

## MODELE DE RAPPORT FINAL

# **GinFiz – N°2020/01/133**

## ***Rapport Final***

### **Projet financé dans le cadre du PNR EST**

Programme national de recherche Environnement-Santé Travail

**Titre du projet: Gonadal aromatase inhibition and other toxicity pathways leading to Fecundity Inhibition in Zebrafish: from initiating events to population impacts**

**Période concernée : du 20/11/2020 au 20/09/2024**

**Nom, titre et organisme du responsable scientifique : Rémy Beaudouin, PhD HDR, INERIS, UMR-I 02 SEBIO**

### **DECLARATION DU RESPONSABLE SCIENTIFIQUE**

Je, soussigné Rémy Beaudouin, responsable scientifique du projet GinFiz, déclare que

Le présent rapport final donne une description fidèle des travaux réalisés dans le cadre du projet depuis son démarrage.

Le projet (cocher la case correspondante):

- a entièrement atteint ses objectifs;
- a atteint l'essentiel de ses objectifs excepté des écarts mineurs;
- n'a pas réussi à atteindre certains des objectifs essentiels prévus.

A ma connaissance, le rapport financier est en accord avec les travaux réalisés.

Date: 31/10/2024

Signature: .....



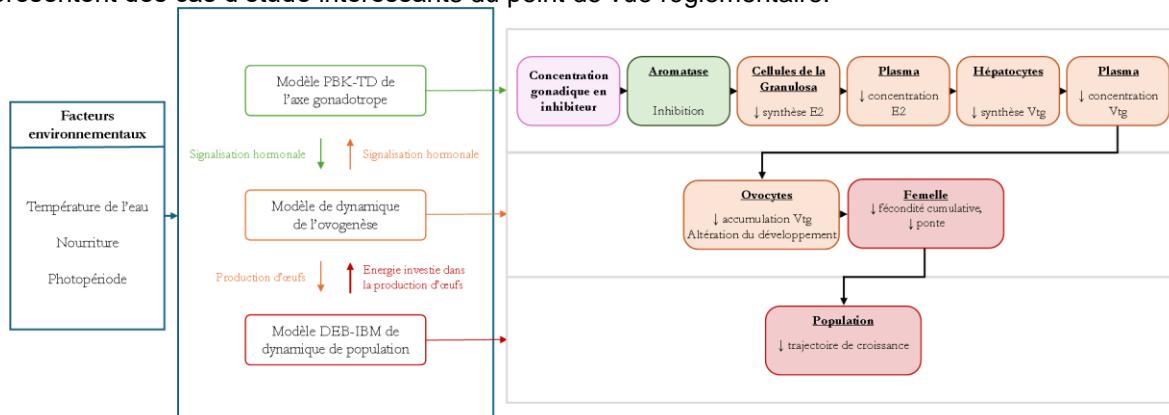
## 1. RESUME

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

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

Le projet GinFiz visait donc à développer et à tester de nouvelles méthodes pour caractériser les effets non-intentionnels des produits phytopharmaceutiques sur les populations de poissons, en particulier les impacts résultant d'atteintes du système endocrinien des individus. A cette fin, le projet proposait le développement et l'amélioration d'une qAOP de l'inhibition de l'aromatase afin de prédire précisément pour les PE, les doses internes accumulées, et leurs liens avec les impacts sur les différents niveaux biologiques, jusqu'aux effets sur les populations. Par ailleurs, dans un contexte réglementaire où l'identification des PE est notamment conditionnée par une démonstration des modes d'action postulés, mais où la méthodologie correspondante (guide ECHA/EFSA) n'a encore été que peu éprouvée à ce stade, le projet ambitionnait d'explorer les apports de l'intégration d'une qAOP afin d'améliorer l'évaluation des dangers de ces substances.

