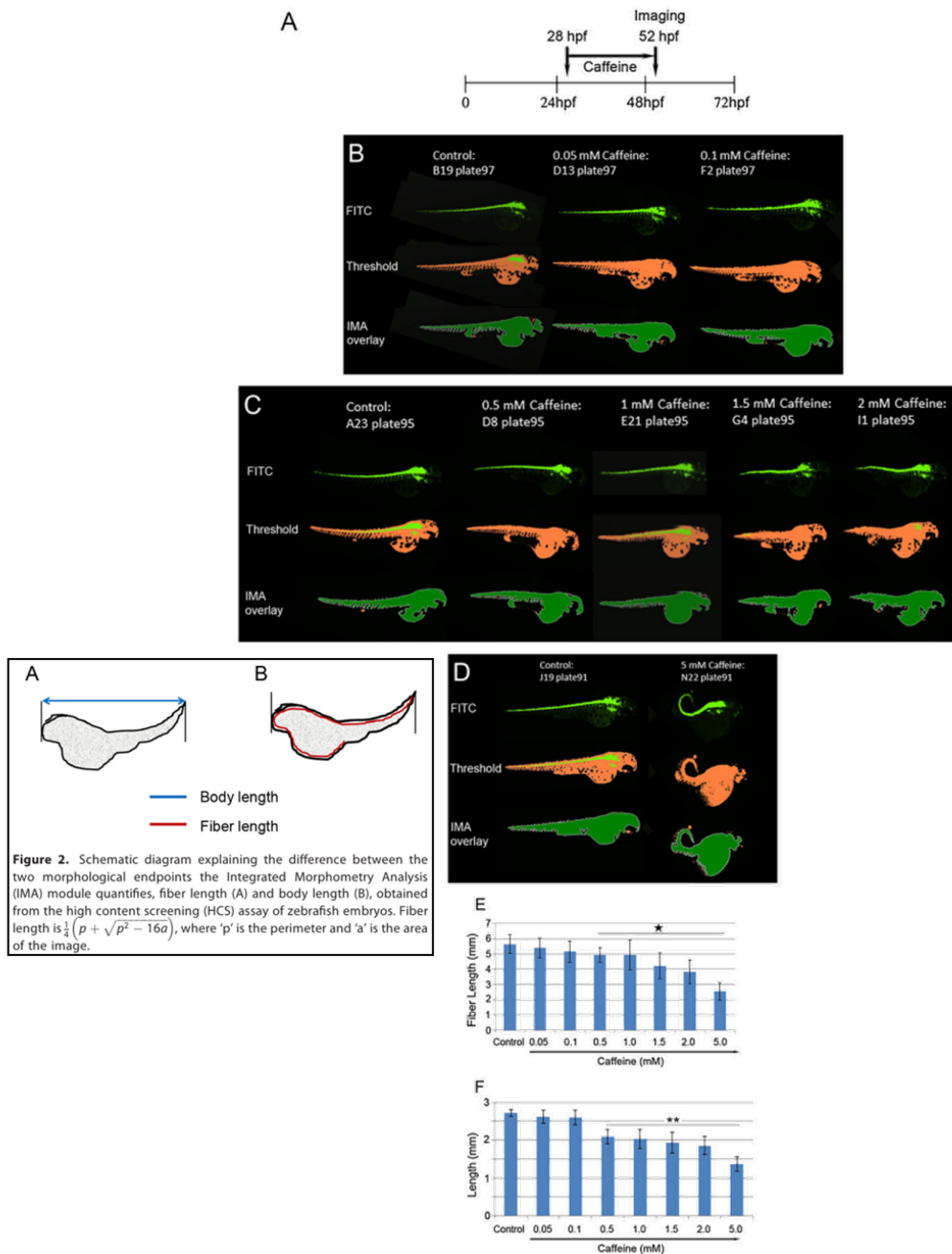


Figure 8. Schedule for caffeine treatment (A) and representative images of control and caffeine-treated embryos from a 384-well plate captured by the high content automatic imager. Images and representative images for control, 0.05 mM, 0.1 mM caffeine (B), control, 0.5 mM, 1.0 mM, 1.5 mM and 2 mM caffeine (C), and control and 5 mM caffeine (D), are shown. Values for fiber lengths (E) and lengths (F) of control and caffeine-treated zebrafish embryos ($n = 39/\text{group}$) are presented as means \pm SDs obtained from multiple experiments. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

Figure 69 : Exemple d'analyse d'images d'embryons de poisson zèbre exposés à la caféine ainsi que la mise en évidence de la diminution de la taille des alevins en fonction de la concentration d'exposition en caféine

Source : Lantz-McPeak et al. 2015

À nouveau, les critères appliqués aux différents algorithmes pour identifier les malformations vont directement influencer sur les résultats de tératogénicité.

Dans ces conditions, l'ensemble des malformations physiques ou fonctionnelles du test serait quantifiées et automatisées. Le test serait alors reproductible dans n'importe quel laboratoire.

Si les optimisations du test de tératogénicité utilisant les embryons de médaka sont concluantes, le test pourrait être envisagé comme une alternative pour la partie évaluation de la tératogénicité du nouveau test *in vivo* sur plusieurs générations de médaka (Ligne directrice OCDE n°240).

2. Liste élargie de substances de référence pour obtenir une meilleure représentativité des agents tératogènes

Afin que le test de tératogénicité utilisant le médaka soit le plus prédictif possible, la liste de substances de référence devrait être également être représentative des différentes natures chimiques des agents tératogènes (médicaments, biocides et autres contaminants environnementaux) mais aussi des mécanismes d'action ainsi que des malformations induites.

Jusqu'à présent le test de tératogénicité utilisant les embryons de médaka a été évalué sur une liste de substances de référence hydrosolubles. Cette liste pourrait être élargie à des substances moins hydrosolubles reconnues tératogènes chez l'Homme comme la Thalidomide, le DES, ou encore des substances préoccupantes comme les POPs (HAPs, PCBs, dioxines, biocides), etc... Ces substances lipophiles sont préoccupantes car elles sont souvent bioaccumulables et se stockent dans les graisses des organismes. Or, pendant la grossesse, ces graisses peuvent être consommées et rendre ainsi la substance disponible au fœtus. Cette exposition indirecte peut alors entraîner des malformations.

Idéalement, cette liste devrait également comprendre en proportion similaire des références « positives » ayant des effets tératogènes et des références « négatives » n'ayant pas d'effets tératogènes identifiés, afin que chaque substance contribue de la même manière pour la détermination de la spécificité et de la sensibilité du test.

3. Identification de perturbateurs endocriniens de l'axe stéroïde sexuel

Comme cela a été rappelé précédemment, le recours aux embryons de poisson uniquement ne permet pas de détecter de manière directe tous les effets reprotoxiques comme la fertilité. Par contre, l'exposition à un perturbateur endocrinien aux stades embryonnaires peut créer un événement clé déterminant pour la production d'un effet néfaste visible uniquement à l'âge adulte selon le principe de l'« Adverse Outcome Pathway » (AOP) (Figure 70). Selon ce principe, une substance chimique entraîne d'abord une interaction au niveau macro-moléculaire comme la fixation à un récepteur nucléaire, ce qui peut entraîner une modification de l'état de la cellule (activation d'un gène, modification de la signalisation cellulaire...). Cette modification peut induire, à son tour, une altération du développement des tissus et des organes et ainsi engendrer une malformation ou un dysfonctionnement de l'organisme entier. Cette malformation peut à son tour avoir des effets plus ou moins délétères et même conduire à l'extinction de la population de cet organisme, dans les cas les plus graves. Par exemple, lorsqu'un AOP est bien caractérisé, il est alors envisageable de mesurer aux stades embryonnaires un événement clé initial, induisant une perturbation endocrinienne et une anomalie de l'organisme à l'âge adulte.

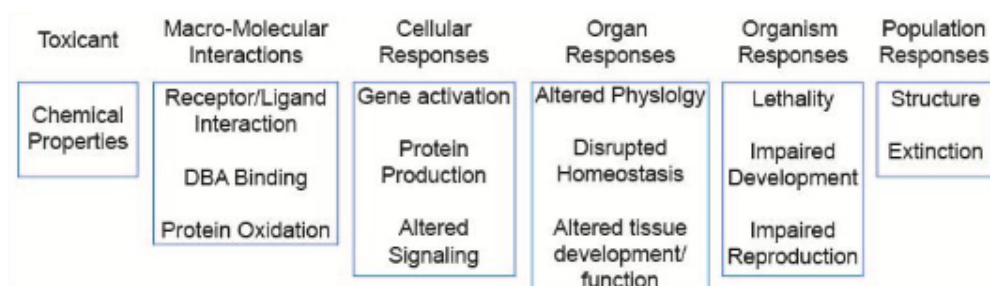


Figure 70 : Principe de l'Adverse Outcome Pathway

Source : OCDE

La Figure 71 illustre les différents AOPs menant à des effets reprotoxiques identifiés chez le poisson (Knapen et al. 2015). Un des événements clés d'un de ces AOPs est la synthèse de la protéine vitellogénine (VTG). Il s'agit d'un précurseur d'une des protéines constitutives du vitellus des œufs normalement synthétisé dans le foie des femelles. La VTG est impliquée dans un AOP lié à une perturbation endocrinienne. En effet, l'exposition d'un poisson (mâle ou femelle) à un perturbateur endocrinien œstrogénique agoniste va entraîner la synthèse d'ARN messager de la VTG puis la transcription de protéines VTG dans le foie. La concentration en VTG va ensuite augmenter dans la circulation sanguine pour s'accumuler

dans les reins et former des *ovotestis* (présence d'ovocytes dans les testicules de mâles). La fertilité des poissons mâles est alors altérée.

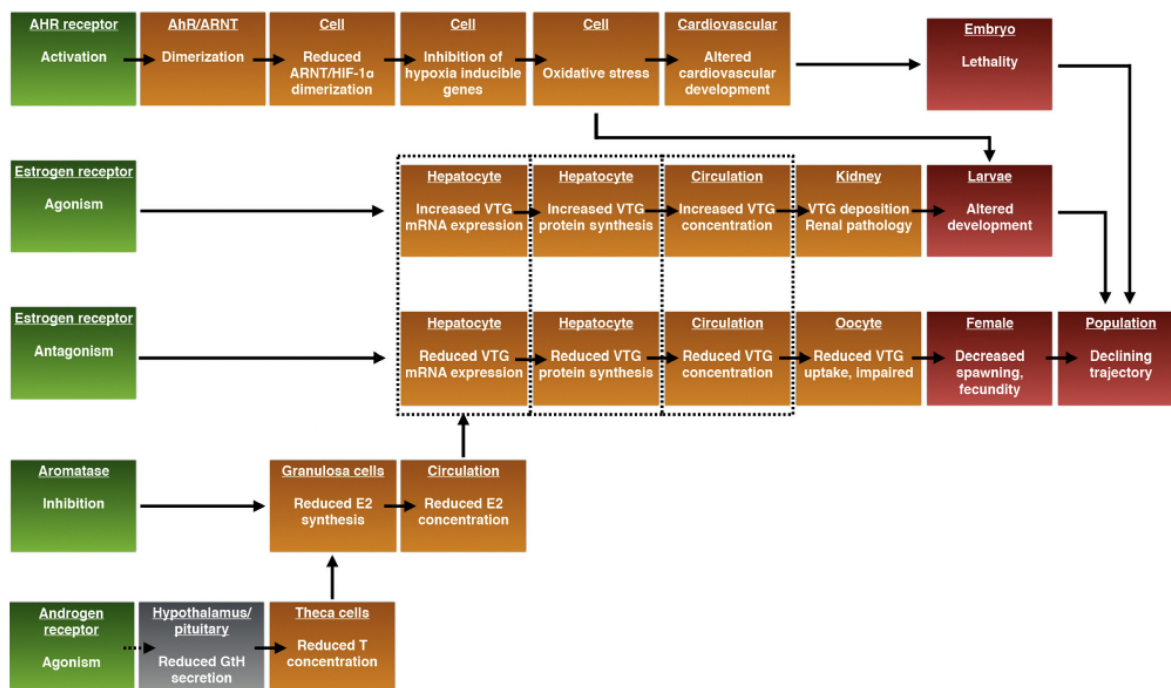


Fig. 1. Example of an AOP network based on the five reproductive and developmental toxicity-related AOPs that are available for fish in the AOP Wiki (Jan. 2015). MIEs are indicated in green, KEs in orange, and AOs in red, as per the AOP Wiki template. The dotted squares indicate KEs that are defined as changes in opposite direction (increase versus decrease) of the same biological component. AHR: aryl hydrocarbon receptor; GtH: gonadotrope hormone; T: testosterone; VTG: vitellogenin; E2: estradiol. KE descriptions have been directly derived from the AOP Wiki whenever possible. In some cases, slight modifications of descriptions were necessary to generate a re-usable KE in this specific network. This figure illustrates the AOP network approach but does not make any assumptions about the scientific validity of the underlying AOPs. AOPs, and hence the depicted AOP network, may be subject to change before they are formally finalized. See Table 1 for how to view the exact version of the AOPs that were used in this network. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Figure 71 : Exemples d'un réseau AOP de reprotoxicité disponibles sur le poisson sur le site AOP Wiki

Source : Knäpen et al. 2015

Plusieurs lignes directrices OCDE (n°229, n°230 et n°234) utilisent la mesure de la concentration en VTG comme évènement clé pour l'évaluation de la perturbation endocrinienne de l'axe stéroïde sexuel (axe œstrogénique et androgénique) (OCDE 2012c; OCDE 2009; OCDE 2011). Cette protéine constituante des œufs semble donc être pertinente pour prédire un futur effet néfaste en dehors des stades embryonnaires. Parmi les espèces listées dans ces lignes directrices, le poisson zèbre n'est pas conseillé à cause de la difficulté à identifier ses caractères sexuels secondaires (Fenske et al. 2005) et de son changement de sexe partiellement réversible en cas d'une perturbation endocrinienne œstrogénique et permanente en cas de perturbation endocrinienne androgénique (Morthorst et al. 2010). L'épinoche à trois épines présente une altération atypique du sexe ratio mâles / femelles phénotypique. Seul le médaka ne présente pas de restriction dans ces lignes directrices. Par conséquent, le médaka semble plus adapté que le poisson zèbre à l'évaluation de la perturbation endocrinienne. De plus, chez les vertébrés, il existe deux types de déterminisme génétique du sexe : les

femelles ont des chromosomes sexuels XX et les mâles des chromosomes sexuels XY ou alors les femelles ont des chromosomes sexuels ZW et les mâles des chromosomes sexuels ZZ. Les mammifères possèdent eux le premier système XX / XY. Par contre, chez les poissons, les amphibiens et les reptiles, les systèmes XX / XY et ZZ / ZW coexistent. Contrairement au poisson zèbre, le médaka possède comme l'Homme le système XX / XY (Wilson et al. 2014). Cet élément de plus indique que le médaka est plus adapté que le poisson zèbre pour l'évaluation de la perturbation endocrinienne du système hormonal des stéroïdes sexuels. De plus, le sexe génétique des médakas peut être déterminé par l'analyse par la réaction en chaîne par polymérase (PCR) du gène *dmy* présent sur le chromosome sexuel Y des mâles (Matsuda et al. 2002) (OCDE 2015). Cependant, l'analyse par PCR nécessite de réaliser un prélèvement de chaque individu par déterminer son sexe génétique. Cette technique est longue et incompatible avec nos besoins de criblage des ingrédients cosmétiques. Cependant, le sexe génétique des médakas pourrait être identifié par la création d'une lignée transgénique. En effet, le principe serait d'insérer après les régions régulant l'expression du gène *dmy*, un gène rapporteur codant une protéine fluorescente quantifiable. De cette manière, celle-ci serait synthétisée en même temps que le facteur de transcription DMY. Ainsi, la détection de la fluorescence permet de visualiser l'expression du gène *dmy* spécifique du chromosome Y. De plus, la quantification de la fluorescence permet de ne pas porter atteinte aux embryons transparents de médaka. De cette manière, l'expression de la protéine fluorescente chez les médakas de la lignée transgénique *dmy*:GFP permettrait d'identifier le sexe génétique mâle de l'embryon.

Par ailleurs, l'OCDE a reconnu en 2010 les modèles transgéniques poissons, et plus particulièrement la lignée transgénique médaka choriogénine (Chg : précurseur de protéines constitutives de l'enveloppe des œufs de poissons téléostes), comme outil potentiel à l'évaluation de la perturbation endocrinienne de l'axe œstrogénique (OCDE 2010). La Chg est normalement synthétisée dans le foie des femelles en réponse aux œstrogènes puis transportée jusqu'aux ovaires via la circulation sanguine. L'augmentation de la synthèse de Chg semble également être un évènement clé pertinent pour la prédiction d'un effet néfaste au niveau de l'organisme entier. De plus, chez le médaka, les variations du niveau d'expression du gène correspondant à la Chg seraient plus sensibles à celles du gène correspondant à la VTG suite à l'exposition à l'éthinylestradiol (hormone œstrogénique), au Nonylphénol (substance œstrogénique) et au Bisphénol A (substance œstrogénique) (Lee et al. 2002).

Pour mettre en évidence une perturbation endocrinienne de l'axe œstrogénique, il serait intéressant de créer une lignée multi-transgénique médaka porteur de différents

marqueurs fluorescents pour mettre en évidence à la fois le sexe phénotypique (déterminée par la transcription de la protéine Chg) et le sexe génotypique (déterminée par l'expression de du gène *dmy*) sans avoir recours à des techniques laborieuses et coûteuses.

Tous les organismes expriment une autofluorescence. Par conséquent, le choix des marqueurs fluorescents pour la création d'une lignée multitransgénique médaka doit tenir compte de l'autofluorescence des embryons de médaka au moment de la quantification de la fluorescence. En 2013, l'autofluorescence des alevins de médaka a déjà été caractérisée le jour de leur éclosion (Loire et al. 2013). La Figure 72 positionne différents marqueurs fluorescents comme la green fluorescent protein (GFP : marqueur fluorescent le plus couramment utilisé) sur le spectre d'autofluorescence d'alevins de médakas juste éclos. Les marqueurs fluorescents eBFP2 et le T-Sapphire s'expriment en dehors des zones d'autofluorescence des alevins de médaka. Ainsi, leur utilisation serait intéressante dans la création d'une lignée multi-transgénique.

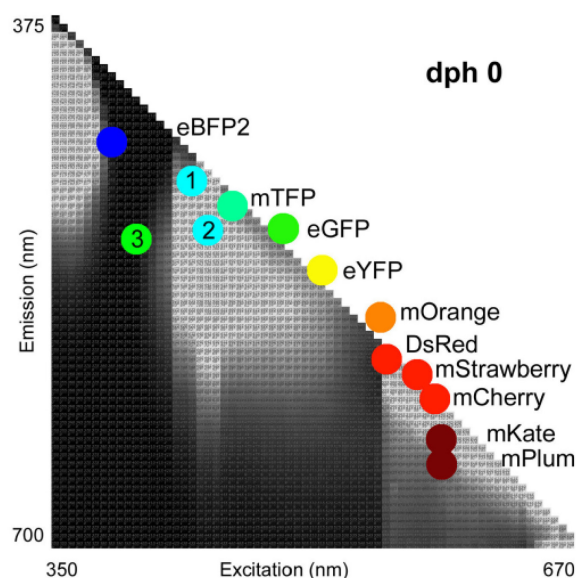


Figure 5. The auto-fluorescence spectrum of non-homogenised day 0 posthatch (dph0) wild-type medaka. The region containing the excitation and emission peaks of a panel of representative fluorescent proteins is superimposed onto the figure. The numbers 1 and 2 indicate the 2 peaks of enhanced cyan fluorescent protein (eCFP), and 3 indicates T-Sapphire. eBFP2 = enhanced blue fluorescent protein 2; mTFP = monomeric teal fluorescent protein; eGFP = enhanced green fluorescent protein; eYFP = enhanced yellow fluorescent protein; mOrange = monomeric orange fluorescent protein; mStrawberry = monomeric strawberry fluorescent protein; mCherry = monomeric cherry fluorescent protein; mKate = monomeric Katushka fluorescent protein; mPlum = monomeric plum fluorescent protein; T-Sapphire = turbo sapphire fluorescent protein. [Color figure can be seen in the online version of this article, available at wileyonlinelibrary.com]

Figure 72 : Spectre de l'autofluorescence d'alevins de médaka le jour de leur éclosion et positionnement des différents marqueurs fluorescents

Source : Loire et al. 2013

Remarque : Ces travaux ont fait l'objet d'une publication et d'un poster présentés en Annexe VII et VIII.

Cette lignée pourrait également intégrer des événements clés d'autres axes endocriniens comme la synthèse de la protéine spiggin normalement synthétisée par les poissons mâles épinoches sous l'influence d'androgènes pour la création d'un « nid » pour les œufs (Sébillot et al. 2014).

Cependant la création d'une telle lignée multi-transgénique nécessite plusieurs longues étapes. En effet, chaque lignée « monotransgénique » doit être créée et caractérisée afin de sélectionner celle dont l'expression du transgène correspond au profil d'expression du gène d'intérêt de manière quantifiable aux stades embryonnaires. Ensuite des tests doivent être mis au point pour déterminer la pertinence de chaque lignée monotransgénique différente sélectionnée sur une liste de substances de référence. Enfin, les lignées monotransgéniques sélectionnées doivent être croisées entre elles sur plusieurs générations pour obtenir la lignée multitransgénique homozygote.

L'utilisation d'une telle lignée multi-transgénique pour le test de tératogénicité utilisant les embryons de médaka permettrait d'élargir le champ d'application du test à la détection d'autres substances reprotoxiques, qui pourraient à la fois induire des malformations mais aussi altérer la fertilité.

4. Intégration dans une stratégie d'évaluation de la tératogénicité

Le test de tératogénicité réalisé sur les embryons de médaka permet de réaliser un criblage d'exclusion d'une partie des substances tératogènes de manière certaine grâce à l'obtention de 100 % de spécificité. Pour identifier les autres substances tératogènes, le test utilisant les embryons de médaka devra être combiné à d'autres outils complémentaires de l'évaluation de la reprotoxicité pour une stratégie globale d'évaluation.

Plusieurs stratégies d'évaluation des agents tératogènes ont été proposées dans la littérature scientifique. À notre connaissance, aucune ne correspond à l'ensemble des exigences imposées pour l'évaluation de substances nouvellement synthétisées par les industries cosmétiques. Par exemple, plusieurs propositions intègrent des tests *in vivo* exigés par le règlement REACH comme la ligne directrice OCDE n°414, non autorisée pour l'évaluation toxicologique des ingrédients cosmétiques ou encore le test WEC, qui nécessite l'euthanasie de rongeurs (Grindon et al. 2008).

Idéalement, la stratégie d'évaluation de la tératogénicité pour les besoins des industries cosmétiques devrait contenir un nombre d'outils nécessaire et suffisant (Figure 73).

Classiquement, ces outils devraient être *in chemico*, *in silico*, *in vitro* et *in vivo* à l'échelle du *vitro* et alternatif à l'expérimentation animale pour respecter le règlement sur les ingrédients cosmétiques.

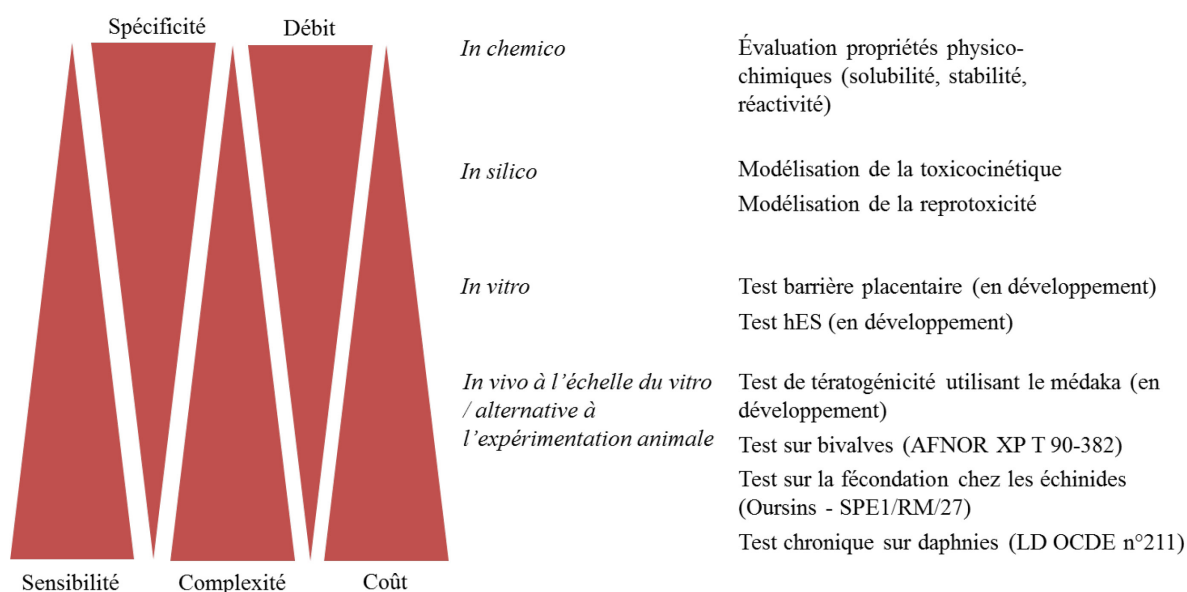


Figure 73 : Principe de l'élaboration d'une stratégie de criblage d'exclusion des substances tératogènes sans recours aux animaux définis par la directive 2010/63/UE

Avant la réalisation de n'importe quel test, la solubilité ainsi que la stabilité et la réactivité des substances à évaluer doivent être connues. En effet, ces informations sont nécessaires pour l'exploitation des autres outils comme les tests expérimentaux de la stratégie d'évaluation. Elles permettent de déterminer si les différents outils de la stratégie sont applicables à la substance chimique à évaluer. Par conséquent, ces outils *in chemico* doivent être placés en premier dans la stratégie.

Ensuite, des outils *in silico* de modélisation devraient également être intégrés notamment pour la prédiction de la toxicocinétique (prise en compte de l'absorption, de la distribution, de la métabolisation et de l'excrétion) de la substance. Par exemple, l'EURL-ECVAM en collaboration avec l'European Partnership for Alternative Approaches to Animal Testing (EPAA) développe des modèles type PBTK (Physiologically Based Toxicokinetic) (Bessemis et al. 2014). Les données issues de ces modèles aident à interpréter les résultats obtenus dans les différents outils de la stratégie, notamment en cas d'activation métabolique de la substance chimique. D'autres outils *in silico* comme la modélisation spécifique de la reprotoxicité pourraient également être intégrés. Parmi eux, le DART scheme de l'OECD Toolbox utilisé dans le cadre de ce manuscrit mais aussi les logiciels CAESAR ou MULTICASE mériteraient d'être étudiés.

Le test de tératogénicité utilisant les embryons de médaka ne donne pas d'informations mécanistiques. Celles-ci pourraient être apportées par des tests complémentaires *in vitro*. En 2013, une équipe japonaise a développé un système cellulaire multi-couche mimant la barrière placentaire humaine (Figure 74) (Miura et al. 2013). Ce système comprend une membrane de collagène recouverte d'un côté par des cellules trophoblastiques humaines (BeWo) et d'un autre côté recouverte de cellules endothéliales de veine ombilicale humaine. Couplée à la technique de la microfluidique, cette technologie permettrait de déterminer si une substance est capable de passer cette barrière et par conséquent, s'il est nécessaire de poursuivre l'évaluation de la tératogénicité de cette substance. Par conséquent, ce système est prometteur et mérite d'être intégré dans la stratégie d'évaluation de la tératogénicité.

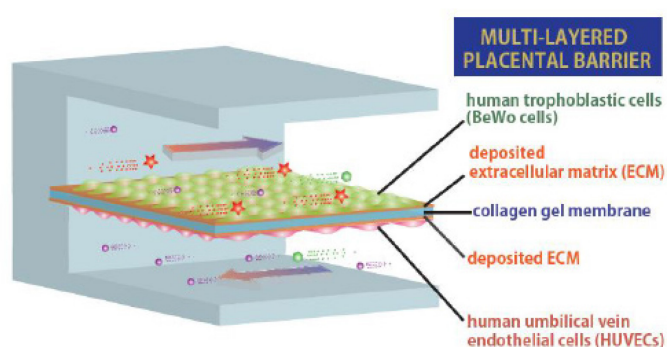


Figure 74 : Schéma du système cellulaire multi-couche mimant la barrière placentaire humaine

Source : Miura et al. 2013

Le test EST pourrait également être intégré dans sa version utilisant des cellules souches embryonnaires humaines (hES) issues de cellules dédifférenciées (Palmer et al. 2013). Le test hES, en plus de l'évaluation de l'embryotoxicité, tient également compte de paramètres métaboliques. En effet, le rapport entre deux marqueurs métaboliques mesurés dans le milieu de culture permet d'identifier des substances tératogènes. Ce test a été validé sur 10 substances et a obtenu 57 % de sensibilité pour 100 % de spécificité. Comme le test de tératogénicité utilisant les embryons de médaka, le test hES a été construit pour réaliser un criblage par exclusion des substances tératogènes. De plus, le test hES permet d'apporter des données issues de cellules humaines, que ne peut pas apporter notre test.

Enfin d'autres tests *in vivo* (sur organismes entiers) à l'échelle du *vitro* et alternatifs à l'expérimentation animale que notre test pourraient compléter cette stratégie. Parmi eux, la norme AFNOR XP T 90-382 « Détermination de la toxicité potentielle d'échantillons aqueux sur le développement embryon-larvaire de bivalve » utilise deux espèces marines : une espèce de moule et une espèce d'huître. Cette norme identifie spécifiquement les malformations induites par l'exposition au milieu de culture contenant la substance à tester. Ce test pourrait

peut-être permettre de détecter des substances identifiées Faux Négatifs dans notre test et ainsi permettre l'identification de plus d'agents tératogènes. Le test sur la fécondation chez les échinides (Oursins – Norme canadienne SPE1/RM/27) pourrait également être envisagé car il intègre également l'évaluation de la tératogénicité tout en ajoutant l'évaluation de la fertilité. Enfin, la ligne directrice OCDE n°211 *Daphnia magna* essai de reproduction requis par le règlement REACH pourrait également faire partie de la stratégie globale d'évaluation de la tératogénicité des substances chimiques. Ces deux derniers tests évaluant la fertilité seraient complémentaires au test utilisant les embryons de médaka. Ils pourraient également l'être en détectant des substances identifiées comme Faux Négatifs dans notre test.

Les outils *in chemico* et *in silico* devraient être positionnés en premier pour déterminer l'applicabilité des autres tests de la stratégie d'évaluation et aider à l'interprétation des résultats. De plus, ils possèdent généralement les débits les plus élevés et sont les moins coûteux. Ensuite, les tests *in vitro* pourraient apporter des informations mécanistiques sur les substances à évaluer. En cela, ils seraient complémentaires au test sur embryons de médaka. De plus, ils sont généralement moins longs et plus faciles à mettre en œuvre que les tests *in vivo* à l'échelle du *vitro*. Enfin, ces derniers utilisant des organismes entiers non définis par la directive européenne 2010/63/UE (moules, huitres, oursins, daphnies) pourraient également être complémentaires à notre test en permettant l'évaluation d'une autre partie de la reprotoxicité : la fertilité. Ils pourraient également identifier des substances identifiées comme Faux Négatifs dans notre test sur embryons de médaka.

Quoiqu'il en soit, pour déterminer l'arbre décisionnel de cette stratégie et le positionnement des outils les uns par rapport aux autres, ceux-ci devraient tous être évalués sur les bases d'une même liste de substances de référence. En fonction des résultats alors obtenus, la spécificité et la sensibilité de chaque outil pourraient être établies ainsi que la complémentarité entre eux pour l'identification correcte de l'ensemble des substances de référence. L'analyse de l'ensemble des résultats issus des tests sélectionnés pour la stratégie d'évaluation de la tératogénicité permettrait de déterminer le nombre nécessaire et suffisant d'outils pour la stratégie d'évaluation. Théoriquement, les tests les plus spécifiques avec les débits les plus élevés devraient être placés juste après les outils *in chemico* et *in silico*. Ceci devrait être le cas pour le test de tératogénicité utilisant les embryons de médaka, conçu pour être 100% spécifique. Néanmoins les considérations de débit et de coût par rapport aux autres tests pourraient modifier ce positionnement.

Le développement d'un test de tératogénicité nécessite tout d'abord d'établir une liste de substances de référence. Pour cela, l'analyse de l'ensemble des données disponibles (mentions réglementaire de danger de reprotoxicité, données épidémiologiques, données issues de tests sur rongeurs, propriétés physicochimiques, etc...) est nécessaire pour déterminer si une substance possède des données suffisamment fiables et confirmées pour être considérée comme une référence et si oui, comme une référence tératogène ou non.

Lors de la création et de la réalisation d'un test de tératogénicité, beaucoup de paramètres peuvent influencer les résultats de tératogénicité comme les conditions expérimentales, le choix et la mesure des malformations à identifier, mais aussi la méthode d'interprétation des effets tératogènes. Les conditions fixées dans notre test de tératogénicité sur les embryons de médaka permettent d'identifier correctement et avec certitude un agent tératogène sur deux parmi ceux de la liste de substances de référence évaluées. Par ailleurs, le médaka s'avère robuste avec un approvisionnement fiable toute l'année. De plus, le médaka est une espèce recommandée par l'OCDE pour l'évaluation environnementale des substances chimiques. Ainsi, le test de tératogénicité utilisant les embryons de médaka peut être considéré comme un nouveau test d'écotoxicité aquatique chronique avec ses limites liées à l'exposition à des substances hydrosolubles par baignade. Il s'agit également d'un test de criblage alternatif à l'expérimentation animale avec un débit augmenté et un coût diminué par rapport aux tests *in vivo* sur rongeurs requis par le règlement REACH.

Les performances du test pourraient être améliorées par son automatisation (positionnement des médakas, acquisition et analyse des paramètres d'effets). La liste de substances de référence pourrait être élargie à des substances moins hydrosolubles, à des agents tératogènes d'autre nature et à d'autres types de malformations induites. Le champ d'application du test pourrait être étendu à l'évaluation de certaines perturbations endocriniennes de l'axe stéroïde sexuel via l'utilisation d'une lignée multi-transgénique. Néanmoins, le test de tératogénicité utilisant les embryons de médaka est un outil de criblage par exclusion et ne détecte pas tous les agents tératogènes. C'est pourquoi il doit être intégré dans une stratégie d'évaluation de la tératogénicité comprenant des outils *in chemico*, *in silico*, *in vitro* et d'autres méthodes alternatives à l'expérimentation animale. Le positionnement de ces outils les uns par rapport aux autres reste à établir en fonction de leur performance, suite à l'évaluation d'une même liste de substances de référence.

Conclusion

La tératologie est une étude complexe couvrant des domaines scientifiques très différents comme la chimie, l'embryologie ou encore la physiologie. La multiplicité des mécanismes conduisant aux effets tératogènes d'une substance chimique rend l'évaluation de sa toxicité difficile. Depuis 2013, la réglementation européenne interdit les tests sur animaux pour l'évaluation des produits cosmétiques et de leurs constituants. Or, les tests réglementaires d'évaluation de la tératogénicité sont réalisés *in vivo* sur mammifères. C'est pourquoi l'évaluation de la tératogénicité des produits cosmétiques nécessite le développement de méthodes alternatives à l'expérimentation animale.

L'objectif de cette thèse a été de développer un test de criblage pour l'évaluation de la tératogénicité des ingrédients cosmétiques. Ce test, utilise des embryons de poisson médaka dont l'utilisation des premiers stades de développement, est reconnue comme éthiquement acceptables pour le développement de méthodes alternatives à l'expérimentation animale. Le poisson médaka (*Oryzias latipes*) est un organisme modèle de l'OCDE pour l'évaluation environnementale. Cet organisme a été préféré au poisson zèbre (*Danio rerio*) et au xénope (*Xenopus laevis*) pour la fiabilité de son approvisionnement, la robustesse de ses stades embryonnaires lors des manipulations, ainsi que pour les performances du test l'utilisant.

Ce projet a nécessité d'établir une liste de substances de référence équilibrée en substances tératogènes et non tératogènes. Cependant, certaines données de tératogénicité s'avèrent contradictoires selon les différentes sources d'information. Les données épidémiologiques de tératogénicité chez l'Homme sont les plus fiables mais aussi les plus rares. Les données les plus nombreuses sont celles générées dans les tests réglementaires sur mammifères de laboratoire. L'analyse croisée de l'ensemble des données *in silico* et *in vivo* a permis d'établir une liste de 43 substances de référence. Il est important de retenir que la composition de cette liste de substances a un impact direct sur les performances du test notamment lorsque la spécificité du test est fixée à 100 %. D'autres paramètres vont influencer les résultats d'un test de tératogénicité comme les conditions expérimentales, le choix et la mesure des malformations à identifier ainsi que la méthode d'interprétation des effets tératogènes.

Le test de tératogénicité utilisant les embryons de médaka que nous avons mis au point, permet de détecter les agents tératogènes les plus puissants, c'est-à-dire qu'il a une sensibilité suffisante pour en détecter plus de la moitié des substances tératogènes de notre liste. Son taux de spécificité est fixé à 100 % pour identifier correctement toutes les substances dont l'absence d'effets tératogènes chez l'homme ou un organisme modèle mammifère, est avérée. Enfin, ce test se révèle moins coûteux et moins long que les tests de tératogénicité utilisant des organismes modèles mammifères. Il pourrait ainsi être proposé, comme un test alternatif à l'expérimentation animale à la nouvelle ligne directrice OCDE n°240 « Étude étendue de toxicité pour la reproduction sur une génération chez médaka ».

Les performances de ce test pourraient être améliorées par son automatisation (positionnement des médakas, acquisition et analyse des paramètres d'effets) et par l'intégration de la quantification de nouveaux paramètres en lien avec des malformations fonctionnelles. Le champ d'application du test pourrait être également étendu à l'évaluation de certaines perturbations endocriniennes de l'axe stéroïde sexuel via l'utilisation d'une lignée multi-transgénique.

Quoiqu'il en soit, un modèle a toujours ces limites et un test, basé sur une seule espèce ne peut pas être suffisant pour prédire l'innocuité d'une substance chimique chez l'Homme. Par conséquent, notre test doit être intégré dans une stratégie d'évaluation de la tératogénicité intégrant des données sur les propriétés physicochimiques et les résultats de tests *in vitro* (cellules humaines) ou *in vivo* sur d'autres organismes compatibles avec les méthodes alternatives à l'expérimentation animale. Le positionnement de ces différents outils les uns par rapport aux autres, reste à établir en fonction de leurs performances respectives.

Bibliographie

Articles scientifiques

- (US), N.R.C., 2000. *Scientific frontiers in developmental toxicology and risk assessment*, National Academies Press, Washington, DC.
- Adler, S. et al., 2011. Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. *Archives of toxicology*, 85(5), pp.367–485.
- AFSSAPS, 2011. Complications liées à l'exposition in utero au diéthylstilbestrol (DES) (Distilbène®, Stilboestrol-Borne®) Actualisation 2011 ., p.9.
- Agzarian, J. & Foster, W.G., 2004. Towards Less Confusing Terminology in Endocrine Disrupter Research.
- Ahmad, F. et al., 2012. Zebrafish embryos and larvae in behavioural assays. *Behaviour*, 149(10-12), pp.1241–1281.
- Aneck-Hahn, N.H. et al., 2007. Impaired semen quality associated with environmental DDT exposure in young men living in a malaria area in the Limpopo Province, South Africa. *Journal of Andrology*, 28(3), pp.423–434.
- Artavanis-Tsakonas, S. & Muskavitch, M., 2010. Notch: the past, the present, and the future. *Curr. Top. Dev. Biol.*, 92, pp.1–29.
- ATSDR, 2002. *Toxicological profile for DDT, DDE, DDD*, US Department of Health and Human Services, Public Health Service Atlanta, GA.
- Bailey, J., Knight, A. & Balcombe, J., 2005. The future of teratology research is in vitro. *Biogenic Amines*, 19(2), pp.97–145.
- Bantle, J.A. et al., 1991. *Atlas of abnormalities: a guide for the performance of FETAX.*, Stillwater, Okla.: Printing Services, Oklahoma State University.
- Bantle, J.A. et al., 1994. Initial interlaboratory validation study of FETAX: phase I testing. *Journal of Applied Toxicology*, 14(3), pp.213–223.
- Bantle, J.A. et al., 1999. Phase III interlaboratory study of FETAX part 3. FETAX validation using 12 compounds with and without an exogenous metabolic activation system. *Journal of Applied Toxicology*, 19(6), pp.447–472.
- Barjhoux, I. et al., 2014. Transcriptional responses and embryotoxic effects induced by pyrene and methylpyrene in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) early life stages exposed to spiked sediments. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(24), pp.13850–13866.

- Barton, S., 2013. Teratology Testing Under REACH. In *Teratogenicity Testing*. Springer, pp. 57–72.
- Bauer, K.S., Dixon, S.C. & Figg, W.D., 1998. Inhibition of angiogenesis by thalidomide requires metabolic activation, which is species-dependent. *Biochemical pharmacology*, 55(11), pp.1827–1834.
- Beekhuijzen, M. et al., 2015. From cutting edge to guideline: A first step in harmonization of the zebrafish embryotoxicity test (ZET) by describing the most optimal test conditions and morphology scoring system. *Reproductive Toxicology*, 56, pp.64–76.
- Bessems, J.G. et al., 2014. PBTK modelling platforms and parameter estimation tools to enable animal-free risk assessment: recommendations from a joint EPAA-EURL ECVAM ADME workshop. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 68(1), pp.119–139.
- Le Bihanic, F. et al., 2015. Environmental concentrations of benz [a] anthracene induce developmental defects and DNA damage and impair photomotor response in Japanese medaka larvae. *Ecotoxicology and environmental safety*, 113, pp.321–328.
- Blaser, R.E. & Peñalosa, Y.M., 2011. Stimuli affecting zebrafish (*Danio rerio*) behavior in the light/dark preference test. *Physiology & behavior*, 104(5), pp.831–7.
- Boga Pekmezekmek, A. et al., 2014. Evaluating the Teratogenicity of Ritodrine and Nifedipine using a Frog Embryo Teratogenesis assay (FETAX). *Drug and chemical toxicology*, (0), pp.1–12.
- Bornman, R. et al., 2010. DDT and urogenital malformations in newborn boys in a malarial area. *BJU international*, 106(3), pp.405–11.
- Bouwman, H. et al., 2013. *DDT: fifty years since Silent Spring*, European Environment Agency.
- Brannen, K.C. et al., 2010. Development of a zebrafish embryo teratogenicity assay and quantitative prediction model. *Birth defects research. Part B, Developmental and reproductive toxicology*, 89(1), pp.66–77.
- Braunbeck, T. et al., 2014. The fish embryo test (FET): origin, applications, and future. *Environmental Science and Pollution Research*, pp.1–15.
- Brent, R.L., 2010. Letter to the Editor: Reproductive Toxicology. *The Selected Works of Robert Brent*, p.23.
- Brent, R.L., 2001. The cause and prevention of human birth defects: What have we learned in the past 50 years? *Congenital Anomalies*, 41(1), pp.3–21.
- Brown, N.A. & Fabro, S., 1983. The value of animal teratogenicity testing for predicting human risk. *Clinical obstetrics and gynecology*, 26(2), pp.467–477.

- Bugel, S.M., Tanguay, R.L. & Planchart, A., 2014. Zebrafish: a marvel of high-throughput biology for 21st century toxicology. *Current environmental health reports*, 1(4), pp.341–352.
- Van der Burg, B. et al., 2015. The ChemScreen project to design a pragmatic alternative approach to predict reproductive toxicity of chemicals. *Reproductive Toxicology*.
- Burns, C.J. et al., 2013. Pesticide exposure and neurodevelopmental outcomes: review of the epidemiologic and animal studies. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 16(3-4), pp.127–283.
- Burrows, R.F. & Burrows, E.A., 1998. Assessing the teratogenic potential of angiotensin-converting enzyme inhibitors in pregnancy. *The Australian & New Zealand journal of obstetrics & gynaecology*, 38(3), pp.306–11.
- Busquet, F. et al., 2008. Development of a new screening assay to identify proteratogenic substances using zebrafish *Danio rerio* embryo combined with an exogenous mammalian metabolic activation system (mDarT). *Toxicological sciences*, 104(1), pp.177–188.
- Busquet, F. et al., 2014. OECD validation study to assess intra-and inter-laboratory reproducibility of the zebrafish embryo toxicity test for acute aquatic toxicity testing. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 69(3), pp.496–511.
- Byard, J.L. et al., 2015. DDT, Chlordane, Toxaphene and PCB Residues in Newport Bay and Watershed: Assessment of Hazard to Wildlife and Human Health. In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 235*. Springer, pp. 49–168.
- Capelari, D.N. et al., 2012. Effects of maternal captopril treatment during late pregnancy on neonatal lung development in rats. *Regulatory peptides*, 177(1), pp.97–106.
- Carletta, J., 1996. Assessing agreement on classification tasks: the kappa statistic. *Computational linguistics*, 22(2), pp.249–254.
- Chaube, S. & Murphy, M., 1968. The teratogenic effects of the recent drugs active in cancer chemotherapy. *Advances in teratology*, 3, pp.181–237.
- Chaube, S. & Murphy, M.L., 1966. The effects of hydroxyurea and related compounds on the rat fetus. *Cancer research*, 26(7 Part 1), pp.1448–1457.
- Ben-Chetrit, E. & Levy, M., 1998. Colchicine: 1998 update. In *Seminars in arthritis and rheumatism*. pp. 48–59.
- Chiffre, A. et al., 2014. Psychotropic drugs in mixture alter swimming behaviour of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) larvae above environmental concentrations. *Environmental Science and Pollution Research*, pp.1–14.
- Christianson, A., Howson, C.P. & Modell, B., 2006. March of Dimes. *Global report on birth defects. The hidden toll of dying and disable children*. New York: White Plains, pp.29–35.

- Chung, F. et al., 2004. Thalidomide pharmacokinetics and metabolite formation in mice, rabbits, and multiple myeloma patients. *Clinical cancer research*, 10(17), pp.5949–5956.
- Clarkson, T.W., 2002. The three modern faces of mercury. *Environmental Health Perspectives*, 110(Suppl 1), p.11.
- Cohn, B.A. et al., 2015. DDT Exposure in Utero and Breast Cancer. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, p.jc–2015.
- Colman, J.R. et al., 2005. Teratogenic effects of azaspiracid-1 identified by microinjection of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) embryos. *Toxicol*, 45(7), pp.881–890.
- Daston, G.P. et al., 2014. Exposure-Based Validation List for Developmental Toxicity Screening Assays. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*, 101(6), pp.423–428.
- Delahunt, C. & Lassen, L., 1964. Thalidomide syndrome in monkeys. *Science*, 146(3649), pp.1300–1305.
- Ducharme, N.A. et al., 2013. Meta-analysis of toxicity and teratogenicity of 133 chemicals from zebrafish developmental toxicity studies. *Reproductive Toxicology*, 41, pp.98–108.
- Einarson, A. et al., 1997. Prospective controlled study of hydroxyzine and cetirizine in pregnancy. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 78(2), pp.183–186.
- Embry, M.R. et al., 2010. The fish embryo toxicity test as an animal alternative method in hazard and risk assessment and scientific research. *Aquatic Toxicology*, 97(2), pp.79–87.
- De Esch, C. et al., 2012. Locomotor activity assay in zebrafish larvae: influence of age, strain and ethanol. *Neurotoxicology and teratology*, 34(4), pp.425–433.
- Eto, K., 1999. Minamata Disease. *Journal of Neuropathology*, 20, pp.S14–S19.
- Eto, K., 1997. Review article: pathology of minamata disease. *Toxicologic pathology*, 25(6), pp.614–623.
- EURL-ECVAM, 2006. Embryonic Stem Cell Test (EST) INVITTOX n° 113.
- EURL-ECVAM, 2010. Embryotoxicity Testing in Post-Implantation Whole Embryo Culture (WEC) - Method of Piersma DB-ALM Protocol n° 123.
- EURL-ECVAM, 2002. The Micromass Test - Method of Brown INVITTOX n° 122.
- EUROCAT, 2015. EUROCAT Prevalence Data Tables France.
- Exbrayat, J.-M., 2014. From bony fishes to mammals: reproductive cycles in vertebrates, hormones and hormone-receptors. *Receptors & Clinical Investigation*, 1(3), pp.10–14800.

- Fenske, M. et al., 2005. An environmentally relevant concentration of estrogen induces arrest of male gonad development in zebrafish, *Danio rerio*. *Environmental toxicology and chemistry / SETAC*, 24(5), pp.1088–98.
- Ferm, V.H., 1963. Colchicine teratogenesis in hamster embryos. *Experimental Biology and Medicine*, 112(3), pp.775–778.
- Ferrario, D., Brustio, R. & Hartung, T., 2014. t4 Report* Glossary of Reference Terms for Alternative Test Methods and their Validation. *Altex*, 31(3/14), p.319.
- Fort, D.J. et al., 2003. Evaluation of the developmental toxicities of ethanol, acetaldehyde, and thioacetamide using FETAX. *Drug and chemical toxicology*, 26(1), pp.23–34.
- Fox, M.A. & Aoki, Y., 2010. Environmental contaminants and exposure. *Environmental Impacts on Reproductive Health and Fertility*, pp.8–22.
- Frias, J.L. & Carey, J., 1995. Mild errors of morphogenesis. *Advances in pediatrics*, 43, pp.27–75.
- Frias, J.L. & Gilbert-Barnes, E., 2008. Human teratogens: current controversies. *Advances in pediatrics*, 55(1), pp.171–211.
- Fry, D.M. & Toone, C.K., 1981. DDT-induced feminization of gull embryos. *Science*, 213(4510), pp.922–924.
- Gilbert-Barnes, E., 2010. Teratogenic causes of malformations. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 40(2), pp.99–114.
- Giles, J.J. & Bannigan, J.G., 2006. Teratogenic and developmental effects of lithium. *Current pharmaceutical design*, 12(12), pp.1531–1541.
- Goldstone, J.V. et al., 2010. Identification and developmental expression of the full complement of Cytochrome P450 genes in Zebrafish. *BMC genomics*, 11, p.643.
- Grandjean, P. et al., 2008. The Faroes statement: human health effects of developmental exposure to chemicals in our environment. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 102(2), pp.73–75.
- Grandjean, P. & Landrigan, P.J., 2006. Developmental neurotoxicity of industrial chemicals. *The Lancet*, 368(9553), pp.2167–2178.
- Gray, L. et al., 2001. Effects of environmental antiandrogens on reproductive development in experimental animals. *Apmis*, 109(S103), pp.S302–S319.
- Greenwood, M.R., 1985. Methylmercury poisoning in Iraq. An epidemiological study of the 1971-1972 outbreak. *Journal of applied toxicology : JAT*, 5(3), pp.148–59.
- Grindon, C. et al., 2008. Integrated decision-tree testing strategies for developmental and reproductive toxicity with respect to the requirements of the EU REACH legislation. *ATLA-Alternatives to Laboratory Animals*, 36(1), p.123.

- Guerrero-Bosagna, C. & Skinner, M.K., 2012. Environmentally induced epigenetic transgenerational inheritance of phenotype and disease. *Molecular and cellular endocrinology*, 354(1), pp.3–8.
- Guillette, L.J. et al., 1999. Plasma steroid concentrations and male phallus size in juvenile alligators from seven Florida lakes. *General and comparative endocrinology*, 116(3), pp.356–72.
- Hansen, J.M. & Harris, C., 2004. A novel hypothesis for thalidomide-induced limb teratogenesis: redox misregulation of the NF- κ B pathway. *Antioxidants and Redox Signaling*, 6(1), pp.1–14.
- Harris, R. & Waring, R., 2012. Diethylstilboestrol—a long-term legacy. *Maturitas*, 72(2), pp.108–112.
- Herbst, A.L. et al., 1981. Reproductive and gynecologic surgical experience in diethylstilbestrol-exposed daughters. *American journal of obstetrics and gynecology*, 141(8), pp.1019–1028.
- Herbst, A.L., Ulfelder, H. & Poskanzer, D.C., 1971. Adenocarcinoma of the vagina: association of maternal stilbestrol therapy with tumor appearance in young women. *New England journal of medicine*, 284(16), pp.878–881.
- Hilakivi-Clarke, L., 2014. Maternal exposure to diethylstilbestrol during pregnancy and increased breast cancer risk in daughters. *Breast Cancer Res*, 16, p.208.
- Hirasawa, R. & Feil, R., 2010. Genomic imprinting and human disease. *Essays Biochem*, 48, pp.187–200.
- Howe, K. et al., 2013. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, 496(7446), pp.498–503.
- Hu, L. et al., 2015. Use of the enhanced frog embryo teratogenesis assay-*Xenopus* (FETAX) to determine chemically-induced phenotypic effects. *Science of The Total Environment*, 508, pp.258–265.
- Hyoun, S.C., Obi\vcn, S.G. & Scialli, A.R., 2012. Teratogen update: methotrexate. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*, 94(4), pp.187–207.
- INERIS, 2010. Mercure et ses dérivés Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques, ed.
- Ingalls, T.H., Curley, F.J. & Zappasodi, P., 1968. Colchicine-induced craniofacial defects in the mouse embryo. *Archives of Environmental Health: An International Journal*, 16(3), pp.326–332.
- Ito, T. et al., 2010. Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity. *science*, 327(5971), pp.1345–1350.

- Ito, T., Ando, H. & Handa, H., 2011. Teratogenic effects of thalidomide: molecular mechanisms. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(9), pp.1569–1579.
- Iwamatsu, T., 2004. Stages of normal development in the medaka *Oryzias latipes*. *Mechanisms of development*, 121(7), pp.605–618.
- Iyer, P. & Makris, S., 2010. Developmental and reproductive toxicology of pesticides. *Handbook of pesticide toxicology*, 1, pp.375–423.
- Jager, C. et al., 2006. Reduced Seminal Parameters Associated With Environmental DDT Exposure and p, p'-DDE Concentrations in Men in Chiapas, Mexico: A Cross-Sectional Study. *Journal of andrology*, 27(1), pp.16–27.
- Jones, K.L., Jones, M.C. & Del Campo, M., 2013. *Smith's recognizable patterns of human malformation*, Elsevier Health Sciences.
- K, M. & M, S., 2011. Minamata Disease. *Encyclopedia of Environmental Health*, pp.774–780.
- Kaikkonen, M.U., Lam, M.T. & Glass, C.K., 2011. Non-coding RNAs as regulators of gene expression and epigenetics. *Cardiovascular research*, 90(3), pp.430–440.
- Kao, K.R. & Elinson, R.P., 1988. The entire mesodermal mantle behaves as Spemann's organizer in dorsoanterior enhanced *Xenopus laevis* embryos. *Developmental biology*, 127(1), pp.64–77.
- Kasahara, M. et al., 2007. The medaka draft genome and insights into vertebrate genome evolution. *Nature*, 447(7145), pp.714–719.
- Kim, J. et al., 2011. Evaluation on potential for assessing indoor formaldehyde using biosensor system based on swimming behavior of Japanese medaka (*oryzias latipes*). *Building and Environment*, 46(4), pp.849–854.
- Kim, J.H. & Scialli, A.R., 2011. Thalidomide: the tragedy of birth defects and the effective treatment of disease. *Toxicological Sciences*, 122(1), pp.1–6.
- Kimmel, C.B. et al., 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental dynamics*, 203(3), pp.253–310.
- King, C. & Howell, J., 1966. Teratogenic effect of buclizine and hydroxyzine in the rat and chlorcyclizine in the mouse. *Am J Obstet Gynecol*, 95(1), pp.109–11.
- Knapen, D. et al., 2015. The potential of AOP networks for reproductive and developmental toxicity assay development. *Reproductive toxicology (Elmsford, NY)*, 56, pp.52–55.
- Knight, J. & Rovida, C., 2014. Safety Evaluations Under the Proposed US Safe Cosmetics and Personal Care Products Act of 2013: Animal Use and Cost Estimates. *Alternatives to Animal Experimentation: ALTEX*, 31(2), pp.117–208.
- Kowalski, T.W. et al., 2015. Thalidomide embryopathy: Follow-up of cases born between 1959 and 2010. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*.

- Lacassagne, A., 1938. The appearance of mammary adenocarcinomas in male mice treated by synthetic estrogenic substance. *Weekly Reports of the Society of Biology and of its Affiliates*, 12, pp.641–643.
- Lantz-McPeak, S. et al., 2015. Developmental toxicity assay using high content screening of zebrafish embryos. *Journal of Applied Toxicology*, 35(3), pp.261–272.
- Lee, C. et al., 2002. Choriogenin mRNA induction in male medaka, *Oryzias latipes* as a biomarker of endocrine disruption. *Aquatic toxicology*, 61(3), pp.233–241.
- Legradi, J. et al., 2014. Comparability of behavioural assays using zebrafish larvae to assess neurotoxicity. *Environmental Science and Pollution Research*, pp.1–13.
- Lepper, E.R. et al., 2006. Thalidomide metabolism and hydrolysis: mechanisms and implications. *Current drug metabolism*, 7(6), pp.677–685.
- Loire, N. et al., 2013. Optimizing fluorescent protein choice for transgenic embryonic medaka models. *Environmental toxicology and chemistry / SETAC*, 32(10), pp.2396–401.
- Lopez-Girona, A. et al., 2012. Cereblon is a direct protein target for immunomodulatory and antiproliferative activities of lenalidomide and pomalidomide. *Leukemia*, 26(11), pp.2326–35.
- Lu, Q. et al., 2015. The distribution of Polychlorinated Biphenyls (PCBs) in the River Thames Catchment under the scenarios of climate change. *Science of The Total Environment*, 533, pp.187–195.
- Lubick, N., 2010. PESTICIDES: Examining DDT's Urogenital Effects. *Environmental health perspectives*, 118(1), p.A18.
- MacPhail, R. et al., 2009. Locomotion in larval zebrafish: influence of time of day, lighting and ethanol. *Neurotoxicology*, 30(1), pp.52–58.
- Mahony, C. et al., 2013. Pomalidomide is nonteratogenic in chicken and zebrafish embryos and nonneurotoxic in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(31), pp.12703–8.
- Matsuda, M. et al., 2002. DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature*, 417(6888), pp.559–563.
- McDermott, S. et al., 2012. When are fetuses and young children most susceptible to soil metal concentrations of arsenic, lead and mercury? *Spatial and spatio-temporal epidemiology*, 3(3), pp.265–72.
- Meeker, J.D., 2010. Exposure to environmental endocrine disrupting compounds and men's health. *Maturitas*, 66(3), pp.236–241.
- Miller, M.T. & Strömland, K.K., 2011. What can we learn from the thalidomide experience: an ophthalmologic perspective. *Current opinion in ophthalmology*, 22(5).