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



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

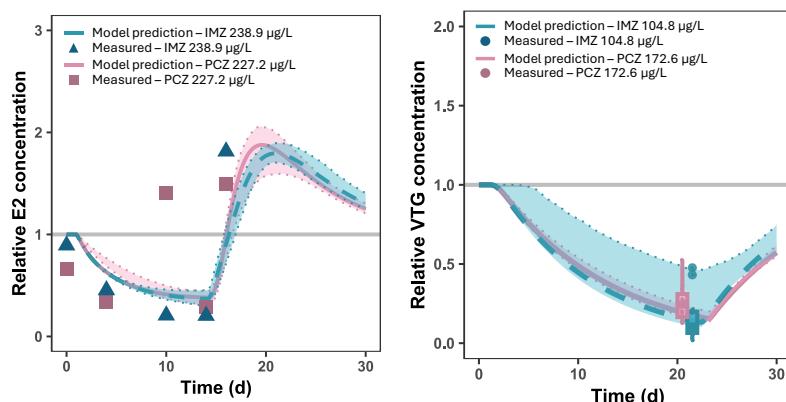
Le développement de la qAOP pour le poisson zèbre a impliqué l'amélioration et/ou l'adaptation de quatre modèles mathématiques différents (Fig.1) : (i) calibration et application d'un modèle cinétique basé sur la physiologie (PBK) chez le poisson zèbre pour les substances étudiées, (ii) perfectionnement du modèle de dynamique des hormones stéroïdiennes chez le poisson zèbre : modèle de toxicodynamie (TD) de l'axe gonadotrope, représentant l'hypothalamus-hypophyse-gonades (axe HPG), (iii) transcription du modèle de dynamique de développement des ovocytes au poisson zèbre,

(iv) modèle de dynamique des populations (basé sur la théorie «Dynamic Energy Budget » DEB, et utilisant une approche individu centrée, IBM). Ces travaux de modélisation se sont appuyés sur la production de données complémentaires générées au cours du projet GinFiz.

La toxicocinétique (TK) des fongicides azolés chez les poissons était peu documentée, en particulier celles du prochloraz (PCZ) et de l'imazalil (IMZ). Un sous objectif du projet était donc de comprendre et de modéliser la TK des deux substances chez le poisson zèbre, indépendamment du schéma d'exposition. Pour cela, les données TK de la littérature ont été collectées, incluant différents modes d'exposition, chez différentes espèces (*per os* et par l'eau). De plus, deux expériences sur des poissons zèbres exposés, soit à l'IMZ, soit au PCZ, ont été réalisées pour compléter les données. Les travaux de modélisation PBK ont été réalisés à l'Ineris (équipe TEAM / UMR-I 02 SEBIO) et ils suggèrent fortement que le PCZ et l'IMZ sont activement transportés à travers les branchies en absorption et excrétion, impliquant que la fraction effectivement absorbée par les poissons est faible. Les résultats du modèle confirment également que les deux molécules sont largement métabolisées par le foie, principalement en des conjugués glucuronides. Dans l'ensemble, les performances du modèle sont bonnes, prédisant précisément les concentrations internes dans plusieurs organes clés chez les mâles et les femelles. Ainsi, le modèle PBK permet de comprendre les profils cinétiques de l'IMZ et du PCZ en prédisant avec précision les concentrations internes dans différents organes dans trois espèces de poissons différentes, quel que soit le scénario d'exposition (*per os* et par l'eau) (Li et al. 2014).

Un second modèle représentant l'axe gonadotrope a été développé à l'Ineris (équipe TEAM / UMR-I 02 SEBIO) afin d'étudier la perturbation du système endocrinien induite par une inhibition de l'aromatase chez le poisson zèbre femelle. Ce second modèle a été combiné au modèle PBK de façon à tenir compte des fluctuations des concentrations internes en contaminant. Ce modèle de l'axe gonadotrope est donc un modèle PBK-TD comprenant l'hormone lutéinisante (LH), la testostérone (T), la 17 $\beta$ -estradiol (E2), la 11-kétotestostérone (11-KT) et la synthèse de la vitellogénine (VTG). Le développement du modèle a été réalisé en deux étapes : (i) modélisation de l'état basal physiologique de l'axe gonadotrope ; (ii) modélisation de la TD de l'IMZ et du PCZ. Deux expériences ont été réalisées permettant la calibration du modèle et de compléter les données produites lors de précédents projets (De Oliveira et al. 2020). Dans le modèle, les effets du PCZ et de l'IMZ découlent de l'inhibition compétitive de l'aromatase, compensée partiellement par une induction du gène de l'aromatase. Le modèle reproduit de façon précise le fonctionnement physiologique de l'axe gonadotrope, ainsi que sa perturbation par les deux substances (Fig. 2). Ainsi, l'ensemble de ces résultats expérimentaux ont été prédis par le modèle dans une plage de variation d'un facteur deux pour l'état physiologique et pour les effets sur l'E2, la VTG et l'aromatase. Le modèle calibré a été également capable de prédire des données de la littérature autant sur les niveaux physiologiques des hormones (*i.e.*, sans exposition) qu'à la suite d'une exposition au PCZ chez le poisson zèbre (Ly et al. soumis).