- Minier, C. et al., 2006. A pollution-monitoring pilot study involving contaminant and biomarker measurements in the Seine Estuary, France, using zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25(1), pp.112–119.
- Miura, S., Morimoto, Y. & Takeuchi, S., 2013. Multi-layered placental barrier structure integrated with microfluidic channels. In *Micro Electro Mechanical Systems (MEMS), 2013 IEEE 26th International Conference on*. pp. 257–258.
- Mohanty, N. & Boettger-Tong, H., 2005. Comparative effects of all-trans and 9-cis retinoic acid on Medaka (*Oryzias latipes*) development. *Bios*, 76(1), pp.1–8.
- Montes-Grajales, D., Olivero-Verbel, J. & Cabarcas-Montalvo, M., 2013. DDT and derivatives may target insulin pathway proteins. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 24(4), pp.558–572.
- Morthorst, J.E., Holbech, H. & Bjerregaard, P., 2010. Trenbolone causes irreversible masculinization of zebrafish at environmentally relevant concentrations. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 98(4), pp.336–43.
- Mylchreest, E. & Harris, S.B., 2013. Historical Control Data in Reproductive and Developmental Toxicity Studies. In *Teratogenicity Testing*. Springer, pp. 275–294.
- Nagel, R. & others, 2002. DarT: The embryo test with the Zebrafish *Danio rerio*-a general model in ecotoxicology and toxicology. *Altex*, 19, p.38.
- Nguyen, C.T. et al., 2008. Zebrafish as a model for cardiovascular development and disease. *Drug Discovery Today: Disease Models*, 5(3), pp.135–140.
- Nieuwkoop, P., Faber, J. & Gurdon, J., 1995. Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin). *Trends in Genetics*, 11(10), p.418.
- Nieuwkoop, P.D., Faber, J. & others, 1956. Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin). A systematical and chronological survey of the development from the fertilized egg till the end of metamorphosis. *Normal table of Xenopus laevis (Daudin). A systematical and chronological survey of the development from the fertilized egg till the end of metamorphosis.*, 22.
- OECD, 2008. *Guidance Document On Mammalian Reproductive Toxicity Testing And Assessment*, Series On Testing And Assessment Number 43 ENV/JM/MONO(2008)16.
- OMS, 2010. *Malformations congénitales: rapport du Secrétariat*, Organisation Mondiale de la Santé.
- Orgogozo, J. & Loiseau, P., 1977. Effets tératogènes et oncogènes des médicaments du système nerveux central. *Neurologie RP, tome, 27*, pp.27–35.
- Ouyang, F. et al., 2005. Serum DDT, age at menarche, and abnormal menstrual cycle length. *Occupational and Environmental Medicine*, 62(12), pp.878–884.

- Palmer, J.A. et al., 2013. Establishment and Assessment of a New Human Embryonic Stem Cell-Based Biomarker Assay for Developmental Toxicity Screening. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*, 98(4), pp.343–363.
- Parham, F. et al., 2012. Adverse effects in risk assessment: Modeling polychlorinated biphenyls and thyroid hormone disruption outcomes in animals and humans. *Environmental research*, 116, pp.74–84.
- Perrichon, P. et al., 2014. Influence of sediment composition on PAH toxicity using zebrafish (*Danio rerio*) and Japanese medaka (*Oryzias latipes*) embryo-larval assays. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(24), pp.13703–13719.
- Perry, M.J. et al., 2006. A prospective study of serum DDT and progesterone and estrogen levels across the menstrual cycle in nulliparous women of reproductive age. *American journal of epidemiology*, 164(11), pp.1056–1064.
- Petit, T.L. & Isaacson, R.L., 1976. Anatomical and behavioral effects of colchicine administration to rats late in utero. *Developmental psychobiology*, 9(2), pp.119–129.
- Polifka, J.E. & Friedman, J.M., 1999. Clinical teratology: identifying teratogenic risks in humans. *Clinical genetics*, 56(6), pp.409–20.
- Pons, J. et al., 1988. Devenir des grossesses des patientes exposées in utero au diéthylstilboestrol: enquête du collège national des gynécologues et obstétriciens français. *Journal de gynécologie obstétrique et biologie de la reproduction*, 17(3), pp.307–316.
- Prati, M. et al., 2000. Ecotoxicological soil evaluation by FETAX. *Chemosphere*, 41(10), pp.1621–1628.
- Puybareau, É., Léonard, M. & Talbot, H., 2015. An Automated Assay for the Evaluation of Mortality in Fish Embryo. In *Mathematical Morphology and Its Applications to Signal and Image Processing*. Springer, pp. 110–121.
- Pype, C. et al., 2015. Incubation at 32.5° C and above causes malformations in the zebrafish embryo. *Reproductive Toxicology*.
- Reed, C.E. & Fenton, S.E., 2013. Exposure to diethylstilbestrol during sensitive life stages: a legacy of heritable health effects. *Birth defects research. Part C, Embryo today : reviews*, 99(2), pp.134–46.
- Ribas-Fitó, N. et al., 2006. In utero exposure to background concentrations of DDT and cognitive functioning among preschoolers. *American journal of epidemiology*, 164(10), pp.955–962.
- Rosemore, B.J. & Welsh, C.A., 2012. The effects of rearing density, salt concentration, and incubation temperature on Japanese medaka (*Oryzias latipes*) embryo development. *Zebrafish*, 9(4), pp.185–190.

- Rovida, C. & Hartung, T., 2009. Re-evaluation of animal numbers and costs for in vivo tests to accomplish REACH legislation requirements for chemicals—a report by the transatlantic think tank for toxicology (t (4)). *Altex*, 26(3), pp.187–208.
- Sagiv, S.K. et al., 2010. Prenatal organochlorine exposure and behaviors associated with attention deficit hyperactivity disorder in school-aged children. *American journal of epidemiology*, 171(5), pp.593–601.
- Schenk, B. et al., 2010. The ReProTect Feasibility Study, a novel comprehensive *in vitro* approach to detect reproductive toxicants. *Reproductive Toxicology*, 30(1), pp.200–218.
- Scialli, A.R., 2008. The challenge of reproductive and developmental toxicology under REACH. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 51(2), pp.244–250.
- Sébillot, A. et al., 2014. Rapid Fluorescent Detection of (Anti) androgens with spiggin-gfp Medaka. *Environmental science & technology*, 48(18), pp.10919–10928.
- Selderslaghs, I.W., Blust, R. & Witters, H.E., 2012. Feasibility study of the zebrafish assay as an alternative method to screen for developmental toxicity and embryotoxicity using a training set of 27 compounds. *Reproductive Toxicology*, 33(2), pp.142–154.
- Selderslaghs, I.W.T. et al., 2009. Development of a screening assay to identify teratogenic and embryotoxic chemicals using the zebrafish embryo. *Reproductive Toxicology*, 28(3), pp.308–320.
- Al-Shabanah, O. et al., 1991. The effect of maternal administration of captopril on fetal development in rat. *Research communications in chemical pathology and pharmacology*, 73(2), pp.221–230.
- Shanks, N., Greek, R. & Greek, J., 2009. Are animal models predictive for humans? *Philosophy, Ethics, and Humanities in Medicine*, 4(1), p.2.
- Shepard, T.H., 2010. *Catalog of teratogenic agents*, JHU Press.
- Ben-Simon, A., Ben-Shahar, O. & Segev, R., 2009. Measuring and tracking eye movements of a behaving archer fish by real-time stereo vision. *Journal of neuroscience methods*, 184(2), pp.235–243.
- Sipes, N.S. et al., 2011. Predictive models of prenatal developmental toxicity from ToxCast high-throughput screening data. *Toxicological Sciences*, 124(1), pp.109–127.
- Slooff, W. et al., 1995. Integrated criteria document mercury. *RIVM Rapport 601014008*.
- Smith, K.E.C., Oostingh, G.J. & Mayer, P., 2010. Passive dosing for producing defined and constant exposure of hydrophobic organic compounds during in vitro toxicity tests. *Chemical research in toxicology*, 23(1), pp.55–65.
- Smith, O.W., Smith, G. van S. & Hurwitz, D., 1946. Increased excretion of pregnanediol in pregnancy from diethylstilbestrol with special reference to the prevention of late pregnancy accidents. *Obstetrical & Gynecological Survey*, 1(4), p.478.

- Smithells, R. & Newman, C., 1992. Recognition of thalidomide defects. *Journal of medical genetics*, 29(10), p.716.
- Sogorb, M.A. et al., 2014. An integrated approach for detecting embryotoxicity and developmental toxicity of environmental contaminants using in vitro alternative methods. *Toxicology letters*, 230(2), pp.356–367.
- Spézia, F. & Barrow, P.C., 2013. The teratology testing of cosmetics. In *Teratogenicity Testing*. Springer, pp. 91–94.
- Spranger, J. & others, 1983. Errors of morphogenesis: Concepts and terms. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 71(1), pp.158–159.
- Stadler, J., 2011. Developmental and reproductive toxicology. *Pharmaceutical Toxicology in Practice: A Guide to Non-clinical Development*, p.165.
- Stephens, T.D., 2009. The effect of thalidomide in chicken embryos. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*, 85(8), pp.725–731.
- Strecker, R., Weigt, S. & Braunbeck, T., 2013. Cartilage and bone malformations in the head of zebrafish (*Danio rerio*) embryos following exposure to disulfiram and acetic acid hydrazide. *Toxicology and applied pharmacology*, 268(2), pp.221–231.
- Teixido, E. et al., 2013. Assessment of developmental delay in the zebrafish embryo teratogenicity assay. *Toxicology in Vitro*, 27(1), pp.469–478.
- Tournaire, M., Epelboin, S. & Devouche, E., 2014. Histoire du diéthylstilbestrol. *Thérapie*, 69(1), pp.101–114.
- Uibel, F. et al., 2010. ReProGlo: a new stem cell-based reporter assay aimed to predict embryotoxic potential of drugs and chemicals. *Reproductive Toxicology*, 30(1), pp.103–112.
- Vargesson, N., 2015. Thalidomide-induced teratogenesis: History and mechanisms. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, 105(2), pp.140–156.
- Vergauwen, L. et al., 2015. A high throughput passive dosing format for the Fish Embryo Acute Toxicity test. *Chemosphere*, 139, pp.9–17.
- Vianna, F.S.L. et al., 2015. Pharmacoepidemiology and thalidomide embryopathy surveillance in Brazil. *Reproductive Toxicology*, 53, pp.63–67.
- Vidal, 2014. *Le dictionnaire Vidal*, ed.,
- Viera, A.J., Garrett, J.M. & others, 2005. Understanding interobserver agreement: the kappa statistic. *Fam Med*, 37(5), pp.360–363.
- Vignet, C. et al., 2013. Systematic screening of behavioral responses in two zebrafish strains. *Zebrafish*, 10(3), pp.365–375.

- Weber, J.H., 1993. Review of possible paths for abiotic methylation of mercury (II) in the aquatic environment. *Chemosphere*, 26(11), pp.2063–2077.
- Weigt, S. et al., 2011. Zebrafish (*Danio rerio*) embryos as a model for testing proteratogens. *Toxicology*, 281(1), pp.25–36.
- Weihe, P., Grandjean, P. & Cooperation, V.S., 2012. Cohort studies of Faroese children concerning potential adverse health effects after the mothers' exposure to marine contaminants during pregnancy. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 54(Suppl 1), p.S7.
- Weinhold, B., 2009. Environmental factors in birth defects: what we need to know. *Environmental Health Perspectives*, 117(10), p.A440.
- Werler, M.M., 2013. Congenital Malformations and Consequential Epidemiology. *Current Epidemiology Reports*, pp.1–5.
- Wheeler, G.N. & Brändli, A.W., 2009. Simple vertebrate models for chemical genetics and drug discovery screens: lessons from zebrafish and Xenopus. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 238(6), pp.1287–308.
- Wilson, C.A. et al., 2014. Wild Sex in Zebrafish: Loss of the Natural Sex Determinant in Domesticated Strains. *Genetics*, p.genetics–114.
- Worth, A.P. & Balls, M., 2002. *Alternative (non-animal) methods for chemicals testing: current status and future prospects*, Frame.
- Zellner, D. et al., 2011. Rearing conditions differentially affect the locomotor behavior of larval zebrafish, but not their response to valproate-induced developmental neurotoxicity. *Neurotoxicology and teratology*, 33(6), pp.674–679.
- Zhang, Y., Yang, Z. & Wu, J., 2007. Signaling pathways and preimplantation development of mammalian embryos. *FEBS Journal*, 274(17), pp.4349–4359.
- Zhu, F. et al., 2014. Fishing on chips: Up-and-coming technological advances in analysis of zebrafish and Xenopus embryos. *Cytometry Part A*, 85(11), pp.921–932.

Textes réglementaires européens

Directive 67/548/CEE du Conseil du 27 juin 1967 concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives relatives à la classification, l'emballage et l'étiquetage des substances dangereuses.

Directive 2010/63/UE du parlement européen et du conseil du 22 septembre 2010 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques

European Chemicals Agency, 2015 Guidance on information requirements and chemical safety assessment Chapter R.7a: Endpoint specific guidance Version 4.0 July 2015 Reference: ECHA-15-G-04-EN, ISBN: 978-92-9247-411-9

European Chemicals Agency, 2015b Guidance on the Application of the CLP Criteria Guidance to Regulation (EC) No 1272/2008 on classification, labelling and packaging (CLP) of substances and mixtures Version 4.1 June 2015 Reference: ECHA-15-G-05-EN ISBN: 978-92-9247-413-3

Règlement (CE) n° 1907/2006 du parlement européen et du conseil du 18 décembre 2006 concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, ainsi que les restrictions applicables à ces substances (REACH), instituant une agence européenne des produits chimiques, modifiant la directive 1999/45/CE et abrogeant le règlement (CEE) n° 793/93 du Conseil et le règlement (CE) n° 1488/94 de la Commission ainsi que la directive 76/769/CEE du Conseil et les directives 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE et 2000/21/CE de la Commission

Règlement (CE) 1272/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE et modifiant le règlement (CE) n° 1907/2006

Règlement (CE) n° 1223/2009/ du Parlement européen et du Conseil du 30 novembre 2009 relatif aux produits cosmétiques

Normes

The National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). (2000). Background Review Document. Frog Embryo Teratogenesis Assay – Xenopus (FETAX) March 10. Available at: <http://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/fetax2000/brd/fetax-brd-all.pdf> Accessed on July 25, 2015)

OCDE (1995), *Essai n° 421 : Essai de dépistage de la toxicité pour la reproduction et le développement*, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 4, OECD Publishing, Paris. DOI: <http://dx.doi.org/10.1787/9789264070974-fr>

OCDE (1996), *Essai n° 422 : Étude combinée de toxicité à doses répétées et de dépistage de la toxicité pour la reproduction et le développement*, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 4, OECD Publishing, Paris. DOI: <http://dx.doi.org/10.1787/9789264070998-fr>

OCDE (1998), *Essai n° 212 : Poisson, essai de toxicité à court terme aux stades de l'embryon et de l'alevin*, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 2, OECD Publishing, Paris. DOI: <http://dx.doi.org/10.1787/9789264070158-fr>

OCDE (2001), *Essai n° 414 : Étude de la toxicité pour le développement prénatal*, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 4, OECD Publishing, Paris. DOI: <http://dx.doi.org/10.1787/9789264070837-fr>

OCDE (2009), *Essai n° 230 : Essai de 21 jours sur les poissons: un dépistage à court terme de l'activité oestrogénique, et androgénique et de l'inhibition de l'aromatase*, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 2, OECD Publishing, Paris. DOI: <http://dx.doi.org/10.1787/9789264076235-fr>

OCDE (2009b), *Essai n° 231 : Essai de métamorphose des amphibiens*, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 2, Éditions OCDE, Paris. DOI : <http://dx.doi.org/10.1787/9789264076266-fr>

OCDE (2010) Draft Review Paper « Environmental Endocrine Disruptor screening, the use of estrogen and androgen receptor binding and transactivation assays in fish »

OCDE (2011), *Essai n° 234 : Essai de développement sexuel des poissons*, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 2, OECD Publishing, Paris. DOI: <http://dx.doi.org/10.1787/9789264122376-fr>

OCDE (2012), *Essai n° 443 : Étude étendue de toxicité pour la reproduction sur une génération*, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 4, OECD Publishing, Paris. DOI: <http://dx.doi.org/10.1787/9789264185647-fr>

- OCDE (2012b), *Essai n° 211 : Daphnia magna, essai de reproduction*, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 2, Éditions OCDE, Paris. DOI : <http://dx.doi.org/10.1787/9789264185470-fr>
- OCDE (2012c), *Essai n° 229 : Essai à court terme de reproduction des poissons*, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 2, OECD Publishing, Paris. DOI: <http://dx.doi.org/10.1787/9789264185524-fr>
- OCDE (2013), *Essai n° 210 : Poisson, essai de toxicité aux premiers stades de la vie*, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 2, OECD Publishing, Paris. DOI: <http://dx.doi.org/10.1787/9789264203792-fr>
- OCDE (2015), *Test No. 240 : Étude étendue de toxicité pour la reproduction sur une génération chez médaka (MEOGRT)*, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 2, OECD Publishing, Paris. DOI: <http://dx.doi.org/10.1787/9789264242319-fr>
- OCDE (2015b), *Essai n° 241 : Essai de croissance et de développement de larves d'amphibiens (LAGDA)*, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 2, OECD Publishing, Paris. DOI: <http://dx.doi.org/10.1787/9789264242364-fr>

Annexes

Annexe I : International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 10th Revision (ICD-10) / Congenital malformations, deformations and chromosomal abnormalities (Q00-Q99)

Source : WHO Version 2015 Chapter XVII

Q00–Q89 – Congenital malformations and deformations

(Q00–Q07) Nervous system

- (Q00) Anencephaly and similar malformations
 - o (Q00.0) Anencephaly
 - Acephaly
 - Acrania
 - Amyelencephaly
 - Hemianencephaly
 - Hemicephalý
 - o (Q00.1) Craniorachischisis
 - o (Q00.2) Iniencephaly
- (Q01) Encephalocele
- (Q02) Microcephaly
- (Q03) Congenital hydrocephalus
 - o (Q03.0) Malformations of aqueduct of Sylvius
 - o (Q03.1) Atresia of foramina of Magendie and Luschka
 - Dandy-Walker syndrome
 - o (Q03.8) Other congenital hydrocephalus
 - o (Q03.9) Congenital hydrocephalus, unspecified
- (Q04) Other congenital malformations of brain
 - o (Q04.0) Congenital malformations of corpus callosum
 - o (Q04.1) Arhinencephaly
 - o (Q04.2) Holoprosencephaly
 - o (Q04.3) Other reduction deformities of brain
 - Agyria and Lissencephaly (EUROCAT Q04.33)

- Microgyria and Pachygyria (EUROCAT Q04.34)
 - Hydranencephaly (EUROCAT Q04.35)
 - o (Q04.4) Septo-optic dysplasia
 - o (Q04.5) Megalencephaly
 - o (Q04.6) Congenital cerebral cysts
 - Porencephaly
 - Schizencephaly
 - o (Q04.8) Other specified congenital malformations of brain
 - o (Q04.9) Congenital malformation of brain, unspecified
- (Q05) Spina bifida
 - o
 - hydromeningocele (spinal)
 - meningocele(spinal)
 - meningomyelocele
 - myelocele
 - myelomeningocele
 - rachischisis
 - syringomyelocele
- (Q06) Other congenital malformations of spinal cord
 - o (Q06.0) Amyelia
 - o (Q06.1) Hypoplasia and dysplasia of spinal cord
 - o (Q06.2) Diastematomyelia
 - o (Q06.3) Other congenital cauda equina malformations
 - o (Q06.4) Hydromyelia
 - o (Q06.8) Other specified congenital malformations of spinal cord
 - o (Q06.9) Congenital malformation of spinal cord, unspecified
- (Q07) Other congenital malformations of nervous system
 - o (Q07.0) Arnold-Chiari syndrome
 - o (Q07.8) Other specified congenital malformations of nervous system
 - o (Q07.9) Congenital malformation of nervous system, unspecified

(Q10–Q18) Eye, ear, face and neck

Eye

- (Q10) Congenital malformations of eyelid, lacrimal apparatus and orbit

- o (Q10.0) Congenital ptosis
- o (Q10.1) Congenital ectropion
- o (Q10.2) Congenital entropion
- o (Q10.3) Other congenital malformations of eyelid
 - Ablepharon
 - Blepharophimosis, congenital
 - Coloboma of eyelid
- o (Q10.4) Absence and agenesis of lacrimal apparatus
- o (Q10.5) Congenital stenosis and stricture of lacrimal duct
- o (Q10.6) Other congenital malformations of lacrimal apparatus
- o (Q10.7) Congenital malformation of orbit
- (Q11) Anophthalmos, microphthalmos and macrophthalmos
 - o (Q11.0) Cystic eyeball
 - o (Q11.1) Other anophthalmos
 - o (Q11.2) Microphthalmos
 - o (Q11.3) Macrophthalmos
- (Q12) Congenital lens malformations
 - o (Q12.0) Congenital cataract
 - o (Q12.1) Congenital displaced lens
 - o (Q12.2) Coloboma of lens
 - o (Q12.3) Congenital aphakia
 - o (Q12.4) Spherophakia
 - o (Q12.8) Other congenital lens malformations
 - o (Q12.9) Congenital lens malformation, unspecified
- (Q13) Congenital malformations of anterior segment of eye
 - o (Q13.0) Coloboma of iris
 - o (Q13.1) Absence of iris
 - Aniridia
 - o (Q13.2) Other congenital malformations of iris
 - o (Q13.3) Congenital corneal opacity
 - o (Q13.4) Other congenital corneal malformations
 - o (Q13.5) Blue sclera
 - o (Q13.8) Other congenital malformations of anterior segment of eye

- o (Q13.9) Congenital malformation of anterior segment of eye, unspecified

- (Q14) Congenital malformations of posterior segment of eye

- o (Q14.0) Congenital malformation of vitreous humour

- o (Q14.1) Congenital malformation of retina

- o (Q14.2) Congenital malformation of optic disc

- Coloboma of optic disc

- o (Q14.3) Congenital malformation of choroid

- o (Q14.8) Other congenital malformations of posterior segment of eye

- Coloboma of the fundus

- o (Q14.9) Congenital malformation of posterior segment of eye, unspecified

- (Q15) Other congenital malformations of eye

- o (Q15.0) Congenital glaucoma

- Buphthalmos

- Glaucoma of newborn

- Hydrophthalmos

- Keratoglobus, congenital, with glaucoma

- Macrocornea with glaucoma

- Macrophthalmos in congenital glaucoma

- Megalocornea with glaucoma

Ear

- (Q16) Congenital malformations of ear causing impairment of hearing

- (Q17) Other congenital malformations of ear

- o (Q17.0) Accessory auricle

- Accessory tragus

- Polyotia

- Preauricular appendage or tag

- o (Q17.1) Macrotia

- o (Q17.2) Microtia

- o (Q17.3) Other misshapen ear

- Pointed ear

- o (Q17.4) Misplaced ear

- Low-set ears

- o (Q17.5) Prominent ear
 - Bat ear
- o (Q17.8) Other specified congenital malformations of ear
- o (Q17.9) Congenital malformation of ear, unspecified
- Other face and neck[edit]
- (Q18) Other congenital malformations of face and neck
 - o (Q18.0) Sinus, fistula and cyst of branchial cleft
 - o (Q18.1) Preauricular sinus and cyst
 - o (Q18.2) Other branchial cleft malformations
 - Otocephaly
 - o (Q18.3) Webbing of neck
 - o (Q18.4) Macrostomia
 - o (Q18.5) Microstomia
 - o (Q18.6) Macrocheilia
 - o (Q18.7) Microcheilia
 - o (Q18.8) Other specified congenital malformations of face and neck
 - o (Q18.9) Congenital malformation of face and neck, unspecified

(Q20–Q28) Circulatory system

- (Q20) Congenital malformations of cardiac chambers and connections
 - o (Q20.0) Common arterial trunk
 - Persistent truncus arteriosus
 - o (Q20.1) Double outlet right ventricle
 - Taussig-Bing syndrome
 - o (Q20.2) Double outlet left ventricle
 - o (Q20.3) Discordant ventriculoarterial connection
 - Dextrotransposition of aorta
 - Transposition of great vessels (complete)
 - o (Q20.4) Double inlet ventricle
 - o (Q20.5) Discordant atrioventricular connection
 - Corrected transposition
 - o (Q20.6) Isomerism of atrial appendages
- (Q21) Congenital malformations of cardiac septa
 - o (Q21.0) Ventricular septal defect

- o (Q21.1) Atrial septal defect
- o (Q21.2) Atrioventricular septal defect
 - Common atrioventricular canal
 - Endocardial cushion defect
 - Ostium primum atrial septal defect (type I)
- o (Q21.3) Tetralogy of Fallot
- o (Q21.4) Aortopulmonary septal defect
 - Aortic septal defect
 - Aortopulmonary window
- o (Q21.8) Other congenital malformations of cardiac septa
 - Eisenmenger's syndrome
- (Q22) Congenital malformations of pulmonary and tricuspid valves
 - o (Q22.0) Pulmonary valve atresia
 - o (Q22.1) Congenital pulmonary valve stenosis
 - o (Q22.2) Congenital pulmonary valve insufficiency
 - o (Q22.3) Other congenital malformations of pulmonary valve
 - o (Q22.4) Congenital tricuspid stenosis
 - Tricuspid atresia
 - o (Q22.5) Ebstein's anomaly
 - o (Q22.6) Hypoplastic right heart syndrome
 - o (Q22.8) Other congenital malformations of tricuspid valve
 - o (Q22.9) Congenital malformation of tricuspid valve, unspecified
- (Q23) Congenital malformations of aortic and mitral valves
 - o (Q23.0) Congenital stenosis of aortic valve
 - o (Q23.1) Congenital insufficiency of aortic valve
 - o (Q23.2) Congenital mitral stenosis
 - o (Q23.3) Congenital mitral insufficiency
 - o (Q23.4) Hypoplastic left heart syndrome
 - o (Q23.8) Other congenital malformations of aortic and mitral valves
 - o (Q23.9) Congenital malformation of aortic and mitral valves, unspecified
- (Q24) Other congenital malformations of heart
 - o (Q24.0) Dextrocardia
 - o (Q24.1) Laevocardia

- o (Q24.2) Cor triatriatum
- o (Q24.3) Pulmonary infundibular stenosis
- o (Q24.4) Congenital subaortic stenosis
- o (Q24.5) Malformation of coronary vessels
- o (Q24.6) Congenital heart block
- o (Q24.8) Other specified congenital malformations of heart
- o (Q24.9) Congenital malformation of heart, unspecified
- (Q25) Congenital malformations of great arteries
 - o (Q25.0) Patent ductus arteriosus
 - o (Q25.1) Coarctation of aorta
 - o (Q25.2) Atresia of aorta
 - o (Q25.3) Stenosis of aorta
 - o (Q25.4) Other congenital malformations of aorta
 - Overriding aorta (EUROCAT Q25.42)
 - Aneurysm of sinus of Valsalva (ruptured) (EUROCAT Q25.43)
 - Double aortic arch (vascular ring of aorta)
 - o (Q25.5) Atresia of pulmonary artery
 - o (Q25.6) Stenosis of pulmonary artery
 - o (Q25.7) Other congenital malformations of pulmonary artery
- (Q26) Congenital malformations of great veins
 - o (Q26.0) Congenital stenosis of vena cava
 - o (Q26.1) Persistent left superior vena cava
 - o (Q26.2) Total anomalous pulmonary venous connection
 - o (Q26.3) Partial anomalous pulmonary venous connection
 - o (Q26.4) Anomalous pulmonary venous connection, unspecified
 - o (Q26.5) Anomalous portal venous connection
 - o (Q26.6) Portal vein-hepatic artery fistula
 - o (Q26.8) Other congenital malformations of great veins
 - Scimitar syndrome
 - o (Q26.9) Congenital malformation of great vein, unspecified
- (Q27) Other congenital malformations of peripheral vascular system
 - o (Q27.0) Congenital absence and hypoplasia of umbilical artery
 - o (Q27.1) Congenital renal artery stenosis
 - o (Q27.2) Other congenital malformations of renal artery

- o (Q27.3) Peripheral arteriovenous malformation
- o (Q27.4) Congenital phlebectasia
- o (Q27.8) Other specified congenital malformations of peripheral vascular system
- o (Q27.9) Congenital malformation of peripheral vascular system, unspecified
- (Q28) Other congenital malformations of circulatory system
 - o (Q28.0) Arteriovenous malformation of precerebral vessels
 - o (Q28.1) Other malformations of precerebral vessels
 - o (Q28.2) Arteriovenous malformation of cerebral vessels
 - o (Q28.3) Other malformations of cerebral vessels
 - o (Q28.8) Other specified congenital malformations of circulatory system
 - o (Q28.9) Congenital malformation of circulatory system, unspecified

(Q30–Q34) Respiratory system

- (Q30) Congenital malformations of nose
 - o (Q30.0) Choanal atresia
 - o (Q30.1) Agenesis and underdevelopment of nose
 - o (Q30.2) Fissured, notched and cleft nose
 - o (Q30.3) Congenital perforated nasal septum
 - o (Q30.8) Other congenital malformations of nose
 - o (Q30.9) Congenital malformation of nose, unspecified
- (Q31) Congenital malformations of larynx
 - o (Q31.0) Web of larynx
 - o (Q31.1) Congenital subglottic stenosis
 - o (Q31.2) Laryngeal hypoplasia
 - o (Q31.3) Laryngocele
 - o (Q31.5) Congenital laryngomalacia
 - o (Q31.8) Other congenital malformations of larynx
 - o (Q31.9) Congenital malformation of larynx, unspecified
- (Q32) Congenital malformations of trachea and bronchus
 - o (Q32.0) Congenital tracheomalacia
 - o (Q32.1) Other congenital malformations of trachea
 - o (Q32.2) Congenital bronchomalacia

- o (Q32.3) Congenital stenosis of bronchus
- o (Q32.4) Other congenital malformations of bronchus
- (Q33) Congenital malformations of lung
 - o (Q33.0) Congenital cystic lung
 - o (Q33.1) Accessory lobe of lung
 - o (Q33.2) Sequestration of lung
 - o (Q33.3) Agenesis of lung
 - o (Q33.4) Congenital bronchiectasis
 - o (Q33.5) Ectopic tissue in lung
 - o (Q33.6) Hypoplasia and dysplasia of lung
 - o (Q33.8) Other congenital malformations of lung
 - o (Q33.9) Congenital malformation of lung, unspecified
- (Q34) Other congenital malformations of respiratory system
 - o (Q34.0) Anomaly of pleura
 - o (Q34.1) Congenital cyst of mediastinum
 - o (Q34.8) Other specified congenital malformations of respiratory system
 - o (Q34.9) Congenital malformation of respiratory system, unspecified

(Q35–Q45) Digestive system

- (Q35) Cleft palate
- (Q36) Cleft lip
- (Q37) Cleft palate with cleft lip
- (Q38) Other congenital malformations of tongue, mouth and pharynx
 - o (Q38.0) Congenital malformations of lips, not elsewhere classified
 - Van der Woude's syndrome
 - o (Q38.1) Ankyloglossia
 - o (Q38.2) Macroglossia
 - o (Q38.3) Other congenital malformations of tongue
 - Aglossia
 - Bifid tongue
 - Hypoplasia of tongue
 - Hypoglossia
 - Microglossia
 - o (Q38.4) Congenital malformations of salivary glands and ducts