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



**Figure 2.** Observations expérimentales et prédictions du modèle pour les concentrations d'œstradiol (E2) et de vitellogénine (VTG) dans le plasma de poissons zèbres exposés au PCZ et à l'IMZ.

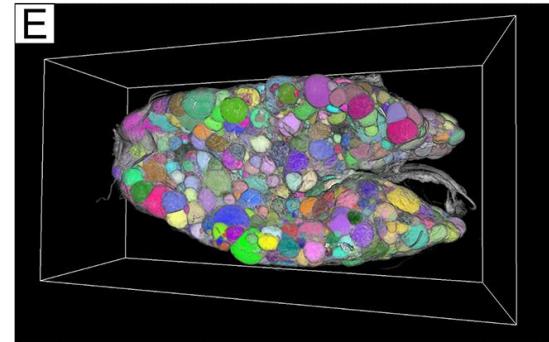
Pour développer le modèle d'ovogenèse (troisième modèle de cette qAOP), de nouvelles données ont été acquises sur la perturbation de ce processus par les deux substances d'intérêt, PCZ et IMZ. A l'issue des premières expositions, des analyses histologiques computationnelles (analyses 2D) ont été réalisées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

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

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

Cette première tâche qui consistait à développer les modèles composant la qAOP, reliant les concentrations d'exposition à des effets au niveau de la population, a été finalisée par la prédiction des conséquences de la perturbation de l'axe gonadotrope et de l'ovogénèse sur le cycle de vie des individus et la dynamique de population. Cette étape a été réalisée en utilisant un modèle précédemment développé à l'Ineris (équipe TEAM / UMR-I 02 SEBIO) et dont le comportement en situations écologiques a été évalué et validé (Beaudouin et al., 2015). Afin d'intégrer les effets du PCZ à ce modèle et prédire son impact à long terme sur les populations, les sorties des modèles des niveaux inférieurs ont été intégrées. De plus, en se basant sur la littérature, des effets dose-dépendants additionnels ont été ajoutés sur les paramètres. Plusieurs scénarios d'exposition ont été simulés sur la base de concentrations sélectionnées par l'équipe en charge de la tâche sur l'évaluation du risque (Ineris, équipe ETES). Chaque scénario a été simulé pour 300 populations pour estimer la variabilité inter-populations. Dès 24,9 µg/L, le PCZ entraîne une baisse de l'effectif des adultes et des juvéniles au sein d'une population de poissons zèbres et une modification du sex-ratio des populations (Fig. 4). Cependant, lorsque l'exposition cesse, le modèle prédit une certaine résilience avec une ré-augmentation des effectifs. Il est important de noter que la modélisation des effets (relation doses-réponse) repose essentiellement sur des données mesurées après 21 jours d'exposition. Lors d'une exposition continue plus longue et/ou en présence d'autres facteurs écologiques de stress, une aggravation des effets est probable, pouvant *in fine* conduire à la disparition des populations (pas de données disponibles pour supporter la modélisation).

La seconde grande tâche du projet était l'application de la qAOP développée dans un contexte réglementaire pour évaluer son apport sur l'évaluation du caractère PE du PCZ. Globalement, les

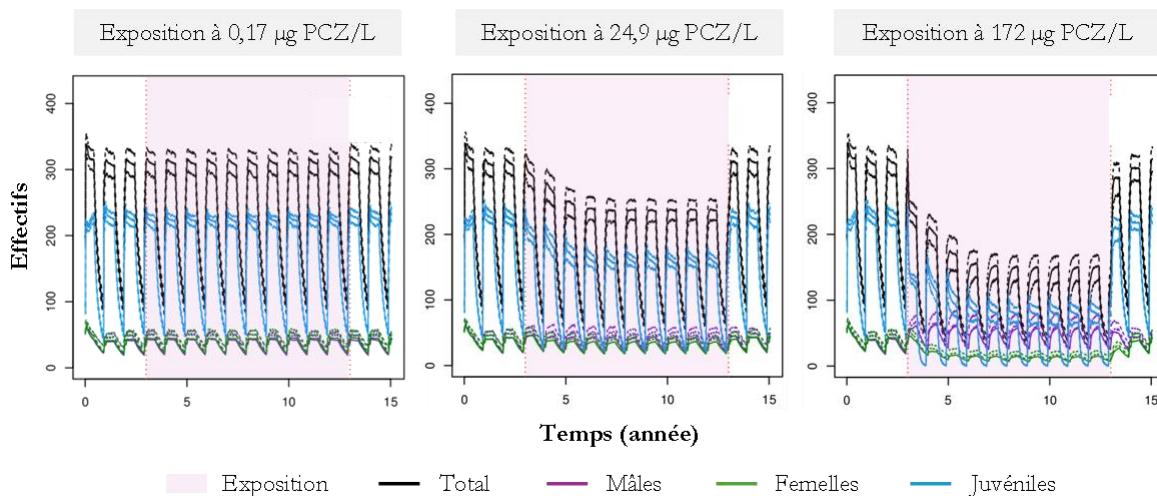


**Figure 3.** Reconstruction 3D d'un ovaire de poisson zèbre (imagerie par microscopie confocale) fusionnée avec la détection automatique des ovocytes au sein de l'ovaire (analyse par le pipeline développé dans Lesage et al., 2023).

travaux réalisés dans le projet GinFiz, à savoir les expérimentations et leur exploitation dans le cadre de la qAOP, confortent le poids de l'évidence concernant les effets PE du PCZ.

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

Deuxièmement, pour l'identification des PE agissant sur les écosystèmes, le guide recommande qu'une démonstration soit faite de la répercussion des effets au niveau populationnel. Les modèles développés dans le cadre du projet GinFiz, assemblés dans la qAOP et appliqués au PCZ, remplissent cette fonction. Les travaux réalisés apportent notamment une conclusion fondamentale selon laquelle les effectifs des populations sont susceptibles de s'effondrer à des concentrations d'exposition en deçà des concentrations démontrées comme affectant la fécondité (Fig. 4).



**Figure 4.** Effectifs modélisés lors d'une exposition de dix ans au PCZ précédée et suivie de trois ans de non-exposition ou récupération. Les intervalles de confiance à 95% sont matérialisées par les lignes pointillées. Les lignes pointillées verticales rouges correspondent de gauche à droite au début de la période d'exposition et à la fin de l'exposition.

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

## 2. OBJECTIFS INITIAUX DU PROJET DE RECHERCHE

Certains composés chimiques possèdent la capacité de perturber le système endocrinien ; ils peuvent conduire, par exemple, à des concentrations anormales d'hormones stéroïdes circulantes, et entraîner des dysfonctionnements de la reproduction et du développement. Les perturbateurs endocriniens (PE) regroupent des substances d'origines et de structures très variées. Leurs mécanismes d'actions sont multiples et de nombreuses études ont montré des effets délétères de ces composés PE sur les capacités reproductives de la faune sauvage (invertébrés, poissons, oiseaux, reptiles), d'animaux d'élevage ainsi que de l'homme (Guillette, 2006; Hotchkiss et al., 2008; Skakkebaek et al., 2006; Toppari, 2002) à la fois au niveau des individus mais également au niveau de la population (Kidd et al., 2007; Nash et al., 2004; Sanchez et al., 2011; Tyler et al., 1998).