- o (Q38.5) Congenital malformations of palate, not elsewhere classified
- o (Q38.6) Other congenital malformations of mouth
- o (Q38.7) Pharyngeal pouch
- (Q39) Congenital malformations of oesophagus
 - o (Q39.0) Atresia of oesophagus without fistula
 - o (Q39.1) Atresia of oesophagus with tracheo-oesophageal fistula
 - o (Q39.2) Congenital tracheo-oesophageal fistula without atresia
 - o (Q39.3) Congenital stenosis and stricture of oesophagus
 - o (Q39.4) Oesophageal web
 - o (Q39.5) Congenital dilatation of oesophagus
 - o (Q39.6) Diverticulum of oesophagus
 - o (Q39.8) Other congenital malformations of oesophagus
 - o (Q39.9) Congenital malformation of oesophagus, unspecified
- (Q40) Other congenital malformations of upper alimentary tract
 - o (Q40.0) Congenital hypertrophic pyloric stenosis
 - o (Q40.1) Congenital hiatus hernia
- (Q41) Congenital absence, atresia and stenosis of small intestine
 - o (Q41.0) Congenital absence, atresia and stenosis of duodenum
 - o (Q41.1) Congenital absence, atresia and stenosis of jejunum
 - o (Q41.2) Congenital absence, atresia and stenosis of ileum
 - o (Q41.8) Congenital absence, atresia and stenosis of other specified parts of small intestine
 - o (Q41.9) Congenital absence, atresia and stenosis of small intestine, part unspecified
- (Q42) Congenital absence, atresia and stenosis of large intestine
 - o (Q42.0) Congenital absence, atresia and stenosis of rectum with fistula
 - o (Q42.1) Congenital absence, atresia and stenosis of rectum without fistula
 - Imperforate rectum
 - o (Q42.2) Congenital absence, atresia and stenosis of anus with fistula
 - o (Q42.3) Congenital absence, atresia and stenosis of anus without fistula
 - Imperforate anus
 - o (Q42.8) Congenital absence, atresia and stenosis of other parts of large intestine

- o (Q42.9) Congenital absence, atresia and stenosis of large intestine, part unspecified

- (Q43) Other congenital malformations of intestine

- o (Q43.0) Meckel's diverticulum
- o (Q43.1) Hirschsprung's disease
- o (Q43.2) Other congenital functional disorders of colon
- o (Q43.3) Congenital malformations of intestinal fixation
 - Malrotation of colon
- o (Q43.4) Duplication of intestine
- o (Q43.5) Ectopic anus
- o (Q43.6) Congenital fistula of rectum and anus
- o (Q43.7) Persistent cloaca
- o (Q43.8) Other specified congenital malformations of intestine
 - Dolichocolon
 - Megaloappendix
 - Megaloduodenum
 - Microcolon

- (Q44) Congenital malformations of gallbladder, bile ducts and liver

- o (Q44.0) Agenesis, aplasia and hypoplasia of gallbladder
- o (Q44.1) Other congenital malformations of gallbladder
- o (Q44.2) Atresia of bile ducts
- o (Q44.3) Congenital stenosis and stricture of bile ducts
- o (Q44.4) Choledochal cyst
- o (Q44.5) Other congenital malformations of bile ducts
- o (Q44.6) Cystic disease of liver
- o (Q44.7) Other congenital malformations of liver
 - Accessory liver
 - Alagille's syndrome

- (Q45) Other congenital malformations of digestive system

- o (Q45.0) Agenesis, aplasia and hypoplasia of pancreas
- o (Q45.1) Annular pancreas
- o (Q45.2) Congenital pancreatic cyst
- o (Q45.3) Other congenital malformations of pancreas and pancreatic

duct

- Accessory pancreas
- o (Q45.8) Other specified congenital malformations of digestive system
- o (Q45.9) Congenital malformation of digestive system, unspecified]]

(Q50–Q56) Genital organs

• (Q50) Congenital malformations of ovaries, fallopian tubes and broad ligaments

• (Q51) Congenital malformations of uterus and cervix

- o (Q51.0) Agenesis and aplasia of uterus
- o (Q51.1) Doubling of uterus with doubling of cervix and vagina
- o (Q51.2) Other doubling of uterus
- o (Q51.3) Bicornate uterus
- o (Q51.4) Unicornate uterus
- o (Q51.5) Agenesis and aplasia of cervix
- o (Q51.6) Embryonic cyst of cervix
- o (Q51.7) Congenital fistulae between uterus and digestive and urinary

tracts

- o (Q51.8) Other congenital malformations of uterus and cervix
- o (Q51.9) Congenital malformation of uterus and cervix, unspecified

• (Q52) Other congenital malformations of female genitalia

- o (Q52.0) Congenital absence of vagina
- o (Q52.1) Doubling of vagina
- o (Q52.2) Congenital rectovaginal fistula
- o (Q52.3) Imperforate hymen
- o (Q52.4) Other congenital malformations of vagina
- o (Q52.5) Fusion of labia
- o (Q52.6) Congenital malformation of clitoris
- o (Q52.7) Other congenital malformations of vulva
- o (Q52.8) Other specified congenital malformations of female genitalia
- o (Q52.9) Congenital malformation of female genitalia, unspecified

• (Q53) Undescended testicle

• (Q54) Hypospadias

- o (Q54.0) Hypospadias, balanic
- o (Q54.1) Hypospadias, penile

- o (Q54.2) Hypospadias, penoscrotal
- o (Q54.3) Hypospadias, perineal
- o (Q54.4) Congenital chordee
- o (Q54.8) Other hypospadias
- o (Q54.9) Hypospadias, unspecified
- (Q55) Other congenital malformations of male genital organs
 - o (Q55.0) Absence and aplasia of testis
 - Monorchism
 - o (Q55.1) Hypoplasia of testis and scrotum
 - o (Q55.2) Other congenital malformations of testis and scrotum
 - o (Q55.3) Atresia of vas deferens
 - o (Q55.4) Other congenital malformations of vas deferens, epididymis, seminal vesicles and prostate
 - o (Q55.5) Congenital absence and aplasia of penis
 - o (Q55.6) Other congenital malformations of penis
 - o (Q55.8) Other specified congenital malformations of male genital organs
 - o (Q55.9) Congenital malformation of male genital organ, unspecified
- (Q56) Indeterminate sex and pseudohermaphroditism
 - o (Q56.0) Hermaphroditism, not elsewhere classified
 - o (Q56.1) Male pseudohermaphroditism, not elsewhere classified
 - o (Q56.2) Female pseudohermaphroditism, not elsewhere classified
 - o (Q56.3) Pseudohermaphroditism, unspecified
 - o (Q56.4) Indeterminate sex, unspecified

(Q60–Q64) Urinary system

- (Q60) Renal agenesis and other reduction defects of kidney
 - o (Q60.0) Renal agenesis, unilateral
 - o (Q60.1) Renal agenesis, bilateral
 - o (Q60.2) Renal agenesis, unspecified
 - o (Q60.3) Renal hypoplasia, unilateral
 - o (Q60.4) Renal hypoplasia, bilateral
 - o (Q60.6) Renal hypoplasia, unspecified
 - o (Q60.7) Potter sequence

- (Q61) Cystic kidney disease
 - o (Q61.0) Congenital single renal cyst
 - o (Q61.1) Polycystic kidney, autosomal recessive
 - o (Q61.2) Polycystic kidney, autosomal dominant
 - o (Q61.3) Polycystic kidney, unspecified
 - o (Q61.4) Renal dysplasia
 - o (Q61.5) Medullary cystic kidney
 - o (Q61.8) Other cystic kidney diseases
 - o (Q61.9) Cystic kidney disease, unspecified
 - Meckel-Gruber syndrome
- (Q62) Congenital obstructive defects of renal pelvis and congenital malformations of ureter
 - o (Q62.0) Congenital hydronephrosis
 - o (Q62.1) Atresia and stenosis of ureter
 - o (Q62.2) Congenital megaloureter
 - o (Q62.3) Other obstructive defects of renal pelvis and ureter
 - o (Q62.4) Agenesis of ureter
 - o (Q62.5) Duplication of ureter
 - o (Q62.6) Malposition of ureter
 - o (Q62.7) Congenital vesico-uretero-renal reflux
 - o (Q62.8) Other congenital malformations of ureter
- (Q63) Other congenital malformations of kidney
 - o (Q63.0) Accessory kidney
 - o (Q63.1) Lobulated, fused and horseshoe kidney
 - o (Q63.2) Ectopic kidney
 - o (Q63.3) Hyperplastic and giant kidney
 - o (Q63.8) Other specified congenital malformations of kidney
 - o (Q63.9) Congenital malformation of kidney, unspecified
- (Q64) Other congenital malformations of urinary system
 - o (Q64.0) Epispadias
 - o (Q64.1) Exstrophy of urinary bladder
 - o (Q64.2) Congenital posterior urethral valves
 - o (Q64.3) Other atresia and stenosis of urethra and bladder neck
 - o (Q64.4) Malformation of urachus

- Cyst of urachus
- Patent urachus
- Prolapse of urachus
- o (Q64.5) Congenital absence of bladder and urethra
- o (Q64.6) Congenital diverticulum of bladder
- o (Q64.7) Other congenital malformations of bladder and urethra
- o (Q64.8) Other specified congenital malformations of urinary system
- o (Q64.9) Congenital malformation of urinary system, unspecified

(Q65–Q79) Musculoskeletal system

- (Q65) Congenital deformities of hip
 - o (Q65.0) Congenital dislocation of hip, unilateral
 - o (Q65.1) Congenital dislocation of hip, bilateral
 - o (Q65.2) Congenital dislocation of hip, unspecified
 - o (Q65.3) Congenital subluxation of hip, unilateral
 - o (Q65.4) Congenital subluxation of hip, bilateral
 - o (Q65.5) Congenital subluxation of hip, unspecified
 - o (Q65.6) Unstable hip
 - o (Q65.8) Other congenital deformities of hip
 - o (Q65.9) Congenital deformity of hip, unspecified
- (Q66) Congenital deformities of feet
 - o (Q66.0) Talipes equinovarus
 - o (Q66.1) Talipes calcaneovarus
 - o (Q66.2) Metatarsus varus
 - o (Q66.3) Other congenital varus deformities of feet
 - o (Q66.4) Talipes calcaneovalgus
 - o (Q66.5) Congenital pes planus
 - o (Q66.6) Other congenital valgus deformities of feet
 - o (Q66.7) Pes cavus
 - o (Q66.8) Other congenital deformities of feet
 - o (Q66.9) Congenital deformity of feet, unspecified
- (Q67) Congenital musculoskeletal deformities of head, face, spine and chest
 - o (Q67.0) Facial asymmetry
 - o (Q67.1) Compression facies

- o (Q67.2) Dolichocephaly
- o (Q67.3) Plagiocephaly
- o (Q67.4) Other congenital deformities of skull, face and jaw
- o (Q67.5) Congenital deformity of spine
- o (Q67.6) Pectus excavatum
- o (Q67.7) Pectus carinatum
- o (Q67.8) Other congenital deformities of chest
- (Q68) Other congenital musculoskeletal deformities
 - o (Q68.0) Congenital deformity of sternocleidomastoid muscle
 - o (Q68.1) Congenital deformity of hand
 - o (Q68.2) Congenital deformity of knee
 - o (Q68.3) Congenital bowing of femur
 - o (Q68.4) Congenital bowing of tibia and fibula
 - o (Q68.5) Congenital bowing of long bones of leg, unspecified
 - o (Q68.8) Other specified congenital musculoskeletal deformities
- (Q69) Polydactyly
 - o (Q69.0) Accessory finger(s)
 - o (Q69.1) Accessory thumb(s)
 - o (Q69.2) Accessory toe(s)
 - o (Q69.9) Polydactyly, unspecified
- (Q70) Syndactyly
 - o (Q70.0) Fused fingers
 - o (Q70.1) Webbed fingers
 - o (Q70.2) Fused toes
 - o (Q70.3) Webbed toes
 - o (Q70.4) Polysyndactyly
 - o (Q70.9) Syndactyly, unspecified
- (Q71) Reduction defects of upper limb
 - o (Q71.0) Congenital complete absence of upper limb(s)
 - o (Q71.1) Congenital absence of upper arm and forearm with hand present
 - o (Q71.2) Congenital absence of both forearm and hand
 - o (Q71.3) Congenital absence of hand and finger(s)
 - o (Q71.4) Longitudinal reduction defect of radius

- o (Q71.5) Longitudinal reduction defect of ulna
- o (Q71.6) Lobster-claw hand
- o (Q71.8) Other reduction defects of upper limb(s)
- o (Q71.9) Reduction defect of upper limb, unspecified
- (Q72) Reduction defects of lower limb
 - o (Q72.0) Congenital complete absence of lower limb(s)
 - o (Q72.1) Congenital absence of thigh and lower leg with foot present
 - o (Q72.2) Congenital absence of both lower leg and foot
 - o (Q72.3) Congenital absence of foot and toe(s)
 - o (Q72.4) Longitudinal reduction defect of femur
 - o (Q72.5) Longitudinal reduction defect of tibia
 - o (Q72.6) Longitudinal reduction defect of fibula
 - o (Q72.7) Split foot
 - o (Q72.8) Other reduction defects of lower limb(s)
 - o (Q72.9) Reduction defect of lower limb, unspecified
- (Q73) Reduction defects of unspecified limb
 - o (Q73.0) Congenital absence of unspecified limb(s)
 - Amelia NOS
 - o (Q73.1) Phocomelia, unspecified limb(s)
 - o (Q73.8) Other reduction defects of unspecified limb(s)
 - Ectromelia NOS
 - Hemimelia NOS
 - Reduction defect, NOS
- (Q74) Other congenital malformations of limb(s)
 - o (Q74.0) Other congenital malformations of upper limb(s), including shoulder girdle
 - Accessory carpal bones
 - Cleidocranial dysostosis
 - Congenital pseudarthrosis of clavicle
 - Macrodactylia (fingers)
 - Madelung's deformity
 - Radioulnar synostosis
 - Sprengel's deformity
 - Triphalangeal thumb

- o (Q74.1) Congenital malformation of knee
 - genu valgum
 - genu varum
- o (Q74.2) Other congenital malformations of lower limb(s), including pelvic girdle
 - o (Q74.3) Arthrogryposis multiplex congenita
 - o (Q74.8) Other specified congenital malformations of limb(s)
 - o (Q74.9) Unspecified congenital malformation of limb(s)
- (Q75) Other congenital malformations of skull and face bones
 - o (Q75.0) Craniosynostosis
 - Acrocephaly
 - Imperfect fusion of skull
 - Oxycephaly
 - Trigonocephaly
 - o (Q75.1) Craniofacial dysostosis
 - Crouzon's disease
 - o (Q75.2) Hypertelorism
 - o (Q75.3) Macrocephaly
 - o (Q75.4) Mandibulofacial dysostosis
 - Franceschetti syndrome
 - Treacher-Collins syndrome
 - o (Q75.5) Oculomandibular dysostosis
 - o (Q75.8) Other specified congenital malformations of skull and face bones
 - Absence of skull bone, congenital
 - Congenital deformity of forehead
 - Platybasia
 - o (Q75.9) Congenital malformation of skull and face bones, unspecified
- (Q76) Congenital malformations of spine and bony thorax
 - o (Q76.0) Spina bifida occulta
 - o (Q76.1) Klippel-Feil syndrome
 - o (Q76.2) Congenital spondylolisthesis
 - o (Q76.3) Congenital scoliosis due to congenital bony malformation

- o (Q76.4) Other congenital malformations of spine, not associated with scoliosis
- o (Q76.5) Cervical rib
- o (Q76.6) Other congenital malformations of ribs
- o (Q76.7) Congenital malformation of sternum
 - Congenital absence of sternum
 - Sternum bifidum
- o (Q76.8) Other congenital malformations of bony thorax
- o (Q76.9) Congenital malformation of bony thorax, unspecified
- (Q77) Osteochondrodysplasia with defects of growth of tubular bones and spine
 - o (Q77.0) Achondrogenesis
 - Hypochondrogenesis
 - o (Q77.1) Thanatophoric short stature
 - o (Q77.2) Short rib syndrome
 - Asphyxiating thoracic dysplasia (Jeune)
 - o (Q77.3) Chondrodysplasia punctata
 - o (Q77.4) Achondroplasia
 - Hypochondroplasia
 - Osteosclerosis congenita
 - o (Q77.5) Diastrophic dysplasia
 - o (Q77.6) Chondroectodermal dysplasia
 - Ellis-van Creveld syndrome
 - o (Q77.7) Spondyloepiphyseal dysplasia
 - o (Q77.8) Other osteochondrodysplasia with defects of growth of tubular bones and spine
 - o (Q77.9) Osteochondrodysplasia with defects of growth of tubular bones and spine, unspecified
- (Q78) Other osteochondrodysplasias
 - o (Q78.0) Osteogenesis imperfecta
 - Fragilitas ossium
 - Osteopsathyrosis
 - o (Q78.1) Polyostotic fibrous dysplasia
 - Albright(-McCune)(-Sternberg) syndrome

- o (Q78.2) Osteopetrosis
 - Albers-Schönberg syndrome
- o (Q78.3) Progressive diaphyseal dysplasia
 - Camurati-Engelmann syndrome
- o (Q78.4) Enchondromatosis
 - Maffucci's syndrome
 - Ollier's disease
- o (Q78.5) Metaphyseal dysplasia
 - Pyle's syndrome
- o (Q78.6) Multiple congenital exostoses
 - Diaphyseal aclasis
- o (Q78.8) Other specified osteochondrodysplasias
 - Osteopoikilosis
- o (Q78.9) Osteochondrodysplasia, unspecified
 - Chondrodystrophy NOS
 - Osteodystrophy NOS
- (Q79) Congenital malformations of the musculoskeletal system, not elsewhere classified
 - o (Q79.0) Congenital diaphragmatic hernia
 - o (Q79.1) Other congenital malformations of diaphragm
 - o (Q79.2) Exomphalos
 - Omphalocele
 - o (Q79.3) Gastroschisis
 - o (Q79.4) Prune belly syndrome
 - o (Q79.5) Other congenital malformations of abdominal wall
 - o (Q79.6) Ehlers-Danlos syndrome
 - o (Q79.8) Other congenital malformations of musculoskeletal system
 - Accessory muscle
 - Amyotrophia congenita
 - Poland's syndrome
 - o (Q79.9) Congenital malformation of musculoskeletal system, unspecified

(Q80–Q89) Other

- (Q80) Congenital ichthyosis
 - o (Q80.0) Ichthyosis vulgaris
 - o (Q80.1) X-linked ichthyosis
 - o (Q80.2) Lamellar ichthyosis
 - o (Q80.3) Congenital bullous ichthyosiform erythroderma
 - o (Q80.4) Harlequin fetus
 - o (Q80.8) Other congenital ichthyosis
 - o (Q80.9) Congenital ichthyosis, unspecified
- (Q81) Epidermolysis bullosa
 - o (Q81.0) Epidermolysis bullosa simplex
 - o (Q81.1) Epidermolysis bullosa letalis
 - o (Q81.2) Epidermolysis bullosa dystrophica
 - o (Q81.8) Other epidermolysis bullosa
 - o (Q81.9) Epidermolysis bullosa, unspecified
- (Q82) Other congenital malformations of skin
 - o (Q82.0) Hereditary lymphoedema
 - o (Q82.1) Xeroderma pigmentosum
 - o (Q82.2) Mastocytosis
 - Urticaria pigmentosa
 - o (Q82.3) Incontinentia pigmenti
 - o (Q82.4) Ectodermal dysplasia (anhidrotic)
 - o (Q82.5) Congenital non-neoplastic naevus
 - Birthmark NOS
 - naevus flammeus / Port-wine stain
 - sanguineous naevus
 - strawberry naevus
 - vascular naevus NOS
 - verrucous naevus
 - o (Q82.8) Other specified congenital malformations of skin
 - Abnormal palmar creases
 - Accessory skin tags
 - Benign familial pemphigus (Hailey-Hailey disease)
 - Cutis laxa (hyperelastica)

- Dermatoglyphic anomalies
 - Inherited keratosis palmaris et plantaris
 - Keratosis follicularis (Darier-White) (ILDS Q82.868)
 - o (Q82.9) Congenital malformation of skin, unspecified
- (Q83) Congenital malformations of breast
 - o (Q83.0) Congenital absence of breast with absent nipple
 - o (Q83.1) Accessory breast
 - o (Q83.2) Absent nipple
 - o (Q83.3) Accessory nipple
 - Supernumerary nipple
 - o (Q83.8) Other congenital malformations of breast
 - Hypoplasia of breast
 - o (Q83.9) Congenital malformation of breast, unspecified
- (Q84) Other congenital malformations of integument
 - o (Q84.0) Congenital alopecia
 - o (Q84.1) Congenital morphological disturbances of hair, not elsewhere classified
 - Beaded hair
 - Monilethrix
 - Pili annulati
 - Trichothiodystrophy (ILDS Q84.169)
 - o (Q84.2) Other congenital malformations of hair
 - o (Q84.3) Anonychia
 - o (Q84.4) Congenital leukonychia
 - o (Q84.5) Enlarged and hypertrophic nails
 - Congenital onychauxis
 - Pachyonychia
 - o (Q84.6) Other congenital malformations of nails
 - o (Q84.8) Other specified congenital malformations of integument
 - o (Q84.9) Congenital malformation of integument, unspecified
- (Q85) Phakomatoses, not elsewhere classified
 - o (Q85.0) Neurofibromatosis (nonmalignant)
 - Von Recklinghausen's disease (ILDS Q85.010)
 - Neurofibromatosis II (ILDS Q85.020)

- Neurofibromatosis, segmental (ILDS Q85.030)
 - o (Q85.1) Tuberous sclerosis
 - Bourneville's disease
 - o (Q85.8) Other phakomatoses, not elsewhere classified
 - Sturge-Weber syndrome (EUROCAT Q85.81)
 - von Hippel-Lindau disease (EUROCAT Q85.82)
 - o (Q85.9) Phakomatosis, unspecified
 - Hamartosis NOS
- (Q86) Congenital malformation syndromes due to known exogenous causes, not elsewhere classified
 - o (Q86.0) Fetal alcohol syndrome (dysmorphic)
 - o (Q86.1) Fetal hydantoin syndrome
 - Meadow's syndrome
 - o (Q86.2) Dysmorphism due to warfarin
 - o (Q86.3) Other congenital malformation syndromes due to known exogenous causes
- (Q87) Other specified congenital malformation syndromes affecting multiple systems
 - o (Q87.0) Congenital malformation syndromes predominantly affecting facial appearance
 - Acrocephalopolysyndactyly
 - Acrocephalosyndactyly (Apert)
 - Cryptophthalmos syndrome
 - Cyclopia
 - Goldenhar syndrome
 - Moebius syndrome
 - oro-facial-digital syndrome
 - Robin syndrome
 - Whistling face
 - o (Q87.1) Congenital malformation syndromes predominantly associated with short stature
 - Aarskog syndrome
 - Cockayne syndrome (ILDS Q87.110)
 - De Lange syndrome (ILDS Q87.170)

- Dubowitz syndrome
- Noonan syndrome
- Prader-Willi syndrome
- Robinow-Silverman-Smith syndrome
- Silver-Russell syndrome (ILDS Q87.114)
- Seckel syndrome
- Smith-Lemli-Opitz syndrome
- Sjögren-Larsson syndrome (ILDS Q87.136)
- o (Q87.2) Congenital malformation syndromes predominantly involving limbs
 - Holt-Oram syndrome
 - Klippel-Trénaunay-Weber (EUROCAT Q87.21, ILDS Q87.210)
 - Nail-patella syndrome (ILDS Q87.230)
 - Rubinstein-Taybi syndrome (EUROCAT Q87.23)
 - sirenomelia
 - thrombocytopenia with absent radius syndrome
 - VATER syndrome
- o (Q87.3) Congenital malformation syndromes involving early overgrowth
 - Beckwith-Wiedemann syndrome
 - Sotos syndrome
 - Weaver syndrome
- o (Q87.4) Marfan's syndrome
- o (Q87.5) Other congenital malformation syndromes with other skeletal changes
 - o (Q87.8) Other specified congenital malformation syndromes, not elsewhere classified
 - Alport syndrome (EUROCAT Q87.80)
 - Bardet-Biedl syndrome (EUROCAT Q87.81)
 - Zellweger's syndrome (EUROCAT Q87.83)
 - William's syndrome (EUROCAT Q87.84)
 - Angelman's syndrome (Happy puppet syndrome) (EUROCAT Q87.85)
- (Q89) Other congenital malformations, not elsewhere classified

- o (Q89.0) Congenital malformations of spleen
 - Asplenia (congenital)
 - Congenital splenomegaly
- o (Q89.1) Congenital malformations of adrenal gland
- o (Q89.2) Congenital malformations of other endocrine glands
 - Congenital malformation of parathyroid or thyroid gland
 - Persistent thyroglossal duct
 - Thyroglossal cyst
- o (Q89.3) Situs inversus
- o (Q89.4) Conjoined twins
- o (Q89.7) Multiple congenital malformations, not elsewhere classified
- o (Q89.8) Other specified congenital malformations
- o (Q89.9) Congenital malformation, unspecified

Q90–Q99 – Chromosomal abnormalities, not elsewhere classified

- (Q90) Down's syndrome
 - o (Q90.0) Trisomy 21, meiotic nondisjunction
 - o (Q90.1) Trisomy 21, mosaicism (mitotic nondisjunction)
 - o (Q90.2) Trisomy 21, translocation
 - o (Q90.9) Down's syndrome, unspecified
- (Q91) Trisomy 18 and Trisomy 13
 - o (Q91.0) Trisomy 18, meiotic nondisjunction
 - o (Q91.1) Trisomy 18, mosaicism (mitotic nondisjunction)
 - o (Q91.2) Trisomy 18, translocation
 - o (Q91.3) Edwards' syndrome, unspecified
 - o (Q91.4) Trisomy 13, meiotic nondisjunction
 - o (Q91.5) Trisomy 13, mosaicism (mitotic nondisjunction)
 - o (Q91.6) Trisomy 13, translocation
 - o (Q91.7) Patau's syndrome, unspecified
- (Q92) Other trisomies and partial trisomies of the autosomes, not elsewhere classified
 - o Trisomy 9
 - o Warkany syndrome 2
 - o (Q92.0) Whole chromosome trisomy, meiotic nondisjunction

- o (Q92.1) Whole chromosome trisomy, mosaicism (mitotic nondisjunction)
- o (Q92.2) Major partial trisomy
- o (Q92.3) Minor partial trisomy
- o (Q92.4) Duplications seen only at prometaphase
- o (Q92.5) Duplications with other complex rearrangements
- o (Q92.6) Extra marker chromosomes
- o (Q92.7) Triploidy and polyploidy
- o (Q92.8) Other specified trisomies and partial trisomies of autosomes
- o (Q92.9) Trisomy and partial trisomy of autosomes, unspecified
- (Q93) Monosomies and deletions from the autosomes, not elsewhere classified
 - o (Q93.0) Whole chromosome monosomy, meiotic nondisjunction
 - o (Q93.1) Whole chromosome monosomy, mosaicism (mitotic nondisjunction)
 - o (Q93.2) Chromosome replaced with ring or dicentric
 - o (Q93.3) Deletion of short arm of chromosome 4
 - Wolff-Hirschorn syndrome
 - o (Q93.4) Deletion of short arm of chromosome 5
 - Cri-du-chat syndrome
 - o (Q93.5) Other deletions of part of a chromosome
 - Angelman syndrome
 - o (Q93.6) Deletion seen only at prometaphase
 - o (Q93.7) Deletions with other complex rearrangements
 - o (Q93.8) Other deletions from the autosomes
 - o (Q93.9) Deletion from autosomes, unspecified
- (Q95) Balanced rearrangements and structural markers, not elsewhere classified
 - o Robertsonian and balanced reciprocal translocations and insertions
 - o (Q95.0) Balanced translocation and insertion in normal individual
 - o (Q95.1) Chromosome inversion in normal individual
 - o (Q95.2) Balanced autosomal rearrangement in abnormal individual
 - o (Q95.3) Balanced sex/autosomal rearrangement in abnormal individual
 - o (Q95.4) Individuals with marker heterochromatin
 - o (Q95.5) Individuals with autosomal fragile site