Afin de limiter la mise sur le marché des PE, la réglementation relative aux produits biocides et phytopharmaceutiques a introduit la définition de critères scientifiques pour l'identification de ces substances (E.C., 2017, 2018). Dans ce cadre, il est prévu de démontrer à la fois un mode d'action de type PE, des effets néfastes à des niveaux d'organisation biologique pertinents pour l'évaluation des dangers et le lien de cause à effet entre les deux. Pour arriver à ces fins, la traduction des déficits fonctionnels chez les individus en effets au niveau des populations constitue donc un enjeu (Calow and Forbes, 2003). Cette extrapolation des données de toxicité individuelles, à partir des mesures faites en laboratoire, à l'échelle des populations pour évaluer les conséquences sur la viabilité des populations (unité biologique que l'on vise à protéger) n'est pas triviale (Beaudouin et al., 2017).

Dans ce contexte, la proposition de voies de la toxicité, dite AOP (« adverse outcome pathway »), reliant les effets aux différentes échelles d'organisation biologique et la modélisation multi-échelles apportant une dimension quantitative à ces voies de toxicité (AOP quantitative, qAOP) permettent, d'une part, cette extrapolation des effets néfastes entre niveaux d'organisation biologique et, d'autre part, de mettre en évidence le lien de cause à effet entre un mode d'action et des effets sur les populations (Conolly et al., 2017; Perkins et al., 2019; Villeneuve et al., 2013).

Le projet GinFiz visait donc à développer et tester de nouvelles méthodes pour caractériser les effets non-intentionnels des produits phytopharmaceutiques sur les populations de poissons, en particulier les impacts résultant d'atteintes du système endocrinien des individus. A cette fin, le projet proposait le développement et l'amélioration d'une qAOP conduisant à une baisse de la fécondité afin de prédire précisément les impacts des PE pour les différents niveaux biologiques (des doses internes accumulées jusqu'aux effets sur les populations). Par ailleurs, dans un contexte réglementaire où l'identification des PE est notamment conditionnée par une démonstration des modes d'action postulés, mais où la méthodologie correspondante (guide ECHA/EFSA) n'a encore été que peu éprouvée, le projet ambitionnait d'explorer les apports de l'intégration d'une qAOP afin d'améliorer l'évaluation des dangers de ces substances.

L'originalité du projet GinFiz réside en partie dans la production de nouvelles données notamment grâce à la lignée transgénique cyp19a1a-eGFP et aux dosages précis des hormones stéroïdiennes circulantes chez le poisson zèbre. Ces données ont permis de développer une qAOP de l'aromatase gonadique chez le poisson zèbre et donc de diversifier les espèces aquatiques utilisées pour l'évaluation des PE. La qAOP développée se base sur la structure de l'AOP 25 proposée par Villeneuve (Villeneuve, 2016), en l'adaptant aux spécificités du poisson zèbre et en y intégrant en amont la toxicocinétique des substances.

### 3. TRAVAUX ET REALISATIONS DU PROJET

#### Description générale des travaux menés au cours du projet

Le projet GinFiz était organisé autour de deux grandes tâches : la première tâche était dédiée à l'acquisition de données, au développement de modèles et à la construction de la qAOP, et la seconde tâche traitait de l'utilisation de la qAOP dans un contexte réglementaire.

#### A. Développement de la qAOP

Le développement de la qAOP pour le poisson zèbre a impliqué l'amélioration et/ou l'adaptation de quatre modèles différents : (i) calibration et application du modèle PBK poisson zèbre aux substances étudiées, (ii) perfectionnement du modèle de dynamique des hormones stéroïdiennes chez le poisson zèbre (modèle de l'axe gonadotrope, représentant l'hypothalamus-hypophyse-gonades, dit axe HPG), (iii) transcription du modèle de dynamique des ovocytes au poisson zèbre, (iv) modèle individu-centré de la dynamique de population (IBM). Ces travaux de modélisation se sont appuyés sur la production de données complémentaires.

##### a. Modèle PBK poisson zèbre aux substances étudiées [Livrable 2.1.1]

Peu de choses sont connues sur la toxicocinétique (TK) des fongicides azolés, en particulier du prochloraz (PCZ) et de l'imazalil (IMZ), chez les poissons. Une meilleure connaissance de leur TK permettrait une meilleure évaluation des risques. L'objectif de cette sous tâche était donc de comprendre et de modéliser la TK des deux substances chez le poisson zèbre indépendamment du schéma d'exposition.

Pour cela, les données TK de la littérature ont été collectées chez différentes espèces de poissons, incluant différents modes d'exposition (*per os* et par l'eau). De plus, deux expériences sur des poissons zèbres exposés, soit à l'IMZ, soit au PCZ, ont été réalisées pour compléter les données. Un modèle cinétique basé sur la physiologie (PBK) appliquée à l'IMZ et au PCZ a été développé (Fig. 1), capable de modéliser différents scénarios d'exposition. Les paramètres du modèle PBK ont été simultanément calibrés en utilisant des jeux de données rapportant les concentrations internes dans plusieurs organes de trois espèces de poissons (jeux de données originaux et de la littérature) par des méthodes bayésiennes (Méthode de Monte-Carlo par chaînes de Markov). Les prédictions du modèle ont ensuite été comparées à des données expérimentales exclues de l'étape de calibration, pour évaluer les performances prédictives du modèle.

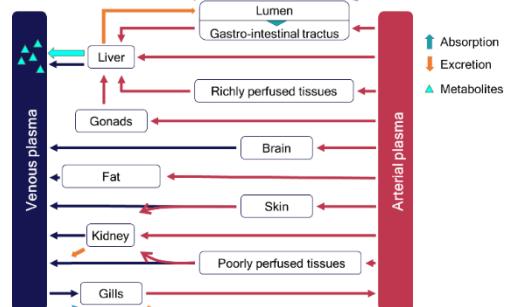


Figure 1. Schéma du modèle PBK.

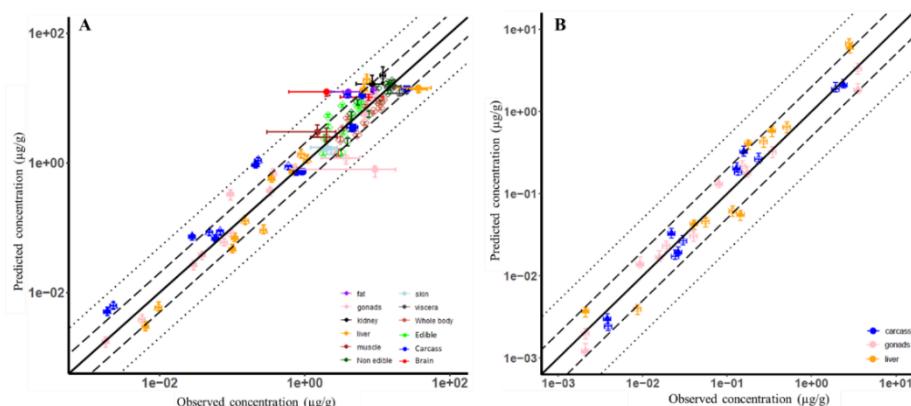


Figure 2. Comparaison des concentrations mesurées et des simulations du modèle pour les deux fongicides azolés : le prochloraz (A) et l'imazalil (B). Les mâles et les femelles sont représentés respectivement par des points vides et pleins.

Les résultats suggèrent fortement que le PCZ et l'IMZ sont activement transportés à travers les branchies, entraînant une petite fraction effectivement absorbée par les poissons. Les résultats du modèle confirment également que les deux molécules sont largement métabolisées par le foie, principalement en des conjugués glucuronides. Dans l'ensemble, les performances du modèle sont bonnes, prédisant précisément les concentrations internes dans plusieurs organes clés (Fig. 2) chez les mâles et les femelles. En moyenne, 90% des données expérimentales sont prédictives dans une plage de variation d'un facteur deux.

Ainsi, le modèle PBK permet de comprendre les profils cinétiques de l'IMZ et du PCZ en prédisant avec précision les concentrations internes dans trois espèces de poissons différentes, quel que soit le scénario d'exposition (*per os* et par l'eau). Cela permet d'améliorer la compréhension du mécanisme d'action des PE au niveau de l'événement moléculaire initial (MIE) en prédisant la bioaccumulation dans les organes cibles, reliant ainsi cet MIE à un possible premier événement clé (KE), initiant la chaîne d'effets néfastes.