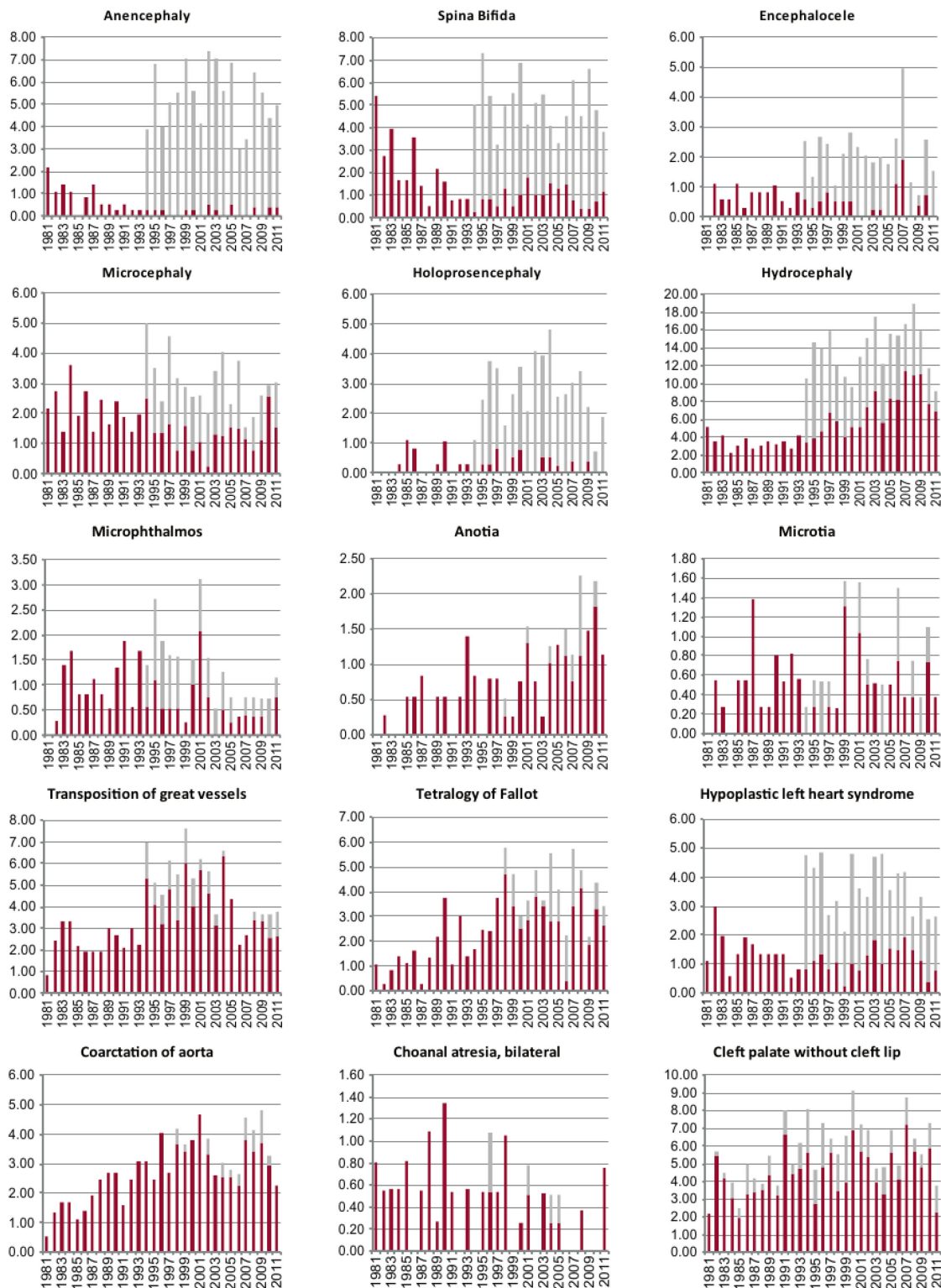
- o (Q95.8) Other balanced rearrangements and structural markers
- o (Q95.9) Balanced rearrangement and structural marker, unspecified
- (Q96) Turner syndrome
 - o (Q96.0) Karyotype 45,X
 - o (Q96.1) Karyotype 46,X iso (Xq)
 - o (Q96.2) Karyotype 46,X with abnormal sex chromosome, except iso (Xq)
 - o (Q96.3) Mosaicism, 45,X/46,XX or XY
 - o (Q96.4) Mosaicism, 45,X/other cell line(s) with abnormal sex chromosome
 - o (Q96.8) Other variants of Turner's syndrome
 - o (Q96.9) Turner's syndrome, unspecified
- (Q97) Other sex chromosome abnormalities, female phenotype, not elsewhere classified
 - o (Q97.0) Karyotype 47,XXX
 - o (Q97.1) Female with more than three X chromosomes
 - o (Q97.2) Mosaicism, lines with various numbers of X chromosomes
 - o (Q97.3) Female with 46,XY karyotype
 - o (Q97.8) Other specified sex chromosome abnormalities, female phenotype
 - o (Q97.9) Sex chromosome abnormality, female phenotype, unspecified
- (Q98) Other sex chromosome abnormalities, male phenotype, not elsewhere classified
 - o (Q98.0) Klinefelter's syndrome karyotype 47,XXY
 - o (Q98.1) Klinefelter's syndrome, male with more than two X chromosomes
 - o (Q98.2) Klinefelter's syndrome, male with 46,XX karyotype
 - o (Q98.3) Other male with 46,XX karyotype – XX male syndrome
 - o (Q98.4) Klinefelter's syndrome, unspecified
 - o (Q98.5) Karyotype 47,XYY
 - o (Q98.6) Male with structurally abnormal sex chromosome
 - o (Q98.7) Male with sex chromosome mosaicism
 - o (Q98.8) Other specified sex chromosome abnormalities, male phenotype

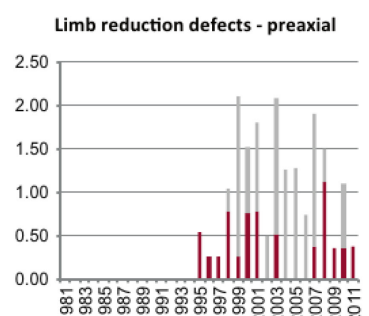
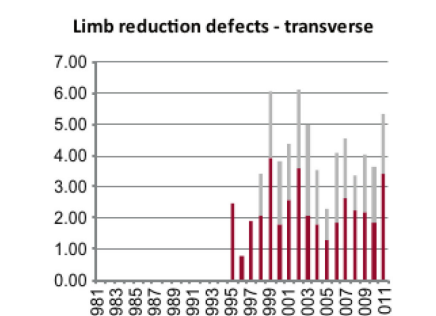
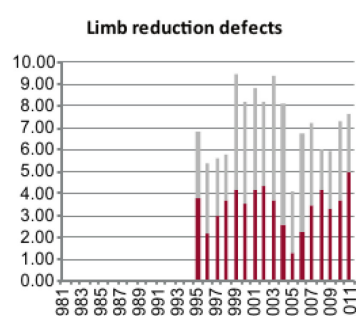
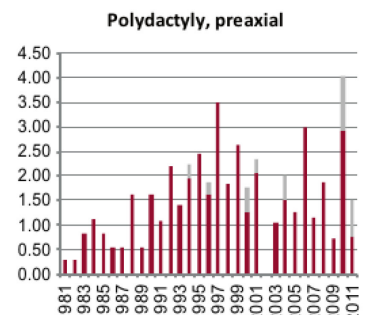
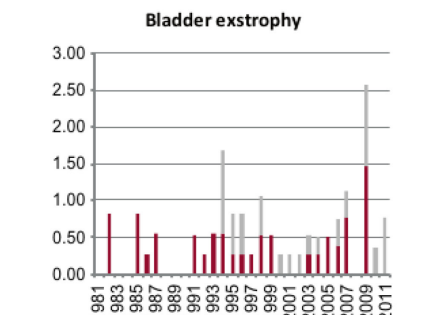
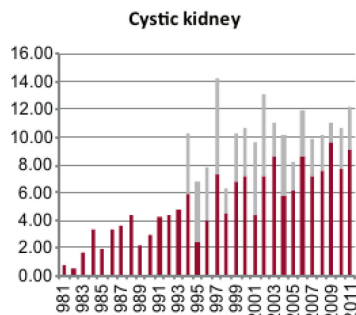
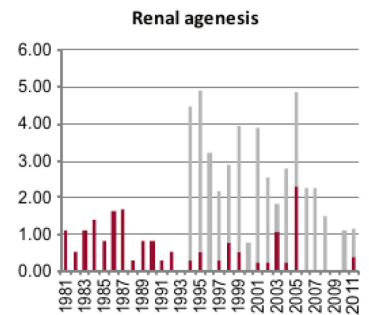
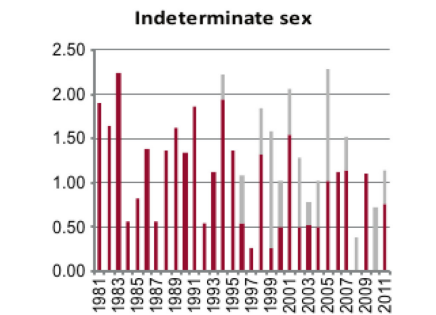
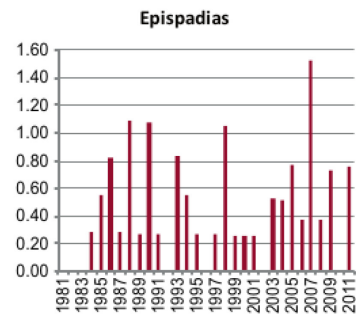
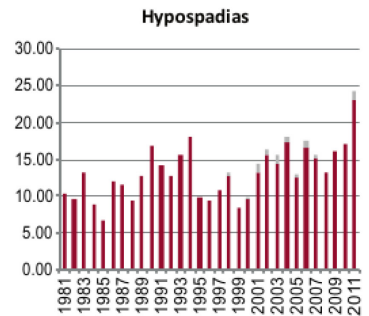
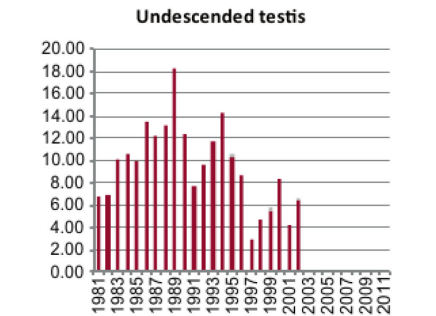
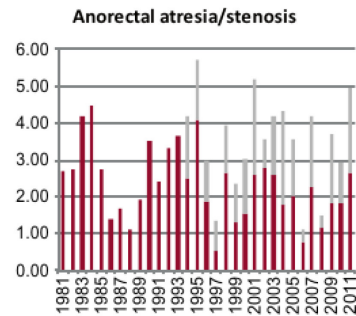
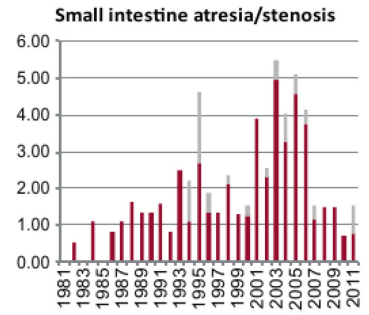
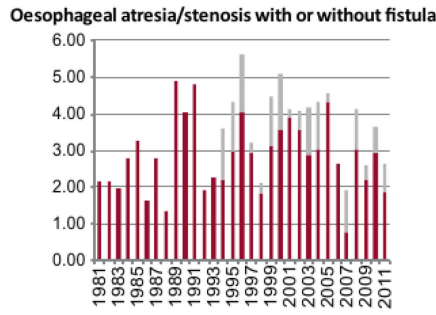
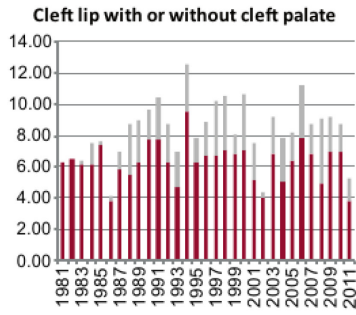
- o (Q98.9) Sex chromosome abnormality, male phenotype, unspecified
- (Q99) Other chromosome abnormalities, not elsewhere classified
 - o (Q99.0) Chimera 46,XX/46,XY
 - o (Q99.1) 46,XX true hermaphrodite
 - 46,XX with streak gonads
 - 46,XY with streak gonads
 - Pure gonadal dysgenesis
 - o (Q99.2) Fragile X chromosome
 - Fragile X syndrome
 - o (Q99.8) Other specified chromosome abnormalities
 - o (Q99.9) Chromosomal abnormality, unspecified

Annexe II : Évolution des différentes malformations de 5 registres français

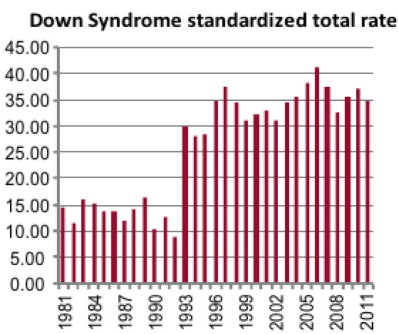
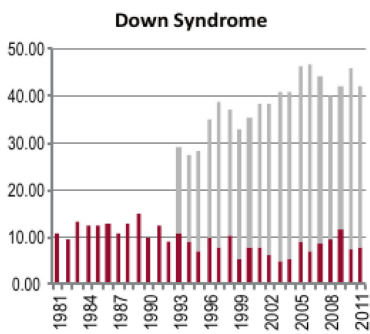
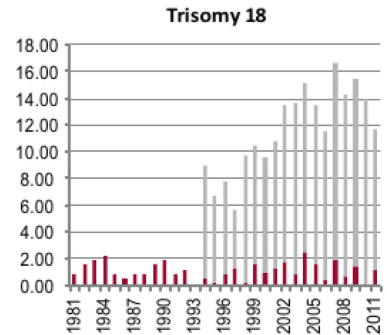
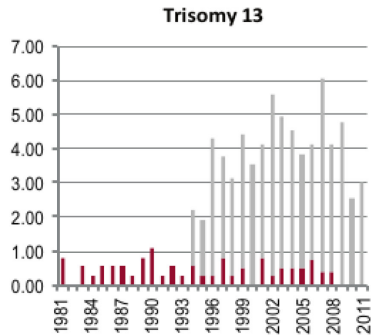
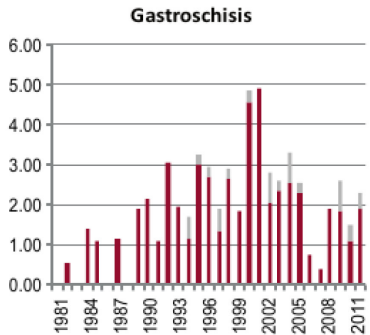
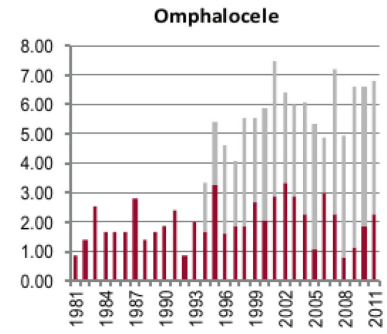
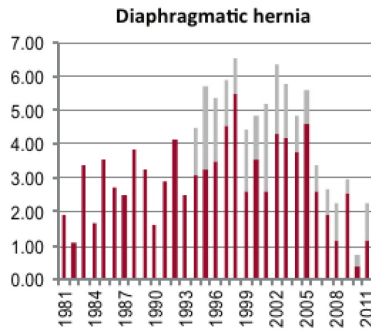
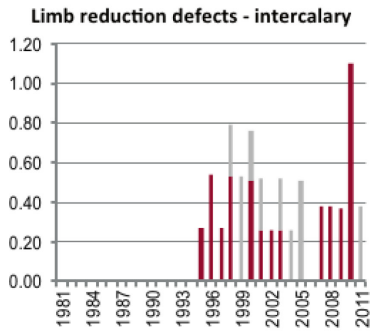
France: Paris

Time trends 1981-2011 (Birth prevalence rates per 10,000)





Note: ■ L+S rates, ■ ToP rates



Annexe III : Poster « Benchmarking a routine physiological-based test to screen thyroid disrupting chemicals »

BENCHMARKING A ROUTINE PHYSIOLOGICAL-BASED TEST TO SCREEN THYROID DISRUPTING CHEMICALS

Gregory Lemkine¹, David Du Pasquier¹, Anthony Sebillot¹, Emilie Barbeau², Marc Léonard² & Barbara A. Demeneix³.

¹ WatchFrog S.A., 4 rue Pierre Fontaine, 91000 Evry, France

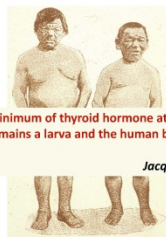
² L'OREAL, Life Sciences Direction, Ecotoxicology, 1 Av. Eugene Schueller, BP22, 93601 Aulnay-sous-Bois, France

³ UMR CNRS 5166 Evolution des Régulations Endocriniennes, Department of Regulations, Development and Molecular Diversity, Muséum National d'Histoire Naturelle, 7 Rue Cuvier, 75231 Paris 05, France

Email contact: lemkin@watchfrog.fr

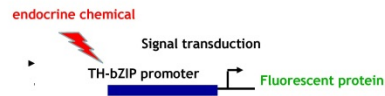


TH/bZIP is an optimal TH response gene induced during metamorphosis that has been shown as a sensitive biomarker for thyroid hormone regulation. This new generation of tests can be applied on early stage amphibian models in order to replace or refine the use of laboratory animal models. A robust protocol that can be used for cross-laboratory validation studies has been established, integrating reliable parameters and providing reproducible results. These findings pave the way for TH-bZIP as an alternative test to the amphibian metamorphosis assay (AMA test – OECD validation in progress) to identify disruptors of thyroid signaling.

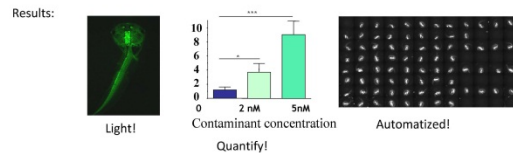


« Without a minimum of thyroid hormone at the right moment of development, the tadpole remains a larva and the human baby remains a cretin »

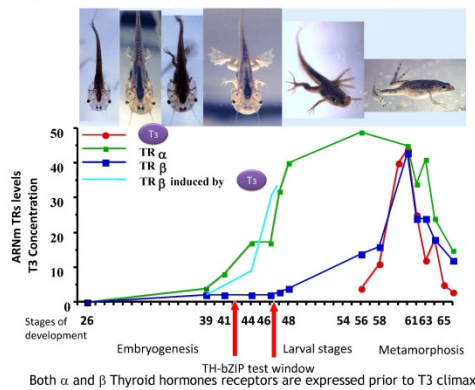
Jacques Legrand 1983



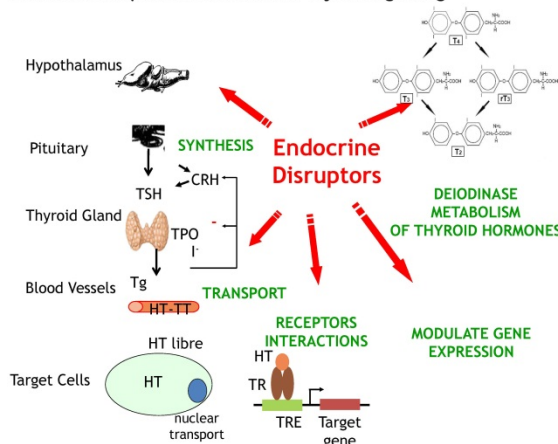
TH-bZIP promoter: genetic target specific to metamorphosis criteria of thyroid disruption



Thyroid hormone-dependent amphibian metamorphosis



Potential disruption mechanisms of thyroid signaling



Absence of false positive

Non-active reference compounds	Pharmaceuticals without known effect on thyroid signaling	Food additives without known effect on thyroid signaling	3 independent experiments			Conclusion (+ if at least twice +)	
			1	2	3		
-	-	-	1 Acetic acid	-	-	-	-
			2 Carboline	-	-	-	-
			3 Cellulose	-	-	-	-
			4 Cellulose sodium	-	-	-	-
			5 Chlorhydrate de Bupivacaine	-	+	-	-
			6 Cromolyn disodic	-	-	-	-
			7 Hydrate Sodium Saccharine	-	+	-	-
			8 Azorubine	-	-	-	-
			9 Sunset Yellow	-	-	-	-

Specificity 100%

Table 1: Testing non active chemicals. (-) expected result in green, (+) unexpected result in orange. Each independent experiment includes three different concentrations. An experiment is considered positive (thyroid disruption) if at least one concentration within an experiment gives a significant result.

High sensitivity

Reference compounds modulating thyroid axis	Activators	Inhibitors	French PNR PE	AMA Phase 1	AMA Phase 2 / PNR PE	AMA Phase 2 / PNR PE	AMA Phase 1	3 independent experiments			Conclusion (+ if at least twice +)			
								1	2	3				
-	+	-	1 Triiodothyronine (T3)	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
			2 Thyroxine (T4)	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
			3 Triiodoacetic acid (TRAC)	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
			4 TETRAC	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
			5 Amiodarone	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
	-		-	-	6 Sodium perchlorate	+	-	+	+	+	+	+	+	+
					7 Methimazole	-	-	+	+	+	+	+	+	+
					8 Iopanic acid	-	-	+	+	+	+	+	+	+
					9 PropylThioUracil (PTU)	-	-	+	+	+	+	+	+	+
					10 PropylThioUracil (PTU)	-	-	+	+	+	+	+	+	+

Sensitivity 87,5%

Table 2: Testing disrupting chemicals. (+) expected result in green, (-) unexpected result in orange. AMA: chemical included in OECD validation procedure; PNR PE: chemical included in French national program. Each independent experiment includes three different concentrations. An experiment is considered positive (thyroid disruption) if at least one concentration within an experiment gives a significant result.

in vivo model with in vitro tools :

- > Easily scalable: working with 96 well plates
- > Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, Toxicity
- > 3 days test (while 21 days for AMA test)
- > 100% specific i.e. absence of false positive, while conserving 87,5% sensitivity

WatchFrog continues developing its technology for other applications:

- > androgenic functions (fish)
- > oestrogenic functions (amphibian & fish)

Perspectives:

- > automatized monitoring on industrial site
- > Validation through dedicated EU and US EPA dedicated programs (ToxCast).

contact: Gregory LEMKINE
lemkin@watchfrog.fr

Annexe IV : Matériel et Méthodes

Matériel

Substances chimiques

Le MS222 (tricaïne méthanesulfonate) et la grande majorité des substances de référence ont été achetées chez Sigma : acide acétylsalicylique (50-78-2), amantadine (665-66-7), hydrochlorure de bupivacaine (18010-40-7), hydrate de chlorure de cadmium (7790-78-5), captopril (62571-86-2), cyclophosphamide C (6055-19-2), dihydrochlorure d'éthambutol (1070-11-7), fluorouracil (51-21-8), hydroxyurée (127-07-1), isoniazid (54-85-3), lévamisol (16595-80-5), chlorure de lithium (7447-41-8), métronidazole (443-48-1), saccharine (81-07-2), caféine (58-08-2), colchicine (64-86-8), hydroxyzine (68-88-2), amarante (915-67-3), ceftriaxone (73384-59-5), cromolyn disodique, (15826-37-6), cyclamate de sodium (139-05-9) et monohydrate de lactitol (81025-04-9). Le 6-aminonicotinamide (329-89-5) et l'acide acétohydroxamique (546-88-3) ont été achetées chez Aldrich. L'éthylenethiourée (96-45-7) a été achetée chez Acros et l'uréthane (51-79-6) chez Fluka.

Organismes

Les œufs de danio au stade *blastula* nous ont été fournis par l'Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS / Parc Technologique ALATA BP n°2 / 60550 VERNEUIL en HALATTE).

Les œufs de médaka au stade *blastula* nous ont été fournis par l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA / Laboratoire de Génétique des Poissons / 78352 Jouy en Josas).

Les œufs de xénope au stade *blastula* nous ont été fournis par le Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS / UMR 8572 Évolution des régulations endocriniennes / Muséum National d'Histoire Naturelle / 75231 Paris).

Équipements

Pour les différents tests de tératogénicité, un analyseur de carbone en phase liquide, une enceinte thermorégulée avec cycle lumineux, un stéréomicroscope (LEICA MZ 125) relié au logiciel LEICA IM1000 ainsi que des plaques de culture 6 puits nous ont été nécessaires.

Méthodes

Hydrosolubilité des substances de référence

Avant le lancement des premiers essais et en l'absence des organismes, la solubilité de ces références dans les milieux de culture des poissons et du xénope est appréciée par une mesure de Carbone Organique Total (COT) à l'aide d'un analyseur de carbone en phase liquide. La technique utilisée consiste à ajouter du persulfate (oxydant fort) à l'échantillon filtré à 0,45µm (pour ne conserver que la partie solubilisée de la solution) puis de le chauffer à 100°C pour former du dioxyde de carbone (CO₂). Le taux de CO₂ ainsi formé est ensuite mesuré par analyse infrarouge non dispersive. Cette mesure de quantité de carbone permet d'apprécier la mise en solution des substances dans nos conditions opératoires. Il s'agit de comparer le pourcentage théorique attendu de la substance au pourcentage de carbone mesuré. Même si les milieux d'essai ne possèdent pas de carbone organique mais uniquement des sels minéraux, par principe, la quantité de carbone des milieux d'essai seuls est mesurée et soustraite si nécessaire aux différentes valeurs pour ne prendre en compte que le carbone des substances.

Exposition des embryons

Dès réception au laboratoire, les organismes sont observés. Les œufs vivants au stade *blastula* sont exposés de manière continue à un gradient de concentrations de la substance à tester dans leur milieu de culture. Deux lots de 10 œufs sont placés chacun dans 10 mL de solution dans des plaques de culture de 6 puits. La solution est renouvelée au cours de l'essai pour maintenir les concentrations de la substance mais aussi le taux d'oxygène dissous du milieu et compenser l'acidification du milieu. Ceci permet d'obtenir la fenêtre d'exposition la plus grande possible pour couvrir l'ensemble de l'organogénèse et ainsi maximiser les conditions d'obtention de malformations.

Les mêmes principes sont appliqués à chacun des tests, mais chaque matériel et protocole est adapté à chaque espèce (Tableau 1).

Tableau 1 : Adaptations du protocole à chaque organisme

	Poisson zèbre	Médaka	Xénope
Durée de l'essai	6 jours	9 jours	4 jours
Milieu de culture	1 g/L NaCl, 30 mg/L KCl, 40 mg/L CaCl ₂ 2H ₂ O, 40 mg/L MgSO ₄ 7H ₂ O, 4 mg bleu de méthylène, Eau osmosée qsp 1 L		625 mg NaCl, 96 mg NaHCO ₃ , 30 mg KCl, 15 mg CaCl ₂ , 60 mg CaSO ₄ 2H ₂ O, 75 mg MgSO ₄ Eau osmosée qsp 1 L
Nombre de renouvellements de milieu	2	3	1
Température	26°C	28°C	24°C
Cycle lumineux	14h de lumière / 10 h d'obscurité		Obscurité totale

L'évaluation de la tératogénicité est réalisée en deux étapes. Dans une première étape, les embryons sont exposés à une gamme de concentration logarithmique de 1, 10, 100 et 1000 mg.L⁻¹ de la substance à tester. Ceci permet de déterminer les classes de concentration à intégrer dans l'essai « définitif » pour cibler les effets létaux et les malformations. Après ce premier essai, un second essai est réalisé avec un minimum de 5 concentrations pour idéalement obtenir une absence d'effet léthal ou malformatif à la concentration la plus basse, une concentration avec 100 % d'effet tératogène et une dernière avec 100 % d'effet léthal. La concentration maximale des tests d'écotoxicité est 100 mg/L. Lors de l'évaluation du risque pour l'Homme, un facteur 10 ou 100 est classiquement appliqué. Dans nos tests, la concentration maximale testée est 1 g.L⁻¹. Si des effets tératogènes sont observés autour de cette valeur, les concentrations sont augmentées dans la limite de 4 g/L.

Observation de la létalité et des malformations des embryons

À la fin de l'essai, les organismes sont observés grâce à un stéréomicroscope relié à un logiciel d'acquisition et d'analyse d'images. Si la gamme de concentrations a été choisie de manière adéquate, un gradient de létalité est observé, idéalement avec une concentration basse avec 0 % de létalité et la concentration la plus haute avec 100 % de létalité. Le nombre de morts observés pour chaque concentration permet de réaliser un calcul statistique de régression permettant d'extrapoler une valeur de concentration à laquelle précisément 50 % des individus exposés à une substance sont morts : la CL50.

Chez les individus vivants, sont d'abord recherchées des malformations fonctionnelles telles qu'une nage non coordonnée, une hyperventilation, une modification du rythme cardiaque ou une immobilité anormale. Un léger stimulus mécanique avec une pipette pasteur est réalisé pour induire un comportement de fuite. Lorsqu'une anomalie du comportement est

observée, elle est notée « AC » dans la feuille de suivi. Un exemple de feuilles de suivi pour le test de tératogénicité utilisant le médaka est présenté dans la Figure 1. Le même type de feuilles a été utilisé pour le suivi des embryons de poisson zèbre et de xénope.

TEST DE TERATOGENICITE SUR ŒUFS DE MEDAKA (<i>Oryzias latipes</i>)																							
Test définitif																							
Nature du composé :		Colchicine			pH					Solubilité													
Code :					Osmolarité					Totale			Partielle		Non sol.								
Lot :					Photopériode		14h 10h			X													
% MA :					Température		26°C																
Solution mère (en mg/L) :		100			Taux d'oxygène dissout		≥ 60 %																
10 mL de milieu par puits avec un renouvellement 3 fois par semaine																							
Concentrations mg/l	Date	J0		J4		J7			J9								RESULTATS						
		09/04/2004	13/04/2004	16/04/2004	18/04/2004	mort	Anom.	eclos	mort	AC	MT	O	Y	D	DA	MM	MS	eclos	mort	Anomalie	eclos	% Mortalité	% Anomalie
Témoin	puits 1	10	0			2	4	0										8	2	0	18	10	0
	puits 2	10	0			0	3	0										10					
1,0	puits 1	10	1			0	3	0			2							9	1	3	19	5	16
	puits 2	10	0			0		0		1								10					
5,0	puits 3	10	0			0	1	4		4								9	1	10	19	5	53
	puits 4	10	0			0	4	0		3	1			1	1			10					
7,5	puits 5	10	0			0		1		1	2							7	2	6	16	10	33
	puits 6	10	0			0	7	1		3								9					
10,0	puits 1	10	0			0	1	4		2									7	5	0	35	38
	puits 2	10	0			0	5	3		2	1												
12,5	puits 3	10	0			0	4	5		2						1			11	5	0	55	56
	puits 4	10	1			0	4	5		2													
15,0	puits 5	10	0			1	3	9											18	2	0	90	100
	puits 6	10	1			0	7				2												
17,5	puits 1	10	0			0	2	9			1								18	2	0	90	100
	puits 2	10	0	1		0	1	9			1												
20	puits 3	10	0			0		10											20	0	0	100	0
	puits 4	10	0			0	4	10															

AC : Anomalie du Comportement / MT : Modification de la taille / O : Œdème / Y : Yeux / D : Dépigmentation / DA : Déformation Axiale / MM : Malformations multiples / MS : Malformations Sévères

Figure 1 : Exemple de feuilles de suivi d'un test de tératogénicité utilisant les embryons de médaka

Les malformations physiques majeures sont ensuite recherchées : anomalies du squelette (DA : Déformation Axiale), des yeux (Y), de la tête, de la pigmentation (D), la présence d'œdèmes (O) et la modification de la taille (MT) de l'organisme (Figures 2 et 3). Pour la mesure de la taille, les alevins vésiculés et les têtards sont anesthésiés avec du MS222, ceux d'un même puits sont positionnés les uns par rapport aux autres pour acquérir une photo globale du puits ainsi que pour faciliter les mesures individuelles. La taille de chacun est mesurée par analyse d'image. Lorsque la taille mesurée par analyse d'image dépasse la valeur moyenne de la taille des témoins historiques de plus de 2 écart-types, la modification de la taille est alors considérée comme significative. Comme l'objectif de ce test de criblage est d'identifier une substance tératogène quel que soit le type de malformation induite, si un individu vivant présente une ou plusieurs malformations, il n'est répertorié qu'une seule fois. Dans le cas de deux malformations observées, la malformation la plus sévère est notée. Un

individu peut présenter plus de deux malformations, il est alors identifié et noté « MM » pour Malformations Multiples. Si les différentes parties de l'organisme sont difficilement distinguables et pourtant un battement cardiaque existe, l'individu est alors identifié et noté « MS » pour Malformations Sévères. Dans ces derniers cas, l'étape de neurulation a généralement eu lieu mais l'organogénèse semble avoir été fortement perturbée.

Anomalies observables au stade œuf (J5) :



Anomalies observables au stade alevin vésiculé :



Figure 2 : Exemples de malformations observables chez les embryons de médaka

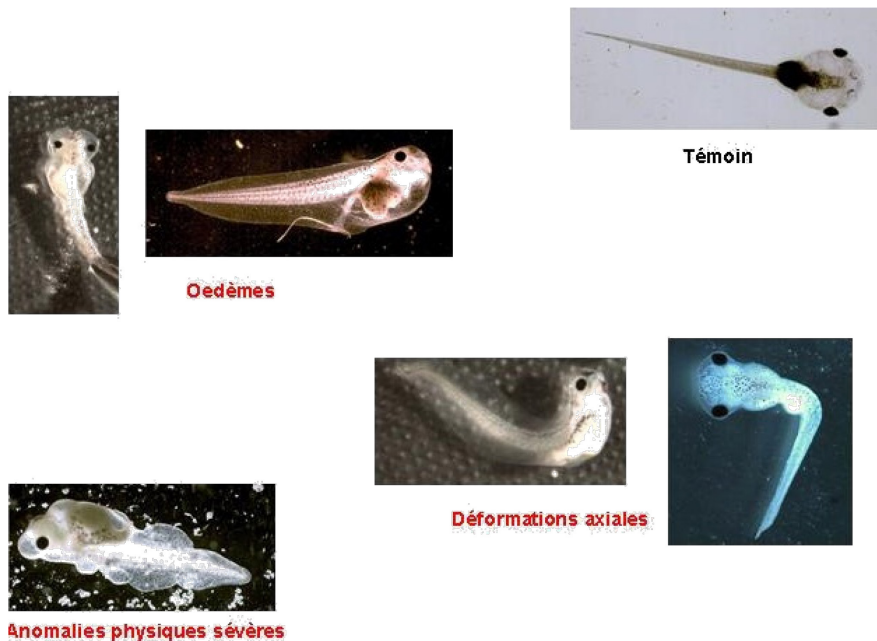


Figure 3 : Exemples de malformations observables chez les embryons de xénope

Si la gamme de concentrations a été choisie de manière adéquate, un gradient de malformations (fonctionnelle et / ou physique) est observé. Idéalement, pour une concentration basse, aucune malformation ne doit être observée et pour une concentration haute, tous les individus vivants doivent avoir au moins une malformation. Des concentrations intermédiaires avec une partie des individus possédant des malformations sont également requises. Le nombre d'individus malformés par concentration permet de réaliser un calcul statistique de régression permettant d'extrapoler une valeur de concentration à laquelle précisément 50 % des individus vivants exposés à une substance présentent des malformations : la CE50.

Calculs de la CL50, de la CE50 et de l'Indice Tératogène

À partir des observations faites sur la gamme de concentration, la CL50 et la CE50 sont calculées avec le test statistique de régression « EPA Probit Analysis Program used for calculating LC/EC values version 1.5 ». Si les conditions ne sont pas remplies pour réaliser le test Probit (notamment absence de réponse à une concentration et réponse totale à une autre ainsi que des réponses intermédiaires entre les deux), un autre test statistique de régression « Trimmed Spearman Karber version 1.5 » (TSK) est appliqué. Les valeurs de CL50 et de CE50 sont obtenues avec un intervalle de confiance de 95 %.

L'indice tératogène (IT) est ensuite calculé pour chaque substance testée. Il est important que les valeurs de la CL50 et de la CE50 proviennent d'un même essai. En effet, l'IT, rapport entre les valeurs de la CL50 et de la CE50, permet de s'affranchir de la variabilité interindividuelle d'une ponte à une autre et d'avoir une meilleure répétabilité des IT. L'effet tératogène de la substance testée est d'autant plus important que l'IT est élevé. À une concentration, une substance peut avoir des effets tératogènes sans avoir d'effet léthal : l'IT est alors très supérieur à 1. Lorsque des effets tératogènes ne sont observés qu'en présence d'effet léthal, l'IT obtenu peut être inférieur à 1. Lorsqu'aucun effet tératogène n'est observé, la CE50 ne peut pas être calculée, l'IT est alors indiqué comme « Non Applicable » (NA). La même règle est appliquée lorsqu'aucun effet léthal ou tératogène n'est observé aux concentrations testées.

Conditions de validité d'un essai

Plusieurs critères doivent être remplis pour qu'un essai soit considéré comme valide. Tout d'abord, comme beaucoup de tests d'écotoxicité, l'essai est valide lorsque moins de 20 % d'effet léthal ou tératogène est observé chez le groupe témoin. Le second critère de validité est que l'essai à lui seul permette de déterminer un IT.

L'essai valide doit ensuite être confirmé avec un second essai. L'essai est confirmé lorsque les valeurs de CL50 et de CE50 ou l'IT sont comparables à ceux du nouvel essai. L'IT le plus défavorable est pris en compte pour déterminer la performance du test. Si les valeurs de CL50 et de CE50 ainsi que l'IT diffèrent de l'essai précédent, l'essai est valide mais non confirmé. Un essai complémentaire est alors nécessaire.

Test de concordance de chaque test de tératogénicité

La performance du test est évaluée selon la méthode Kappa de Cohen (Viera et al. 2005; Carletta 1996). Il s'agit d'un outil statistique mesurant l'accord entre plusieurs observateurs selon des catégories qualitatives.

Pour cela, les résultats obtenus dans les tests de tératogénicité sur les organismes sélectionnés sont confrontés à ceux attendus par rapport aux différentes catégories de substances de référence positive ou négative (classification selon des données *in vivo* issues de différentes sources d'information). Des concordances sont réalisées à l'aide de différents paramètres : la sensibilité, la spécificité, la concordance observée, la concordance attendue et la valeur κ (Tableau 2).

Tableau 2 : Tableau de concordance entre les résultats attendus et ceux observés

		Classification de référence		
		Tératogène	Non tératogène	Total
Résultats du test de tératogénicité	Effet tératogène	VP	FP	VP + FP
	Absence d'effet tératogène	FN	VN	FN + VN
	Total	VP + FN	FP + VN	T

Légende :

VP : Vrai Positif
 VN : Vrai Négatif
 FP : Faux Positif
 FN : Faux Négatif
 T : effectif total

La sensibilité est la probabilité pour qu'une substance de référence classée tératogène soit prédite tératogène par le test considéré. Elle correspond à la proportion de résultats positifs correctement prédits (« Vrais Positifs » = VP) en fonction des résultats faussement négatifs (« Faux Négatifs » = FN) par le test considéré : $VP / (VP + FN)$.

La spécificité est la probabilité pour qu'un produit classé non tératogène soit prédit non tératogène (« Vrais Négatifs » = VN) en fonction des résultats faussement positifs (« Faux Positifs » = FP) par le test considéré. Elle équivaut donc à la proportion de résultats négatifs correctement prédits par le test : $VN / (VN + FP)$.

La concordance observée (Co) est la part totale de résultats correctement prédits par le test. Elle exprime la conformité de prédiction : $(VP + VN) / T$. La concordance attendue (Ca) prend également en compte les résultats non prédits correctement : $[((VP+FP)*(VP+FN))+((FP+VN)*(FN+VN))] / T$.

L'indice Kappa (κ) donne une indication de la performance du test : $(Co - Ca) / (1 - Ca)$. Si $\kappa < 0$: désaccord, entre 0,0 et 0,20 : accord très faible, entre 0,21 et 0,40 : accord faible, entre 0,41 et 0,60 : accord modéré, entre 0,61 et 0,80 : accord fort ; entre 0,81 et 1,00 : accord presque parfait.

La valeur prédictive négative (VPN) est la proportion des substances de référence classées non tératogènes correctement prédite parmi l'ensemble des prédictions négatives : $VPN = VN / (VN + FN)$.

La valeur prédictive positive (VPP) est la proportion des substances de référence classées tératogènes correctement prédite parmi l'ensemble des prédictions positives : $VPP = VP / (VP + FP)$.

La prédictivité globale est la moyenne de la valeur prédictive négative et de la valeur prédictive positive $(VPN + VPP) / 2$.

Annexe V: Poster “Development of a predictive assay of developmental toxicity with medaka fish”

DEVELOPMENT OF A PREDICTIVE ASSAY OF DEVELOPMENTAL TOXICITY WITH MEDAKA FISH (ORYZIAS LATIPES)

E. BARBEAU, M. VANPOUCKE and M. LEONARD

L'OREAL Life Science Research, Ecotoxicology Unit, Paris, France.

ABSTRACT

To identify mammalian teratogenic chemicals, we developed an assay with medaka fish (*Oryzias latipes*). We evaluated the sensitivity of medaka from embryos (before hatching) up to eleutheroembryo stage (2 days post hatching), with a semi-static exposure regime (test solution renewal 3 times / week). 48 reference chemicals were selected: 26 chemicals known to be teratogenic and 22 non-teratogenic chemicals. Medaka embryos were exposed for 9 days (26°C) from the blastula stage up to the eleutheroembryo stage (2 days post hatching). At day 9, lethal and sublethal endpoints were assessed including skeletal defects, microcephaly, eye defects, oedema, haemorrhage and depigmentation. An LC50 and an EC50 were determined and a teratogenic index (TI = LC50/EC50) was calculated for each chemical. 100% specificity (no false teratogenicity prediction) was obtained with a TI threshold of 2.4 — for this set of 48 reference chemicals. Thus, if TI \geq 2.4 the chemical is embryotoxic for the medaka and is highly suspected of being teratogenic for mammals. Overall, the sensitivity of the test was 73%; almost 3/4 of the reference mammalian teratogenic chemicals were identified with no false positive prediction. In conclusion, we recommend the use of fish embryos in coherent testing strategies for the identification of mammalian teratogenic chemicals.

INTRODUCTION

Fish have been reported as potential alternative models for the identification of mammalian teratogenic agents as the main steps of development during fish embryogenesis are conserved throughout vertebrates phylogenesis (cf. Bibliography below). The use of fish embryos in the detection of laboratory animals (OE 66/609/EEC) rather than being dependent on the food supply from the egg, the EU Cosmetics Directive and the proposed REACH legislation promote the use of *in vitro* methods for the initial hazard evaluation of chemicals. To comply with these requirements, we developed an alternative method whereby medaka embryos are exposed from the blastula stage up to the eleutheroembryo stage (2 days post hatching).

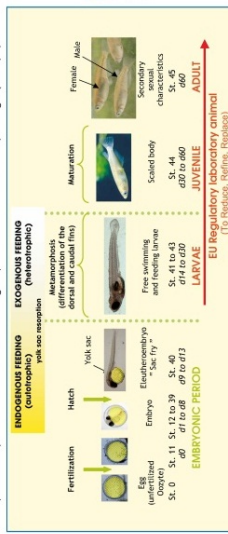


Figure 1: Fish developmental stages

The terms *Embryo- and Eleutheroembryo- refer to B&LON (1971, 1975) -terminology of intervals in fish development.*

MATERIAL AND METHODS

Medaka embryos were exposed to a set of 48 hydrosoluble reference chemicals (See Table 1).
 • 26 mammalian teratogenic chemicals:
 3 chemicals classified (R6) (major cause harm to the unborn child*) or (R63) (possible risk of harm to the unborn child*).
 13 chemicals classified (R4) (major cause harm to the environment).
 • 22 mammalian non-teratogenic chemicals:
 8 non-teratogenic chemicals for more than 2 mammalian species.
 14 non-teratogenic chemicals (proprietary chemicals) in 1 rodent species.
 Medaka embryos were exposed for 9 days (26°C) from the blastula stage up to the eleutheroembryo stage (2 days post hatching), with a semi-static exposure regime (test solution renewal 3 times / week).
 At day 9, lethal and sublethal endpoints were assessed: skeletal defects, microcephaly, eye defects, oedema, haemorrhage, depigmentation, etc...



Figure 2: Examples of developmental abnormalities observed in medaka

Multiple abnormalities, microcephaly, eye and skeletal defects...
 Skeletal defects
 Oedema
 Oedema + Skeletal defects
 Oedema + Haemorrhage + Skeletal defects...
 An LC50 and an EC50 were determined for each chemical:
 • LC50 (mg/L): concentration of the chemical which causes the death of 50% of the exposed organisms.
 • EC50 (mg/L): concentration of the chemical which causes abnormalities in 50% of the exposed organisms.
 LC50 and EC50 were based on nominal concentrations due to the hydrosolubility of these reference chemicals.
 A teratogenic index (TI = LC50/EC50) was calculated for each chemical.
 100% specificity (no false teratogenicity prediction) was obtained with a TI threshold of 2.4 with this set of 48 reference chemicals.
 This led to the following data interpretation:
 • TI \geq 2.4: the chemical is toxic for the development of medaka at sub-lethal concentrations and is highly suspected of being teratogenic in mammals.
 • TI < 2.4: no conclusion can be drawn on the potential teratogenicity of the chemical in mammals.

RESULTS

Table 1: The predictive assay of developmental toxicity with medaka

Chemicals	CAS Number	Ref. Values (LC50, EC50)	Teratogenicity Prediction (TI)
Benzoic acid	133-20-9	182	0.17
Benzoic acid, sodium salt	1332-87-4	187	0.17
Benzoic acid, potassium salt	1332-86-7	181	0.17
Benzoic acid, calcium salt	1332-85-0	180	0.17
Benzoic acid, magnesium salt	1332-84-3	180	0.17
Benzoic acid, zinc salt	1332-83-6	180	0.17
Benzoic acid, barium salt	1332-82-9	180	0.17
Benzoic acid, strontium salt	1332-81-2	180	0.17
Benzoic acid, calcium salt	1332-80-5	180	0.17
Benzoic acid, potassium salt	1332-79-8	180	0.17
Benzoic acid, sodium salt	1332-78-1	180	0.17
Benzoic acid, calcium salt	1332-77-4	180	0.17
Benzoic acid, magnesium salt	1332-76-7	180	0.17
Benzoic acid, zinc salt	1332-75-0	180	0.17
Benzoic acid, barium salt	1332-74-3	180	0.17
Benzoic acid, strontium salt	1332-73-6	180	0.17
Benzoic acid, calcium salt	1332-72-9	180	0.17
Benzoic acid, potassium salt	1332-71-2	180	0.17
Benzoic acid, sodium salt	1332-70-5	180	0.17
Benzoic acid, calcium salt	1332-69-8	180	0.17
Benzoic acid, magnesium salt	1332-68-1	180	0.17
Benzoic acid, zinc salt	1332-67-4	180	0.17
Benzoic acid, barium salt	1332-66-7	180	0.17
Benzoic acid, strontium salt	1332-65-0	180	0.17
Benzoic acid, calcium salt	1332-64-3	180	0.17
Benzoic acid, potassium salt	1332-63-6	180	0.17
Benzoic acid, sodium salt	1332-62-9	180	0.17
Benzoic acid, calcium salt	1332-61-2	180	0.17
Benzoic acid, magnesium salt	1332-60-5	180	0.17
Benzoic acid, zinc salt	1332-59-8	180	0.17
Benzoic acid, barium salt	1332-58-1	180	0.17
Benzoic acid, strontium salt	1332-57-4	180	0.17
Benzoic acid, calcium salt	1332-56-7	180	0.17
Benzoic acid, potassium salt	1332-55-0	180	0.17
Benzoic acid, sodium salt	1332-54-3	180	0.17
Benzoic acid, calcium salt	1332-53-6	180	0.17
Benzoic acid, magnesium salt	1332-52-9	180	0.17
Benzoic acid, zinc salt	1332-51-2	180	0.17
Benzoic acid, barium salt	1332-50-5	180	0.17
Benzoic acid, strontium salt	1332-49-8	180	0.17
Benzoic acid, calcium salt	1332-48-1	180	0.17
Benzoic acid, potassium salt	1332-47-4	180	0.17
Benzoic acid, sodium salt	1332-46-7	180	0.17
Benzoic acid, calcium salt	1332-45-0	180	0.17
Benzoic acid, magnesium salt	1332-44-3	180	0.17
Benzoic acid, zinc salt	1332-43-6	180	0.17
Benzoic acid, barium salt	1332-42-9	180	0.17
Benzoic acid, strontium salt	1332-41-2	180	0.17
Benzoic acid, calcium salt	1332-40-5	180	0.17
Benzoic acid, potassium salt	1332-39-8	180	0.17
Benzoic acid, sodium salt	1332-38-1	180	0.17
Benzoic acid, calcium salt	1332-37-4	180	0.17
Benzoic acid, magnesium salt	1332-36-7	180	0.17
Benzoic acid, zinc salt	1332-35-0	180	0.17
Benzoic acid, barium salt	1332-34-3	180	0.17
Benzoic acid, strontium salt	1332-33-6	180	0.17
Benzoic acid, calcium salt	1332-32-9	180	0.17
Benzoic acid, potassium salt	1332-31-2	180	0.17
Benzoic acid, sodium salt	1332-30-5	180	0.17
Benzoic acid, calcium salt	1332-29-8	180	0.17
Benzoic acid, magnesium salt	1332-28-1	180	0.17
Benzoic acid, zinc salt	1332-27-4	180	0.17
Benzoic acid, barium salt	1332-26-7	180	0.17
Benzoic acid, strontium salt	1332-25-0	180	0.17
Benzoic acid, calcium salt	1332-24-3	180	0.17
Benzoic acid, potassium salt	1332-23-6	180	0.17
Benzoic acid, sodium salt	1332-22-9	180	0.17
Benzoic acid, calcium salt	1332-21-2	180	0.17
Benzoic acid, magnesium salt	1332-20-5	180	0.17
Benzoic acid, zinc salt	1332-19-8	180	0.17
Benzoic acid, barium salt	1332-18-1	180	0.17
Benzoic acid, strontium salt	1332-17-4	180	0.17
Benzoic acid, calcium salt	1332-16-7	180	0.17
Benzoic acid, potassium salt	1332-15-0	180	0.17
Benzoic acid, sodium salt	1332-14-3	180	0.17
Benzoic acid, calcium salt	1332-13-6	180	0.17
Benzoic acid, magnesium salt	1332-12-9	180	0.17
Benzoic acid, zinc salt	1332-11-2	180	0.17
Benzoic acid, barium salt	1332-10-5	180	0.17
Benzoic acid, strontium salt	1332-9-8	180	0.17
Benzoic acid, calcium salt	1332-8-1	180	0.17
Benzoic acid, potassium salt	1332-7-4	180	0.17
Benzoic acid, sodium salt	1332-6-7	180	0.17
Benzoic acid, calcium salt	1332-5-0	180	0.17
Benzoic acid, magnesium salt	1332-4-3	180	0.17
Benzoic acid, zinc salt	1332-3-6	180	0.17
Benzoic acid, barium salt	1332-2-9	180	0.17
Benzoic acid, strontium salt	1332-1-2	180	0.17
Benzoic acid, calcium salt	1332-0-5	180	0.17

(1) TI = 0 due to absence of developmental abnormalities below LC50 value
 (2) ND due to absence of lethality and/or absence of developmental abnormalities

Table 2: Statistical analysis results using the kappa test
 Specificity = CIP / (CNP + IPN) = 100%
 Sensitivity = CIP / (CIP + INP) = 73%
 Assessment rate (AR) = (CIP + CNP) / 48 = 65%
 Agreement rate (AG) = 0.49
 Kappa (K) = (A - AR) / (1 - AR) = 0.71
 According to LANDIS and KOCH, the agreement is good (0.61 \leq K \leq 0.80).

CONCLUSIONS

This study shows that determining the teratogenic index in the Medaka fish (TI = Lethality C50/Embryotoxicity C50) may be a valuable alternative method for identifying mammalian teratogenic chemicals.
 Using this set of 48 reference chemicals, the assay correctly identified almost 3/4 of the teratogenic chemicals with no false positive prediction.
 The low cost and short duration of the test make it suitable for the screening of large numbers of chemicals.

BIBLIOGRAPHY

- BALON EK, J. Fish. Res. Board Can. 32: 1643-1670 (1975); Environmental Biology of Fishes 55: 17-38 (1999)
- BIGGS W. J., BLACK, J. A., WESTERMAN, A. G. and BAMEY, B. A. Fish and Amphibian Embryos – A Model System for Evaluating Teratogenicity. Toxicological Sciences Volume 3, Number 4
- CAMERON L. L., LAWRENCE W. C., LUM, J. B. Medaka egg as a model system for screening potential teratogens. Prevention of Physical and Mental Congenital Defects Part C 2:19-243 (1985)
- SEBASTIEN B., MOUS B., GARRIC, J. Development of a 4-day embryo-based bioassay to assess toxicity of chemical. Ecotoxicology and Environmental Safety 43: 253-267 (2000)
- LANDIS JR, KOCH GG. Biometrics 33(1):159-74 (1977); Biometrics 33(2):363-74 (1977)
- LANDIS JR, KOCH GG. The embryo-fish with the Zebrafish Danio rerio – a general model in Ecotoxicology and Toxicology. ALEXIS 19: suppl 1/2 p. 38-48 (2002)
- MOUS B., SEBASTIEN B., GARRIC, J. Development of a 4-day embryo-based bioassay to assess toxicity of chemical. Ecotoxicology and Environmental Safety 43: 253-267 (2000)
- VAN LEEUWIC, J., GROOTELAIRE M. M., NEBERG, G. Rep. Embryos as Teratogenicity Screens: A Comparison of Embryotoxicity between Fish and Birds. Ecotoxicology and Environmental Safety 20: p. 45-52 (1990)

Annexe VI : Poster “Development of a predictive assay of developmental toxicity with early life stages medaka fish”

DEVELOPMENT OF A PREDICTIVE ASSAY OF DEVELOPMENTAL TOXICITY WITH MEDAKA FISH (ORYZIAS LATIPES) EARLY LIFE STAGES

Emilie BARBEAU¹, Frédéric BOURGEON², Nathalie MELAINE², Marc LEONARD¹

¹Ecotoxicology, L'OREAL, Aulnay-sous-bois, France, ebarbeau@rd.lore.com, +33 1 48 68 89 26
²INNOVA PROTEOMICS, Campus de Beaulieu, Rennes, France, nathalie.melaine@innovaproteomics.com, +33 2 23 23 52 80

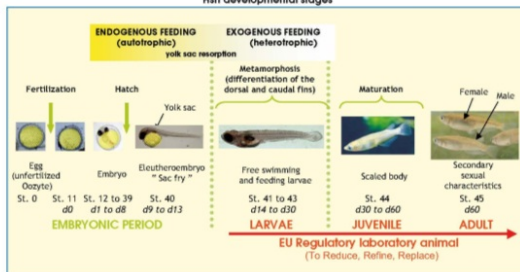
ABSTRACT

To identify teratogenic chemicals for mammals (including humans), we developed an assay with medaka (*Oryzias latipes*) early life stages (from blastula to eleutheroembryo stage), before they reach the larval stage protected by EU regulation (Dir 86/609/EEC). With a set of 48 reference chemicals (26 reference chemicals known to be teratogenic and 22 non teratogenic for mammals), the sensitivity of the test reached 69% (identification of more than 2/3 of the mammals teratogenic chemicals) with a 100% specificity (no false teratogenic chemical identification). We are working at increasing the assay sensitivity by adding behavioral parameters (spontaneous and triggered activity) and by identifying protein biomarkers thanks to differential DIGE-based proteomics studies. We conclude on the potential of this alternative method to be included in a coherent testing strategy for the identification of human teratogenic chemicals.

INTRODUCTION

Fish have been reported as potential alternative models for the identification of mammalian teratogenic agents as the main steps of development during fish embryogenesis are conserved throughout vertebrates phylogenesis (cf. Bibliography below). Fish, as any living vertebrate other than man, fall into the scope of the European regulation for the protection of laboratory animals (Dir 86/609/EEC). The protection extends to larval stages of development, but excludes embryonic stages before they become capable of feeding independently rather than being dependent on the food supply from the egg. The EU Cosmetics Directive and the proposed REACH legislation promote the use of *in vitro* methods for the initial hazard evaluation of chemicals. To comply with these requirements, we developed an alternative method whereby medaka embryos are exposed from the blastula stage up to the eleutheroembryo stage (2 days post hatching).

Figure 1: Fish developmental stages



MATERIAL AND METHODS

Medaka embryos were exposed to a set of 48 hydrosoluble reference chemicals.

- 26 mammalian teratogenic chemicals:
 - 13 chemicals classified: R61 ("may cause harm to the unborn child") or R63 ("possible risk of harm to the unborn child")
 - 13 chemicals with teratogenic data (MSDS, FETAX database, Catalog of teratogenic agents, BIAM database and VIDAL Dictionary)
- 22 mammalian non-teratogenic chemicals:
 - 8 non-teratogenic chemicals for more than 2 mammalian species
 - 14 non-teratogenic chemicals (proprietary chemicals) in 1 rodent species.

Medaka embryos were exposed for 9 days (26°C) from the blastula stage up to the eleutheroembryo stage (2 days post hatching), with a semi-static exposure regime (test solution renewal 3 times / week).

At day 9, lethal and sublethal endpoints were assessed: skeletal defects, microcephaly, eye defects, oedema, hemorrhage, depigmentation, etc...

An LC50 and an EC50 were determined for each chemical:

- LC50 (mg/L): concentration of the chemical which causes the death of 50% of the exposed organisms.
- EC50 (mg/L): concentration of the chemical which causes abnormalities in 50% of the exposed organisms.

LC50 and EC50 were based on nominal concentrations due to the hydrosolubility of these reference chemicals.

A teratogenic index (TI = LC50/EC50) was calculated for each chemical.

100% specificity (no false teratogenicity prediction) was obtained with a TI threshold of 2.4 with this set of 48 reference chemicals.

This led to the following data interpretation:

- TI > 2.4: the chemical is toxic for the development of medaka at sub-lethal concentrations and is highly suspected of being teratogenic in mammals.
- TI < 2.4: no conclusion can be drawn on the potential teratogenicity of the chemical in mammals

RESULTS

Table 1: Statistical analysis results using the Kappa test

Teratogenicity prediction (based on medaka assay)	Teratogenicity classification		
	TC	NTC	Total
	Yes	CPP = 19	FPP = 0
No	FNP = 7	CNP = 22	FNP + CNP = 29
Total	CPP + FNP = 26	FPP + CNP = 22	48

Legend:
 TC : Teratogenic Chemicals
 NTC : Non Teratogenic Chemicals
 CPP : Correct Positive Prediction
 FPP : False Positive Prediction
 CNP : Correct Negative Prediction
 FNP : False Negative Prediction

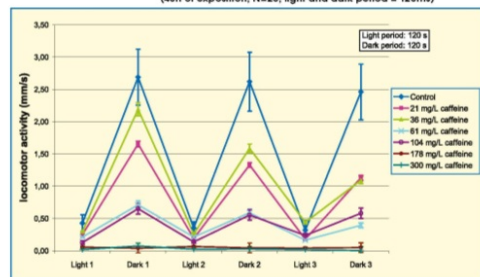
Specificity = CNP / (CNP + FNP) = 100%
 Sensitivity = CPP / (CPP + FPP) = 73%
 Agreement (A) = (CPP + CNP) / 48 = 85%
 Agreement rate (AR) = [(CPP+FNP)*(CPP+FNP)] + [(FPP+CNP)*(FNP+CNP)] / 48² = 0.49
 Kappa (K) = (A - AR) / (1 - AR) = 0.71

According to LANDIS and KOCH, the agreement is good (0.61 < K < 0.80).

IN PROGRESS

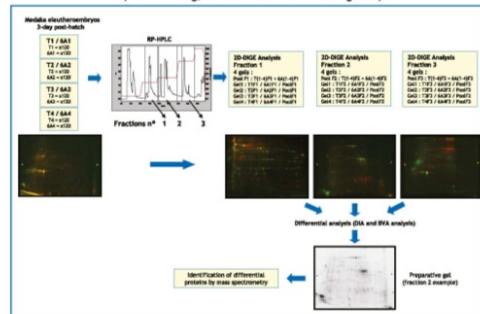
Behavioral parameters
 With a light stimulation, individual locomotion activity is assessed by a behavioral equipment (ZebraBox, VIEWPOINT). If medaka eleutheroembryo speed is higher than 7 mm/s, its behavior will be considered as hyperactive. This parameter seems to be the most relevant to evaluate an alteration of the central nervous system or an abnormality.

Figure 2: Effects of caffeine on locomotion activity with medaka eleutheroembryo (48h of exposition, N=20, light and dark period = 120ms)



Protein biomarkers
 Thanks to differential DIGE-based proteomics studies, several proteic biomarkers were identified for an exposition to a strong teratogenic reference: 6 aminonicotinamide.

Figure 3: Differential DIGE analysis on eleutheroembryos of 3 days post hatching exposed to 50mg/L of aminonicotinamide during 9 days



Protein biomarkers identified for 6 aminonicotinamide:

- Aconitase 2
- Glutamate dehydrogenase 1
- Trionstein
- Triose phosphate isomerase B
- Apolipoprotein E2

CONCLUSIONS

- This study shows that determining the Teratogenic Index in the Medaka fish (TI = Lethality C50/Ecotoxicity C50) may be a valuable alternative method for identifying mammalian teratogenic chemicals.
- Using this set of 48 reference chemicals, the assay correctly identified almost 3/4 of the teratogenic chemicals with no false positive prediction. The low cost and short duration of the test make it suitable for the screening of large numbers of chemicals.
- The sensitivity of this assay will be performed by adding more individual endpoints like behavioral parameters (spontaneous and triggered activity) and protein biomarkers.

BIBLIOGRAPHY

- BALON E.K. J. Fish. Res. Board Can., 32: 1663-1670. (1975); Environmental Biology of Fishes 56: 17-38 (1999)
- BIRGE W. J., BLACK J. A., WESTERMAN A. G. and RAMEY B. A. Fish and Amphibian Embryos - A Model System for Evaluating Teratogenicity. Toxicological Sciences Volume 3, Number 4 Pp. 237-242 (2004)
- CAMERON L. L., LAWRENCE W.C., LUM J.B. Medaka eggs as a model system for screening potential teratogens. Prevention of Physical and Mental Congenital Defects Part C p 239-243 (1985)
- FRAYSSE B., MONS R., GARRIC J. Development of a zebrafish 4-day embryo-larval bioassay to assess toxicity of chemicals. Ecotoxicology and Environmental Safety 63: 253-267 (2006)
- LANDIS JR., KOCH GG., Biometrics 33(1):159-74 (1977); Biometrics 33(2):363-74 (1977)
- NAGEL R. Darf : The Embryo Test with the Zebrafish Danio rerio - a General Model in Ecotoxicology and Toxicology. ATEX 19, suppl 1/2 p. 38-48 (2002)
- THOMAS H., SHEPARD M.D., Catalog of teratogenic agents (ninth edition), The Johns Hopkins University press (1998)
- VAN LEUWENC.J., GROOTE LAARE M.M., NIEBEEK G. Fish Embryos as Teratogenicity Screens : A comparison of Embryotoxicity between Fish and Birds. Ecotoxicology and Environmental Safety 20, p.42-52 (1990)

Annexe VII : Publication “Optimizing fluorescent protein choice for transgenic embryonic medaka models”



Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 32, No. 10, pp. 2396–2401, 2013
© 2013 SETAC
Printed in the USA

Short Communication

OPTIMIZING FLUORESCENT PROTEIN CHOICE FOR TRANSGENIC EMBRYONIC MEDAKA MODELS

NICOLAS LOIRE,[†] EMILIE BARBEAU,[‡] GREGORY F. LEMKINE,^{*†} MARC A. LÉONARD,[‡] and ANDREW J. TINDALL[‡]

[†]WatchFrog, Evry, France

[‡]L'Oréal Research and Innovation, Environmental Research Department, Aulnay-sous-Bois, France

(Submitted 6 March 2013; Accepted 1 July 2013)

Abstract: Early-life-stage transgenic medaka are recognized as a pertinent model by the Organisation for Economic Co-operation and Development and are noncompliant with the European definition of a laboratory animal. However, autofluorescence confounds readout of fluorescent biomarkers. The authors determined the fluorescence emission spectrum of different embryonic stages of medaka submitted to a range of excitation wavelengths. This allows selection of high signal-to-noise ratio fluorescent proteins and combining multiple biomarkers within a single embryo. *Environ Toxicol Chem* 2013;32:2396–2401. © 2013 SETAC

Keywords: Medaka Autofluorescence Embryo Fluorescent protein

INTRODUCTION

The small fish medaka (*Oryzias latipes*) is a well-recognized model for studying ecotoxicology [1–6] and fundamental biology [7–14]. The increasing use of transgenic medaka expressing fluorescent proteins for either tissue labeling or gene expression studies has led to a great interest in creating models expressing several fluorescent proteins in parallel. Multi-biomarker models can help to reduce the cost and length of studies, as well as the number of animals used. Another strategy to adhere to the 3-R's principle of reduction, replacement, and refinement of animal models has been to replace the adult and juvenile fish often used in the studies by prefeeding stages. Prior to feeding, fish embryos are not considered as laboratory animals in the European Union [15].

One problem that has hampered the creation of prefeeding medaka expressing multiple fluorescent proteins has been interference in the readout of fluorescent signal by endogenous proteins which produce an autofluorescence in the yellow range of the spectrum. The autofluorescence of these embryonic stages appears to be caused mainly by proteins from certain tissues (e.g., the vitellus) as well as pigmented cells (e.g., melanophores, xanthophores, leucophores, and iridophores) [16,17].

We studied the stable and well-known CarBio strain originating from an inbred “red-orange” strain of medaka derived from a southern Japanese population [18]. This common laboratory strain of medaka, as many others, is less pigmented than brown-colored wild medaka. This depigmentation is believed to be due to interbreeding and selection at least several hundred years ago [19]. Recent attempts to interbreed medaka to create depigmented strains have led to the generation of the STIII “see-through” medaka strain [11]. The see-through medaka strain effectively reduces interference with readout of fluorescent signal and improves the visualization of internal organs, but this strain suffers from a lack of robustness.

Previous studies have demonstrated the possibility of studying 2 different fluorescent markers in parallel without contaminating the readout of one signal with another [20–22]. The ability to identify 2 particular fluorescent proteins as being compatible for a dual readout is normally relatively simple because the proteins are well characterized and fluorescent spectra are generally published. However, since no fluorescent spectrum has been previously published for the medaka embryo itself, interference from endogenous proteins often complicates the readout for this species.

The aim of the present study was to determine the fluorescence spectra of a number of prefeeding stages of medaka. This will allow rational selection of fluorescent proteins and filter sets, which can be optimized in order to minimize the noise generated by endogenous proteins at the developmental stage of interest.

METHODS

Fluorescence measurement

For each test condition, 10 identical samples were individualized in a 384-well plate (Molecular Devices). Each well was subjected to excitation wavelengths from 350 nm to 670 nm with 5-nm increments using a SpectraMax M2 (Molecular Devices). All measurements were carried out with the sensitivity of the photomultiplier set to high, and an autocalibration cycle was carried out before each read.

To prevent excitation light from being read, a gap of 25 nm was set between the excitation wavelength being tested and the shortest emission wavelength measured. The emitted light of fluorescent proteins is of longer wavelengths (i.e., necessarily of a lower energy) than that of the excitatory light used to stimulate them. Accordingly, emission light of shorter wavelengths than that of the excitation light was ignored. Each well was measured 6 times, and the mean value of the measurements was recorded.

To allow the samples to be renewed regularly, and to reduce the effects of photobleaching caused by the excitation light, for each test condition 3 groups ($n = 10$) were exposed to a different range of excitation wavelengths (350–450 nm, 455–550 nm, or 555–670 nm) and the entire range of emission wavelengths

All Supplemental Data may be found in the online version of this article.
* Address correspondence to lemchine@watchfrog.fr.
Published online 7 July 2013 in Wiley Online Library
(wileyonlinelibrary.com).
DOI: 10.1002/etc.2324

(375–700 nm) for each excitation wavelength tested. Limits between each range of excitation wavelengths are represented by blue lines in the diagrams.

Medaka medium

Medaka medium contained 0.17 M NaCl, 1.36 mM CaCl₂ × 2H₂O, 1.62 mM MgSO₄ × 7H₂O, 4.02 mM KCl, and 62.5 μM methylene blue, with pH adjusted to 7.2 to 8.0. All salts used in this medium were purchased from Sigma-Aldrich; methylene blue was included in the medium to limit the growth of fungus and to more easily identify dead medaka eggs, which appear blue.

Medaka strains

Wild-type CarBio-strain medaka were used for all experiments unless otherwise stated. This line was purchased from Carolina Biological and raised at WatchFrog.

The choriogenin H-green fluorescent protein (ChgH-GFP) transgenic line used was produced by WatchFrog. Part of the transgenesis was carried out at Amagen. A plasmid containing 2047 bp upstream of the translation start site of the medaka choriogenin H promoter driving expression of enhanced green fluorescent protein (eGFP) was injected into medaka embryos of the CarBio strain at a concentration of 20 ng/μL as previously described [23]. The line originated from a single F₀ founder and displays a noninducible basal fluorescence in cardiac muscle fibers and in certain cells around the mouth and eyes, allowing transgenic fry to be selected prior to exposure to potential endocrine disrupting chemicals. At the developmental stages used, no fluorescence was visible in the liver in the absence of ethinyl estradiol.

Conditions tested

Four types of experimental conditions were assessed: 1) medaka medium (MM) with or without methylene blue (MM + blue or MM–blue, respectively; 50 μL); 2) single wild-type CarBio medaka embryos or fry in MM–blue (5 μL and 10 μL, respectively); 3) a standard solution of GFP (25 μL); and 4) homogenate of ChgH-GFP transgenic medaka exposed or not to ethinyl estradiol (25 μL).

Sample preparation

For measurements of whole-medaka embryos or fry, the embryos or fry were rinsed in MM–blue to prevent the influence of methylene blue on the results. Fry were not fed, which was possible because at the developmental stages tested, the fry still live on their vitellus reserves [2]. Posthatch fry were placed in wells dorsally to expose the ventral region. All developmental stages were suspended in 5 μL to 10 μL MM–blue to ensure their survival.

Prior to testing of homogenates, CarBio fry harboring the ChgH-GFP transgene were raised until posthatch day 1 or posthatch day 4. Half of the fry were exposed to 30 μg/L ethinyl estradiol (Sigma-Aldrich) in MM–blue containing 0.5% v/v dimethyl sulfoxide for 24 h. The 2 groups of fry (treated and untreated) were rinsed in MM–blue, homogenized, and centrifuged (16 000 g, 5 min) immediately prior to the reading. For each group 3 fry were homogenized in 250 μL of MM–blue or in 250 μL GFP buffer (GFP Quantification Kit, K815-100; BioVision). Wells were loaded with 25 μL of the resulting supernatant.

The fluorescence spectrum of a solution of GFP (GFP Quantification Kit, K815-100) was determined for comparison with the autofluorescence spectra. Each well was loaded with

25 μL of GFP standard containing 80 ng or 240 ng of green fluorescent protein.

Data analysis

Due to the large quantity of acquired data (1 graph per excitation wavelength, 64 graphs per sample type), software was developed by WatchFrog which allowed these data to be assembled into a single 3-dimensional graph, the 2 axes of which represent the following: *x*, emission wavelength; *y*, excitation wavelength; and *z*, fluorescence intensity (increasing scale from black to green).

Except for methylene blue, the fluorescence intensity shown in each figure for each sample type is the mean value of the 6 measurements per well of 10 wells containing samples subtracted by the equivalent value for 10 empty wells.

The methylene blue figure shows the equivalent value for 10 samples of MM + blue minus 10 samples of MM–blue.

RESULTS

Fluorescence spectra of media

Both MM + blue and MM–blue generate a fluorescence signal (see Supplemental Data, Figure S1), in particular, close to the excitation wavelength (diagonal side of graphs).

The increase in fluorescence generated by methylene blue is essentially localized in the red region (650–670 nm excitation and 635–700 nm emission; Figure 1A). The fluorescence signal observed with a GFP standard was restricted to the area around the published emission and excitation wavelengths of GFP (507 nm and 488 nm, respectively), indicating that the system was correctly set up and calibrated (Figure 1B) [24]. For the remaining tests MM–blue was used where required.

Autofluorescence of whole CarBio embryos

A beam of light from a xenon lamp was used to excite the samples, and the diameter of the beam produced by the Spectramax M2 was 2 mm to 3 mm. If each set of embryos or fry was placed in a comparable position for the 3 sections (ranges of excitation wavelengths) of the protocol, the fluorescence spectra should show continuity between the 3 different sections (shown by blue vertical lines; Figure 2). This continuity was observed for postfertilization day 2 and posthatch day 0 embryos and fry. However, the spectra obtained at posthatch day 2 and posthatch day 5 show a rupture in the spectra for the sections 555 nm to 700 nm and 455 nm to 555 nm, respectively. A very weak autofluorescence was observed at postfertilization day 6 across all 3 sections of the spectrum.

Fluorescence spectra of homogenized ChgH-GFP medaka fry

Supplemental Data Figure S2 shows that, following treatment with ethinyl estradiol for 24 h, a high level of GFP was observable in the liver of ChgH-GFP medaka fry. However, Figure 3- shows that subtracting the spectrum of untreated embryos very weakly expressing GFP in the heart from ethinyl estradiol-treated embryos highly expressing GFP in the liver did not give spectra close to that of green fluorescent protein.

At posthatch day 2, the only difference detected between fluorescent and nonfluorescent embryos is within the blue region in the upper part of the figure. At posthatch day 5, a halo of fluorescence is observed in the blue region of the figure as well as a weak region of fluorescence within the red region. Essentially identical profiles were obtained when the buffer used was MM–blue (data not shown).

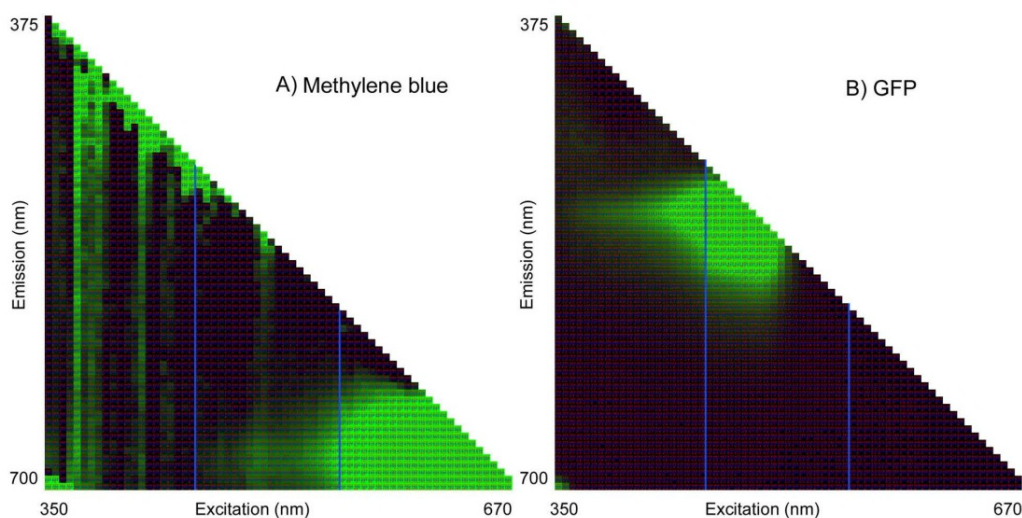


Figure 1. Validation of methylene blue and green fluorescent protein (GFP). (A) Fluorescence spectrum of methylene blue determined by subtracting the spectrum of medaka medium lacking methylene blue from that of medaka medium with methylene blue. (B) Fluorescence spectrum of 80ng of GFP standard. [Color figure can be seen in the online version of this article, available at wileyonlinelibrary.com]

The fluorescence spectra of homogenized posthatch day 2 and posthatch day 5 fry (Figure 3) do not resemble that of a GFP standard (Figure 1B). The spectrum of the GFP standard shows a single fluorescent region, which is centered close to the theoretical peak excitation and emission wavelengths of GFP (excitation 488 nm, emission 507 nm).

CONCLUSIONS

Influence of media

The tested media have a high degree of fluorescence, with a lower level for MM-blue.

The fluorescence of these media does not appear to create bias when fluorescence is captured by imagery, probably because almost all medium is removed prior to capturing the image. No fluorescence from the surrounding medium is observable when imaging medaka fry with a variety of fluorescence filters (Figure 4).

Influence of homogenization

The results of the tests with homogenized embryos show no influence of the medium used for homogenization. In both cases, no GFP signal was observed. This could be the result of insufficient tissue being used, because at this development stage the fry are only approximately 3 mm long. Another factor could be the confounding of the signal by nonfluorescent tissue. Once the fry were homogenized the homogenate had a gray-black color and must have contained a variety of pigments and proteins. The dispersal of the GFP within the homogenate would have reduced its concentration when compared with the high levels present in the liver of entire ChgH-GFP medaka (Supplemental Data, Figure S2). It is also possible that endogenous proteins, which are not normally in contact with GFP in nonhomogenized fry, weakened the GFP signal.

Influence of developmental stage

A relatively low level of autofluorescence at postfertilization day 6 was observed. Analysis of the raw data showed a highly

similar value for all 10 medaka embryos measured for each combination of excitation and emission wavelengths. These results could be explained by the fact that, at this stage, the embryo has used up much of its vitellus and has not yet started producing high levels of natural pigments [2]. The homogeneity of the spectrum indicates that it is possible to precisely position medaka embryos at this developmental stage. When quantification of the fluorescence signal is possible at postfertilization day 6, this is therefore the recommended developmental stage.

After hatch, typical autofluorescence spectra were observed in the blue to far red region, with higher emission intensity close to the excitation wavelength (Figure 2). The fluorescence spectra of the 3 developmental stages tested exhibit similar profiles; however, at posthatch day 0 a lower level of autofluorescence was observed in the blue region.

Rational selection of fluorescent proteins to optimize signal-to-noise ratio

The majority of characterized fluorescent proteins emit light within the blue to far red region (Figure 5), with an emission wavelength close to the excitation wavelength as observed for nonhomogenized medaka embryos and fry.

Figure 5 shows a range of fluorescent proteins superimposed onto the autofluorescence spectrum of a posthatch day 0 fry. This spectrum was chosen since the majority of readouts of experiments are carried out after hatching and of the posthatch stages only posthatch day 0 did not exhibit a rupture in the profile between the different sections measured. The fluorescent proteins were chosen because they are commercially available and they are monomeric or weakly dimeric *in vivo*—multimerization of fluorescent proteins causes toxicity in medaka embryos (F. Sohm, Amagen, GIF-Sur-Yvette, France, personal communication; and observations of embryos expressing the tetrameric eq611 fluorescent protein, data not shown). Supplementary Data Table S1 lists alternative fluorescent proteins with excitation and emission peaks identical or similar to those in Figure 5.

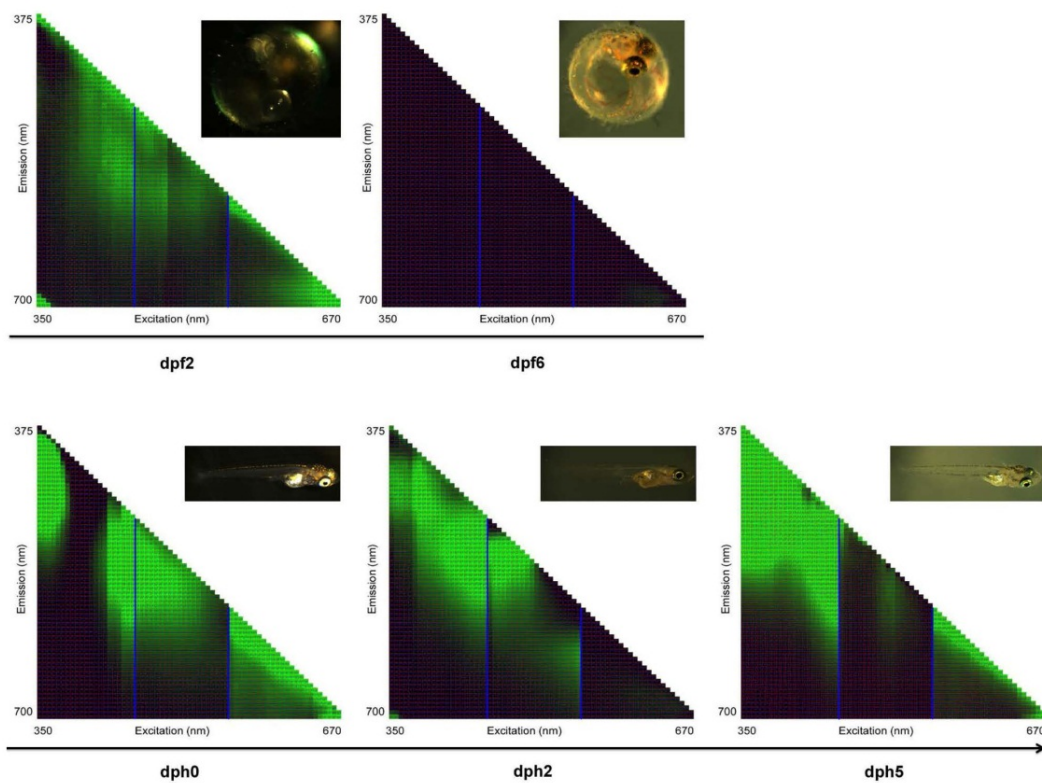


Figure 2. Auto-fluorescence spectra of whole wild-type CarBio medaka. The autofluorescence spectra were recorded at 5 different pre-feeding stages of development. dpf = days postfertilization; dph = days posthatch. [Color figure can be seen in the online version of this article, available at wileyonlinelibrary.com]

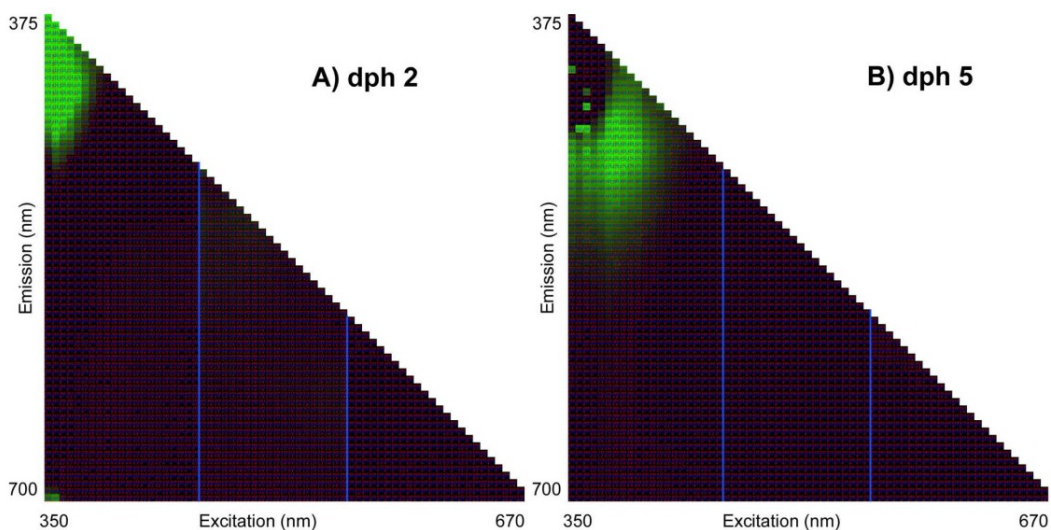


Figure 3. Detection of green fluorescence protein (GFP) from homogenized medaka fry. Fluorescence spectra of GFP positive medaka fry homogenized in GFP buffer at days posthatch 2 (dph2) and 5 (dph5) after subtracting the same profile for medaka exhibiting a very low basal level of GFP. [Color figure can be seen in the online version of this article, available at wileyonlinelibrary.com]

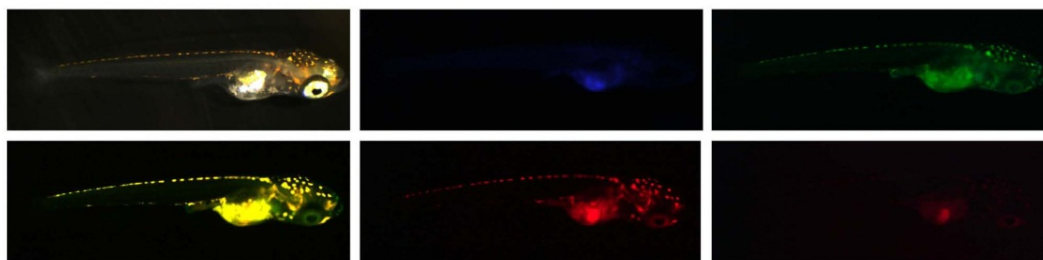


Figure 4. Auto-fluorescence of 1 d posthatch wild-type medaka fry determined by imagery. The filters used were: (first line, left to right) visible light, blue fluorescent protein (BFP) band pass (ex390/22, em460/50), and green fluorescent protein (GFP) band pass (ex470/40, em522/35); and (second line, left to right) GFP long pass (ex470/40, em515LP), red fluorescent protein band pass (ex560/40, em630/60), and red fluorescent protein long pass (ex570/100, em650LP). [Color figure can be seen in the online version of this article, available at wileyonlinelibrary.com]

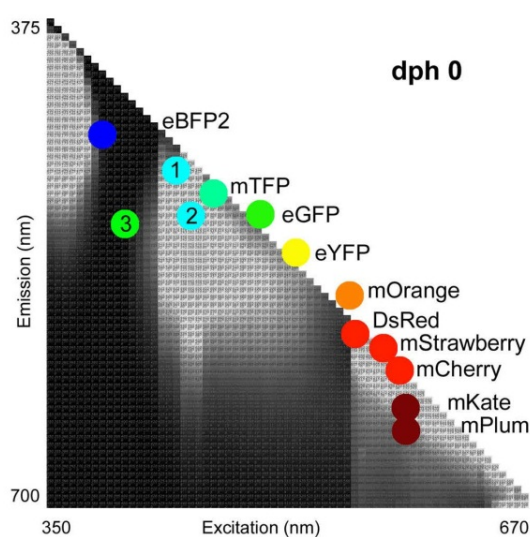


Figure 5. The auto-fluorescence spectrum of non-homogenised day 0 posthatch (dph0) wild-type medaka. The region containing the excitation and emission peaks of a panel of representative fluorescent proteins is superimposed onto the figure. The numbers 1 and 2 indicate the 2 peaks of enhanced cyan fluorescent protein (eCFP), and 3 indicates T-Sapphire. eBFP2 = enhanced blue fluorescent protein 2; mTFP = monomeric teal fluorescent protein; eGFP = enhanced green fluorescent protein; eYFP = enhanced yellow fluorescent protein; mOrange = monomeric orange fluorescent protein; mStrawberry = monomeric strawberry fluorescent protein; mCherry = monomeric cherry fluorescent protein; mKate = monomeric Katushka fluorescent protein; mPlum = monomeric plum fluorescent protein; T-Sapphire = turbo sapphire fluorescent protein. [Color figure can be seen in the online version of this article, available at wileyonlinelibrary.com]

Figure 5 shows that the excitation and emission wavelengths of enhanced blue fluorescent protein 2 (eBFP2) and T-Sapphire are within regions of low autofluorescence. These 2 proteins could therefore be read in medaka fry with little interference from noise caused by autofluorescence of the fry. However, in fry expressing multiple fluorescent proteins, eBFP2 and T-Sapphire should be read after other fluorescent proteins to reduce the effects of photobleaching since both are excited in the ultraviolet range.

The present study provides data allowing the first step to be taken in rationally selecting combinations of fluorescent proteins to be used in transgenic medaka models expressing multiple

fluorescent reporter genes to increase the signal-to-noise ratio. It also allows filter sets to be designed for reading these proteins, which are optimized for use in prefeeding medaka models. An additional validation step of these combinations of filters and fluorescent proteins is required to confirm their utility.

SUPPLEMENTAL DATA

Table S1. (16 KB DOCX).

Figures S1 and S2. (1.9 MB PDF).

Acknowledgment—The authors thank N. Guedon and M. Leleu for their excellent work maintaining the medaka colony that provided eggs for the present study. Additional thanks go to L. Laureote for programming the macro for the production of the figures.

REFERENCES

1. Organisation for Economic Co-Operation and Development. 1992. Test No. 210: Fish, early-life stage toxicity test. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals—Section 2: Effects on Biotic Systems*. Paris, France.
2. Organisation for Economic Co-Operation and Development. 1998. Test No. 212: Fish, short-term toxicity test on embryo and sac-fry stages. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals—Section 2: Effects on Biotic Systems*. Paris, France.
3. Organisation for Economic Co-Operation and Development. 2009. Test No. 230: 21-Day fish assay, a short-term screening for oestrogenic and androgenic activity, and aromatase inhibition. *OECD Guidelines for the Testing of Chemical—Section 2: Effects on Biotic Systems*. Paris, France.
4. Norrgren L. 2012. Fish models for ecotoxicology. *Acta Vet Scand* 54: S14.
5. Velma V, Vutukuru SS, Tchounwou PB. 2009. Ecotoxicology of hexavalent chromium in freshwater fish: A critical review. *Rev Environ Health* 24:129–145.
6. Ankley GT, Daston GP, Degitz SJ, Denslow ND, Hoke RA, Kennedy SW, Miracle AL, Perkins EJ, Snape J, Tillitt DE, Tyler CR, Versteeg D. 2006. Toxicogenomics in regulatory ecotoxicology. *Environ Sci Technol* 40:4055–4065.
7. Shibata Y, Paul-Prasanth B, Suzuki A, Usami T, Nakamoto M, Matsuda M, Nagahama Y. 2010. Expression of gonadal soma derived factor (GSDF) is spatially and temporally correlated with early testicular differentiation in medaka. *Gene Expr Patterns* 10:283–289.
8. Kuroyanagi Y, Okuyama T, Suehiro Y, Imada H, Shimada A, Naruse K, Takeda H, Kubo T, Takeuchi H. 2010. Proliferation zones in adult medaka (*Oryzias latipes*) brain. *Brain Res* 1323:33–40.
9. Matsuda M, Shinomiya A, Kinoshita M, Suzuki A, Kobayashi T, Paul-Prasanth B, Lau E, Hamaguchi S, Sakaizumi M, Nagahama Y. 2007. DMY gene induces male development in genetically female (XX) medaka fish. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:3865–3870.
10. Fukamachi S, Kinoshita M, Aizawa K, Oda S, Meyer A, Mitani H. 2009. Dual control by a single gene of secondary sexual characters and mating preferences in medaka. *BMC Biol* 7:64.
11. Wakamatsu Y, Pristysznyuk S, Kinoshita M, Tanaka M, Ozato K. 2001. The see-through medaka: A fish model that is transparent throughout life. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:10046–10050.

12. Chakraborty T, Katsu Y, Zhou LY, Miyagawa S, Nagahama Y, Iguchi T. 2011. Estrogen receptors in medaka (*Oryzias latipes*) and estrogenic environmental contaminants: An in vitro–in vivo correlation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 123:115–121.
13. Wittbrodt J, Shima A, Scharl M. 2002. Medaka—A model organism from the Far East. *Nat Rev Genet* 3:53–64.
14. Shima A, Mitani H. 2004. Medaka as a research organism: Past, present and future. *Mech Dev* 121:599–604.
15. European Parliament and Council of the European Union. 2010. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the Protection of Animals Used for Scientific Purposes. *Off J Eur Union* L276:33–79.
16. Braasch I, Brunet F, Volff J-N, Scharl M. 2009. Pigmentation pathway evolution after whole-genome duplication in fish. *Genome Biol Evol* 1:479–493.
17. Wakamatsu Y, Ju B, Pristayzhnyuk I, Niwa K, Ladygina T, Kinoshita M, Araki K, Ozato K. 2001. Fertile and diploid nuclear transplants derived from embryonic cells of a small laboratory fish, medaka (*Oryzias latipes*). *Proc Natl Acad Sci USA* 98:1071–1076.
18. Laisney JA, Braasch I, Walter RB, Meierjohann S, Scharl M. 2010. Lineage-specific co-evolution of the Egf receptor/ligand signaling system. *BMC Evol Biol* 10:27.
19. Kinoshita M, Murata K, Naruse K, Tanaka M. 2009. *Medaka: Biology, Management, and Experimental Protocols*. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, USA.
20. Webster NL, Forni M, Bacci ML, Giovannoni R, Razzini R, Fantinati P, Zannoni A, Fusetti L, Dalprà L, Bianco MR, Papa M, Seren E, Sandrin MS, McKenzie JFC, Lavitrano M. 2005. Multi-transgenic pigs expressing three fluorescent proteins produced with high efficiency by sperm mediated gene transfer. *Mol Reprod Dev* 72:68–76.
21. Yang T-T, Sinai P, Green G, Kitts PA, Chen Y-T, Lybarger L, Chervenak R, Patterson GH, Piston DW, Kain SR. 1998. Improved fluorescence and dual color detection with enhanced blue and green variants of the green fluorescent protein. *J Biol Chem* 273:8212–8216.
22. Ai H, Olenych SG, Wong P, Davidson MW, Campbell RE. 2008. Hue-shifted monomeric variants of Clavularia cyan fluorescent protein: Identification of the molecular determinants of color and applications in fluorescence imaging. *BMC Biol* 6:13.
23. Kinoshita M, Toyohara H, Sakaguchi M, Inoue K, Yamashita S, Satake M, Wakamatsu Y, Ozato K. 1996. A stable line of transgenic medaka (*Oryzias latipes*) carrying the CAT gene. *Aquaculture* 143:267–276.
24. Zhang G, Gurtu V, Kain SR. 1996. An enhanced green fluorescent protein allows sensitive detection of gene transfer in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 227:707–711.

OPTIMIZING FLUORESCENT PROTEIN CHOICE FOR TRANSGENIC EMBRYONIC MEDAKA

Andrew Tindall¹ • Nicolas Loire¹ • Gregory Lemkine¹ • Emilie Barbeau² • Marc Léonard²
¹WatchFrog S.A., 4 rue Pierre Fontaine, 91000 Evry, France. ²L'Oréal Research & Innovation - Ecotoxicology - 1 avenue Eugène Schueller, BP222, 93601 Aulnay sous bois, France.
 Email contact: lemkin@watchfrog.fr

ABSTRACT

Transgenic medaka (*Oryzias latipes*) have proved to be pertinent models for a variety of ecotoxicological and research applications. However, a number of technical issues need to be solved such as limiting the GFP expression to the target tissue, the GFP choice, and the GFP excitation problem for the quantification of biomarkers *in vivo*. To overcome this problem, we have determined the spectrum of emission wavelengths of different developmental stages of medaka submitted to a broad range of excitation wavelengths.

INTRODUCTION

Autofluorescence of wild-type strains of medaka embryos can be problematic for the measurement of fluorescent biomarkers. The observed autofluorescence is caused by endogenous proteins in certain tissues (for example the wall of the gut) as well as by natural aggregation proteins (melanophores, xanthophores, leucophores and iridophores). To overcome this problem, one approach is to select fluorescent proteins and filter sets to limit the impact of the autofluorescence.

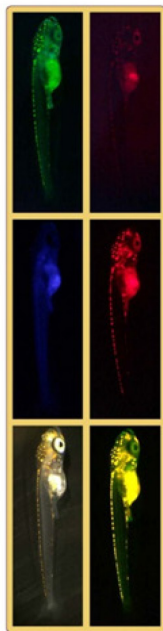


Figure 1: Autofluorescence with standard filters (DPF2) left to right (top row) and (DPF2, DPF6, DPF0, DPF4, DPH2, DPH0) (bottom row) of 48hpf medaka embryos (GFP tag) from (left to right) 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700 nm excitation (excitation wavelength, 375 nm) (DPF2, DPF6, DPF0, DPF4, DPH2, DPH0).

MATERIALS AND METHODS

For each developmental stage tested, ten medaka embryos were individualized in a 384 well plate. Each well was subjected to excitation wavelengths from 350-670nm with 5nm increments. The emission spectra were recorded with a 20nm bandpass emission wavelength, emitted light was quantified from 20nm above the excitation wavelength to 700nm in 5nm increments. All measures were repeated 6 times.

In the cases where medium were tested ten 50µl samples were used. To avoid potential photobleaching and quenching effects, the samples were diluted into the medium which were subjected to either 350nm to 450nm, 455nm to 550nm or 555nm to 670 nm excitation light. These 3 groups are depicted on the graph by vertical blue lines.

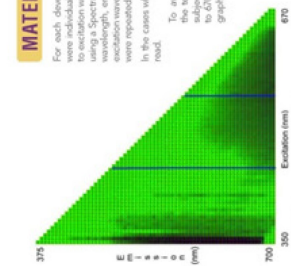


Figure 2: Fluorescence spectrum of medaka embryo

RESULTS

High levels of fluorescence were observed in the sample of medaka embryos. The observed fluorescence was quantified for the GFP standard compared with the known excitation and emission maxima of eYFP (488nm/527nm) (Figure 3). The results show a fairly homogeneous level of autofluorescence across the spectrum prior to having any transgenic embryos. Multiple regions of autofluorescence were observed in specific regions of the spectrum from blue to red (375-700nm) emission with excitation wavelengths close to the emission wavelength (Figure 4). Figure 5 shows that standard GFP band pass filters capture a significant amount of autofluorescence emitted from medaka embryos at DPH0.

DISCUSSION

The fluorescence observed in the medaka medium sample indicates that medaka should be placed in minimal volumes of this buffer or an alternative medium. This fluorescence is not a problem for the quantification of GFP signal. However, depending on the spatial temporal expression profile of the signal it is not always possible to carry out a read before hatching. After hatching, the level of autofluorescence in the red region of the spectrum is not always high. The level of autofluorescence appears to rise from DPH0 to DPH5. Fluorescence readout at early post-hatching stages is therefore advantageous (Figure 4).

CONCLUSIONS AND PERSPECTIVES

This information will allow selection of optimal reporter genetic constructs and filter sets for the measurement of GFP signal. Furthermore, this will pave the way to combining multiple biomarkers with different fluorescent proteins to detect various signals within the same organism.

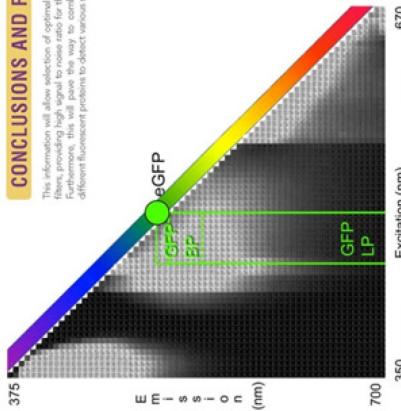


Figure 3: Fluorescence spectrum of a GFP standard

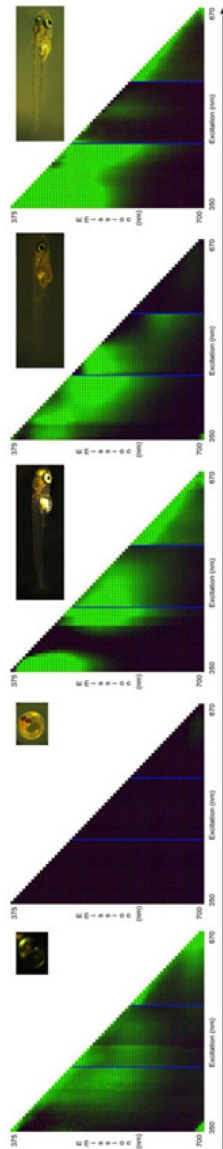


Figure 4: Autofluorescence spectra of medaka embryos from DPF2 to DPH5

Table des illustrations

Figures

Figure 1 :	Thalidomide vendu sous le nom de Distaval avec mention de ses bienfaits	23
Figure 2 :	Enfants exposés à la Thalidomide souffrant de phocomélie.....	24
Figure 3 :	Exemple de nouveau-nés atteints de Syndrome de la Thalidomide.....	26
Figure 4 :	Formules développées de la Thalidomide.....	27
Figure 5 :	Comparaison de la pharmacocinétique de la Thalidomide chez la souris, le lapin et chez des patients atteints de myélome multiple	28
Figure 6 :	Mécanismes d'action possibles de la Thalidomide.....	29
Figure 7 :	Formule développée du DES, le Distilbène et la campagne publicitaire du desPLEX pour prévenir notamment des fausses-couches.....	32
Figure 8 :	Exemples de mécanismes épigénétiques.....	38
Figure 9 :	Cycle biogéochimique conceptuel du mercure	41
Figure 10 :	Concentrations environnementales du mercure	43
Figure 11 :	DDT, formule développée et différentes formes de commercialisation	44
Figure 12 :	Formules des différentes formes du DDT et de ses métabolites.....	45
Figure 13 :	Cycle de reproduction des Mammifères intégrant les segments ICH.....	50
Figure 14 :	Relations entre la toxicité de la reproduction (reprotoxicité), la fertilité, la toxicité du développement, l'embryotoxicité et la tératogénicité.....	51
Figure 15 :	Mitose classique.....	52
Figure 16 :	De la maturation ovarienne à l'implantation chez l'Homme.....	53
Figure 17 :	Mise en place des feuilletts embryonnaires lors de la gastrulation.....	53
Figure 18 :	Migration des différents feuilletts embryonnaires pendant la neurulation.....	54
Figure 19 :	Développement embryo-fœtale en semaines et mise en place des différents organes	55
Figure 20 :	Relation entre le taux de mortalité infantile et le pourcentage d'enfants morts à cause d'une malformation congénitale par pays	58
Figure 21 :	Évolution des données historiques des malformations congénitales observées chez des rongeurs d'un laboratoire	59

Figure 22 :	Fréquence des malformations congénitales majeures en relation avec le nombre de malformations congénitales mineures chez l'Homme	59
Figure 23 :	Nombre de malformations congénitales de 5 registres français (Paris, Strasbourg, Ile de la Réunion, les Antilles et Auvergne) de 1980 à 2012.....	61
Figure 24 :	Incidence de malformations congénitales uniques relative au genre.....	61
Figure 25 :	Évolution du nombre et de la prévalence de malformations congénitales de 5 registres français de 1993 à 2012.....	62
Figure 26 :	Fenêtre de sensibilité d'exposition à la Thalidomide.....	64
Figure 27 :	Chromosomes d'une cellule somatique diploïde	68
Figure 28 :	Différents types d'héritages génétiques suivant la loi de Mendel	69
Figure 29 :	Exemples de mécanismes d'altération du nombre de chromosomes au cours de la méiose	70
Figure 30 :	Exemples de mécanismes altération la structure des chromosomes.....	72
Figure 31 :	Incidence et types d'anomalies chromosomiques.....	72
Figure 32 :	Établissement, maintenance et effacement des empreintes parentales	74
Figure 33 :	Exemples de sources et de voies d'exposition aux biocides.....	80
Figure 34 :	Exemple chez les embryons de mammifères de voies de signalisation en fonction des stades de développement avant l'implantation.....	83
Figure 35 :	Calendrier du règlement REACH	89
Figure 36 :	Répartition des usages des animaux de laboratoire	111
Figure 37 :	Différents paramètres de mesure d'effets et formules pour la catégorisation des substances testées dans le test WEC	114
Figure 38 :	Description du test EST et de la catégorisation des substances testées	115
Figure 39 :	Stratégie proposée par ChemScreen pour l'évaluation de la reprotoxicité en utilisant des méthodes alternatives à l'expérimentation animale.....	119
Figure 40 :	Exemple des stades de développement considérés par la directive européenne 2010/63/UE avec le poisson médaka <i>Oryzias latipes</i>	135
Figure 41 :	Arbre phylogénétique montrant les principaux modèles communément utilisés en recherche biomédicale et leur relation évolutionnaire	136
Figure 42 :	Répartition des gènes codants entre le poisson zèbre, le poulet, la souris et l'Homme	138
Figure 43 :	Méthode de dégangage des œufs de xénope à l'aide d'une solution de L-Cystéine à 2%.....	141

Figure 44 :	Principe de la mesure du carbone organique total pour réaction avec du persulfate.....	148
Figure 45 :	Exemple de feuilles de suivi d'un test de tératogénicité utilisant les embryons de médaka	151
Figure 46 :	Exemples de malformations observables chez les embryons de médaka	152
Figure 47 :	Exemples de malformations observables chez les embryons de xénope	153
Figure 48 :	Exemples de relation dose / effet pour la létalité et la tératogénicité	154
Figure 49 :	Comparaison de l'ensemble des résultats de la colchicine obtenus chez les tests utilisant les embryons de poisson zèbre, de médaka et de xénope	168
Figure 50 :	Comparaison des IT des trois tests sur 15 substances de référence	172
Figure 51 :	Comparaison des valeurs de CL50 et de CE50 des trois tests sur 15 substances de référence	173
Figure 52 :	Comparaison des IT de 20 substances de référence testées chez le médaka et le xénope	176
Figure 53 :	Comparaison des valeurs de CL50 et de CE50 de 20 substances de référence obtenues dans les tests utilisant les embryons de médaka et de xénope	178
Figure 54 :	Indices tératogènes des 43 références obtenus dans le test utilisant les embryons de médaka	183
Figure 55 :	Représentation graphique des valeurs de CL50 et de CE50 générées sur les 43 références dans le test utilisant les embryons de médaka	184
Figure 56 :	Influence de la température d'incubation d'embryons de poisson zèbre sur leur viabilité (A), leur taux d'éclosion (B) et le taux de malformations spontanées (C)	200
Figure 57 :	Influence de la densité de culture des embryons de médaka, placés dans des plaques de culture de 48 puits, sur le taux d'éclosion.....	201
Figure 58 :	Pourcentages moyens (N=3 tests) des alevins de poisson zèbre avec des déformations squelettiques en fonction de leur conditionnement en plaques de culture de 24, 48 et 96 puits, à 55, 72 et 144 heures post fécondation.	202
Figure 59 :	Mise en évidence de différents degrés de sévérité de malformations squelettiques chez des alevins de poisson zèbre mis en évidence par coloration.....	205
Figure 60 :	Exemples d'analyse des fonctions cardiaques chez les embryons de poisson zèbre	207
Figure 61 :	Exemples d'analyse du comportement chez des alevins de médaka par mesure de vitesse (A), de distance parcourue (B) et de temps passé dans une zone (C) ...	209

Figure 62 :	Diversité des paramètres des différents tests d'analyse du comportement utilisant le poisson zèbre a) durée de la mesure b) lignée utilisée c) milieu de culture d) stade de développement	210
Figure 63 :	Évolution du comportement des alevins de poisson zèbre en fonction du nombre d'heures post fertilisation.....	211
Figure 64 :	Corrélation entre les différents critères d'effets tératogènes chez le poisson zèbre	211
Figure 65 :	Répartition des valeurs de l'IT des substances de référence du test utilisant les embryons de médaka supérieures à 0 en fonction de leur valeur de CL50.....	218
Figure 66 :	Comparaison des cytochromes présents chez le poisson zèbre et chez l'Homme (A) et leur expression chez les embryons de poisson zèbre.....	223
Figure 67 :	Exemple de système automatisé de positionnement d'alevin de poisson zèbre (Système VAST).....	227
Figure 68 :	Détection de la fréquence cardiaque chez un alevin de médaka présentant un œdème péricardique (a) et chez un autre présentant plusieurs malformations dont une de la tête et de la queue (b).....	228
Figure 69 :	Exemple d'analyse d'images d'embryons de poisson zèbre exposés à la caféine ainsi que la mise en évidence de la diminution de la taille des alevins en fonction de la concentration d'exposition en caféine	229
Figure 70 :	Principe de l'Adverse Outcome Pathway	231
Figure 71 :	Exemples d'un réseau AOP de reprotoxicité disponibles sur le poisson sur le site AOP Wiki.....	232
Figure 72 :	Spectre de l'autofluorescence d'alevins de médaka le jour de leur éclosion et positionnement des différents marqueurs fluorescents.....	234
Figure 73 :	Principe de l'élaboration d'une stratégie de criblage d'exclusion des substances tératogènes sans recours aux animaux définis par la directive 2010/63/UE.....	236
Figure 74 :	Schéma du système cellulaire multi-couche mimant la barrière placentaire humaine.....	237

Tableaux

Tableau 1 :	Malformations liées à l'exposition à la Thalidomide	25
Tableau 2 :	Traitements par DES en Europe et aux États-Unis.....	33
Tableau 3 :	Anomalies 2 ^e génération, « filles DES ».....	35
Tableau 4 :	Anomalies 2 ^e génération, « fils DES ».....	36
Tableau 5 :	Anomalies 3 ^e génération, enfants des « filles DES ».....	37
Tableau 6 :	Classification internationale des malformations congénitales et des anomalies chromosomiques (ICD-10).....	60
Tableau 7 :	Impact de la période d'exposition de quelques tératogènes humains sur l'apparition de malformations.....	65
Tableau 8 :	Exemples d'altérations génétiques et épigénétiques impliquées dans des pathologies humaines.....	75
Tableau 9 :	Exemples d'hérédité transgénérationnelle épigénétique	75
Tableau 10 :	Maladies infectieuses entraînant chez le fœtus des malformations.....	77
Tableau 11 :	Exemples de médicaments tératogènes chez l'Homme avec leurs effets.....	78
Tableau 12 :	Exemples de biocides avec leur mode d'action.....	81
Tableau 13 :	Exemples de toxicité du développement médiée par des récepteurs.....	84
Tableau 14 :	Exigences de REACH en matière d'informations standards.....	90
Tableau 15 :	Résumé des informations requises pour la reprotoxicité selon le règlement REACH (Annexes VII à X).....	92
Tableau 16 :	Classification et étiquetage des substances ou mélanges classés R selon le règlement CLP.....	95
Tableau 17 :	Classification et étiquetage des substances ou mélanges dangereux pour le milieu aquatique selon le règlement CLP.....	96
Tableau 18 :	Critères de catégorisation en toxicité aquatique chronique en l'absence de données spécifiques	97
Tableau 19 :	Catégories de risque fœtal de l'US Food and Drug Administration.....	103
Tableau 20 :	Catégories de risque fœtal de la Therapeutic Goods Administration.....	104
Tableau 21 :	Liste non exhaustive de bases de données et outils <i>in silico</i> spécifiques à la reprotoxicité.....	105

Tableau 22 :	Résumé des lignes directrices OCDE requises par le règlement REACH pour l'évaluation de la reprotoxicité pour la santé humaine en fonction du tonnage de la mise sur le marché d'une substance chimique.....	108
Tableau 23 :	Méthodes alternatives à l'expérimentation animale pour l'évaluation de la reprotoxicité.....	112
Tableau 24 :	Comparaison des trois tests validés par l'EURL-ECVAM pour l'évaluation de la tératogénicité.....	117
Tableau 25 :	Implication de 5 substances de référence de la première catégorie dans des listes de validation de test d'évaluation de la tératogénicité.....	129
Tableau 26 :	Implication de 4 substances de référence de la seconde catégorie dans des listes de validation de test d'évaluation de la tératogénicité.....	131
Tableau 27 :	Données de tératogénicité réglementaires, bibliographiques et issues de bases de données recueillies sur les substances de référence choisies.....	132
Tableau 28 :	Organismes alternatifs proposés pour l'évaluation de la tératogénicité.....	134
Tableau 29 :	Comparaison générale du poisson zèbre, du médaka et du xénope.....	137
Tableau 30 :	Comparaison du développement embryonnaire du poisson zèbre, du médaka et du xénope.....	139
Tableau 31 :	Résultats de l'analyse du COT liquide des substances de référence dans les milieux d'essai pour les tests utilisant les embryons de médaka (milieu médaka) et de xénope (milieu FETAX).....	149
Tableau 32 :	Adaptations du protocole à chaque organisme.....	150
Tableau 33 :	Tableau de concordance entre les résultats attendus et ceux observés.....	156
Tableau 34 :	Résultats du test utilisant les embryons de poisson zèbre.....	158
Tableau 35 :	Évaluation de la concordance du test utilisant les embryons de poisson zèbre selon différentes conditions d'analyse de performance.....	159
Tableau 36 :	Résultats du test utilisant les embryons de médaka.....	161
Tableau 37 :	Évaluation de la concordance du test utilisant les embryons de médaka selon différentes conditions d'analyse.....	162
Tableau 38 :	Tableau de résultats du test réalisé sur les embryons de xénope.....	164
Tableau 39 :	Évaluation de la concordance du test utilisant les embryons de xénope selon différentes conditions d'analyse de performance.....	165
Tableau 40 :	Comparaison des concordances de chaque test sur des listes différentes de substances de référence.....	166
Tableau 41 :	Ensemble des résultats générés sur les essais sur les trois tests.....	169

Tableau 42 :	Résultats valides des trois tests sur 15 références communes	170
Tableau 43 :	Évaluation de la concordance des tests selon les conditions d'analyse de performance	171
Tableau 44 :	Résultats valides et confirmés des tests utilisant les embryons de médaka et de xénope.....	175
Tableau 45 :	Comparaison des performances des tests utilisant les embryons de médaka et de xénope sur une même liste de références selon la méthode Kappa	176
Tableau 46 :	Proportion des substances de référence positives et négatives en fonction de la liste initiale et de la liste élargie ainsi que des conditions d'analyse de performance des tests.....	181
Tableau 47 :	Résultats du test utilisant les embryons de médaka sur les substances de référence négatives	182
Tableau 48 :	Concordance entre les données de tératogénicité humaines et celles sur animaux de laboratoire	190
Tableau 49 :	Différents types de comportements observables chez les alevins de poisson zèbre.....	208
Tableau 50 :	Comparaison de la durée, du nombre d'animaux utilisés et du coût des différents tests requis par le règlement REACH pour l'évaluation de la reprotoxicité.....	220

Liste des acronymes

AC : anomalie du comportement

ACC : Adénocarcinomes à Cellules Claires

ACE inhibiteur : Inhibiteurs de l'enzyme de conversion et antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AFSSAPS : Agence Française de Sécurité SANitaire des Produits de Santé

AOP : Adverse Outcome Pathway

ARN : Acide RiboNucléique

ASTM : American Society of the International Association for Testing and Materials

BCF : BioConcentration Factor

BMD : BenchMark Dose

BPA : Bisphénol A

bpm : battements par minute

CE10 : concentration pour laquelle 10% d'effet ont été observés

CHEST : CHicken Embryotoxicity Screening Test

Chg : choriogénine

CE10 : concentration à laquelle 10 % des individus vivants présentent une malformation

CE50 : concentration à laquelle 50 % des individus vivants présentent une malformation

CL25 : concentration à laquelle 25 % des individus meurent

CL50 : concentration à laquelle 50 % des individus meurent

CLP : Classification Labelling and Packaging

Ca : concordance attendue

Co : concordance observée

CO2 : dioxyde de carbone

COT : Carbone Organique Total

CMEO : Concentration Minimale avec Effets Observés

CSEO : Concentration (maximale) Sans Effet Observé

D : anomalie de la pigmentation

DA : Déformation Axiale

DDD : dichlorodiphényl-dichloroéthane

DDE : dichlorodiphényl-dichloroéthylène

DDT : 1,1,1-trichloro-2,2-bis(p-chlorophényl)éthane
DES : Diéthylstilbestrol
DNEL_{développement} : dose sans effet pour la toxicité pour le développement
DNEL_{fertilité} : dose sans effet pour la fertilité
eBFP2 : enhanced Blue Fluorescent Protein 2
ECHA : Agence européenne des produits chimiques
EINECS : European INventory of Existing Commercial chemical Substances
ELINCS : European LIst of Notified Chemical Substances
EPAA : European Partnership for Alternative Approaches to Animal Testing
ES : Embryonic Stem cell
EST : Embryonic Stem cell Test
EURL-ECVAM : European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing
EUROCAT : Surveillance Européenne des Malformations Congénitales
FDS : Fiches de Données de Sécurité
FEDTEX : Fertility and developmental toxicity database
FETAX : Frog Embryo Teratogenesis Assay *Xenopus*
FN : substance identifiée comme Faux Négatif
FP : substance identifiée comme Faux Positif
GFP : green fluorescent protein
HAP : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
hpf : heure post fécondation
IC50 : concentration induisant 50 % d'inhibition de la croissance cellulaire
ICBDSR : Organisation internationale de Surveillance et de Recherche concernant les Anomalies congénitales
ICCVAM : Interagency Coordinating Committee for the Validation of Alternative Methods
ICD-10 : International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 10th Revision
ICH : International Conference on Harmonisation
ID50 : dose induisant 50 % d'inhibition de la différenciation cellulaire
INERIS : Institut National de l'Environnement industriel et des RISques
IP50 : dose induisant 50 % d'inhibition de la prolifération cellulaire
IT : Indice Tératogène
J : Jour de développement post fécondation (J0 étant le jour de la fécondation)
LAGDA : Essai de croissance et de développement de larves d'amphibiens

LOAEL : dose minimale d'effet reprotoxique observable
LogKow : coefficient de partage octanol / eau
MeHg : Méthylmercure
MEOGRT : Étude étendue de toxicité pour la reproduction sur une génération chez médaka
MM : Malformations Multiples
MM test : MicroMass test
MT : modification de la taille
NA : Non Applicable
NOAEC : concentration sans effet reprotoxique observable
NOAEL : dose sans effet reprotoxique observable
NOEC : concentration sans effet observé
NTP : National Toxicology Program
O : œdèmes
OCDE : Organisation de Coopération et de Développement Économique
ONG : Organisation Non Gouvernementale
OMS : 'Organisation Mondiale de la Santé
PBT : substances Persistantes, Bioaccumulables et Toxiques pour l'environnement
PBTk : Physiologically Based Toxicokinetic
PCB : Polychlorobiphényles
PCR : Réaction en chaîne par polymérase
PFOS : acide perfluorooctanesulfonique
PNEC : concentration prédite sans effet
POP : Polluant Organique Persistant
QSAR : Quantitative Structure Activity Relationship
RCIU : Retards de Croissance Intra-Utérine
REACH : Registration Evaluation and Assessment of Chemicals
REPDOSE : Repeated dose database
ROS : Dérivés réactifs d'oxygène
SCCNFP : Scientific Committee on Cosmetics and Non-Food Products
SGH : système général harmonisé des Nations Unies
T : effectif total
T4 : Thyroxine
TGA : Australian Therapeutic Goods Administration
TSK : Trimmed Spearman Karber

US FDA : United States Food and Drug Administration

VN : substance identifiée comme Vrai Négatif

VP : substance identifiée comme Vrai Positif

VPN : Valeur Prédictive Négative

VPP : Valeur Prédictive Positive

VTG : vitellogénine

vPvB : substances très persistantes et très bioaccumulables

WEC : Whole Embryo Culture test

Y : anomalie des yeux

ZET : Zebrafish Embryo Teratogenicity test

Résumé :

La réglementation européenne requiert l'évaluation de la reprotoxicité des ingrédients cosmétiques sans avoir recours aux tests sur les organismes définis par la directive européenne sur les animaux utilisés à des fins scientifiques. Pour cribler par exclusion des substances chimiques, l'industrie cosmétique a besoin de développer une méthode alternative à l'expérimentation animale prédictive et spécifique à l'identification d'agents tératogènes (substances entraînant au cours du développement embryonnaire et de manière définitive des malformations physiques et/ou fonctionnelles). Pour cela, le poisson zèbre, le poisson médaka et l'amphibien xénope aux stades embryonnaires ont été évalués sur une liste de 43 substances de référence. Le médaka a été sélectionné pour la fiabilité de son approvisionnement, la robustesse de ses stades embryonnaires lors des manipulations, ainsi que pour les performances du test l'utilisant. De plus, ce test permet de détecter les agents tératogènes les plus puissants, près de la moitié des 26 substances tératogènes de notre liste. Son taux de spécificité est fixé à 100% pour identifier correctement les 17 substances négatives dont l'absence d'effets tératogènes chez l'homme ou un organisme modèle mammifère, est avérée. Néanmoins, les performances de ce test pourraient être améliorées par son automatisation et par l'intégration de la quantification de nouveaux paramètres pour l'identification de malformations fonctionnelles. Enfin, pour prédire l'innocuité d'une substance chimique chez l'Homme, le test prédictif de tératogénicité utilisant les embryons de médaka doit être intégré dans une stratégie globale d'évaluation de la tératogénicité.

Mots-clés :

Méthode alternative à l'expérimentation animale, tératogénicité, médaka, *Oryzias latipes*

Title:

Alternative method to animal experimentation for the identification of chemicals altering embryonic development - Development of a screening test on the embryonic stages of medaka fish *Oryzias latipes*

Summary:

European legislation requires the assessment of reproductive toxicity of cosmetic ingredients without using tests on the organisms defined by the European directive on animals used for scientific purposes. To screen by excluding chemicals, cosmetics industry needs to develop an alternative method to animal testing, which needs to be predictive and specific in identifying teratogen agents (during embryonic development substances causing definitive physical and / or functional defects). For this, zebrafish, medaka fish and *Xenopus* amphibian at embryonic stages were assessed on a list of 43 reference substances. Medaka has been selected to the reliability of its supply, the robustness of its embryonic stages during handling, as well as for performance of its test. In addition, this test can detect the most potent teratogen agents, nearly half of the 26 teratogens of our list. Its specificity rate is set at 100% for correctly identifying 17 negative substances for which the absence of teratogenic effects is proved in humans or mammalian model organism. However, the performance of this test may be improved by its automation and integration of new quantification parameters for the identification of functional defects. Finally, to predict the safety of a chemical in humans, the predictive teratogenicity test using medaka embryos must be integrated into a comprehensive strategy for assessing the teratogenicity.

Keywords:

Alternative method to animal testing, teratogenicity, medaka fish, *Oryzias latipes*