### b. Modèle de dynamique des hormones stéroïdiennes chez le poisson zèbre [Livrable 2.1.2 & 2.2.1]

Un modèle représentant l'axe gonadotrope a été développé afin d'étudier la perturbation du système endocrinien, induite par une inhibition de l'aromatase chez le poisson zèbre femelle, *i.e.*, toxicodynamie (TD). Celui-ci a été construit sur la base du modèle PBK précédemment décrit. Ainsi, le modèle de l'axe gonadotrope est un modèle PBK-TD comprenant l'hormone lutéinisante (LH), la testostérone (T), la 17 $\beta$ -estradiol (E2), la 11-kétotestostérone (11-KT) qui se distribuent dans les 12 compartiments (Fig. 1).

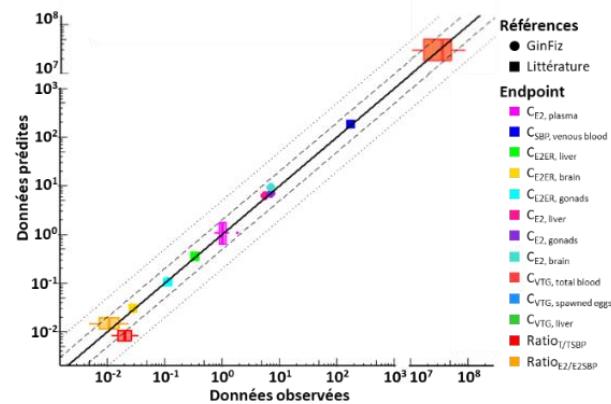
Le développement du modèle a été réalisé en deux étapes : (i) modélisation de l'état basal physiologique de l'axe gonadotrope ; (ii) modélisation de la TD de l'IMZ et du PCZ.

Pour la partie physiologique du modèle, la vitellogénine (VTG) n'a été intégrée que dans le sang, le foie, les gonades et les œufs dans lesquels elle s'accumule et, est éliminée tous les deux jours mimant ainsi une ponte. Le modèle intègre la biosynthèse de la T dans les gonades sous le contrôle de la LH, l'action de la 11 $\beta$ -hydroxylase pour la synthèse de la 11-KT dans les gonades à partir de la T, la synthèse de E2 à partir de la T dans les gonades par l'aromatase A et la synthèse œstrogénodépendante de la VTG dans le foie. Le pool d'E2 et de T libre est régulé par leur liaison à la protéine de transport SBP (Sex Steroids-Binding Protein) dans le sang. L'activité œstrogénique est induite dans le modèle par la forme active des récepteurs œstrogéniques, correspondant à l'E2 lié à son récepteur. Cela a été intégré dans le foie pour induire la synthèse de la VTG, dans le cerveau pour la boucle de rétrocontrôle négative sur la sécrétion de LH, et dans les gonades pour anticiper l'addition du modèle de la dynamique des ovocytes. Ainsi, le modèle décrit la cinétique des hormones non liées et liées aux récepteurs œstrogéniques pour E2 ou liées à la SBP pour l'E2 et la T.

Les effets du PCZ et de l'IMZ ont été modélisés comme découlant de l'inhibition compétitive de l'aromatase, compensée partiellement par une induction du gène de l'aromatase.

Deux expériences ont été réalisées permettant la calibration du modèle : (i) suivi de la cinétique de E2 et 11-KT chez des poissons zèbres sauvages exposés à l'IMZ ou au PCZ (ii) suivi de la reproduction (TG229 OCDE) chez des poissons transgéniques *cyp19a1a-eGFP* exposés à l'IMZ. Ces données ont été complétées par les données produites lors d'un précédent projet (APR EST AIDEZ) sur l'effet du PCZ sur la reproduction (De Oliveira et al. 2020). Le modèle calibré a été par la suite validé sur des données de la littérature non prises en compte lors de la calibration.

Les résultats expérimentaux des conditions témoins ont permis de simuler avec précision les niveaux physiologiques de E2, 11-KT et VTG. Lors des expériences, une diminution de l'E2 a été observée à



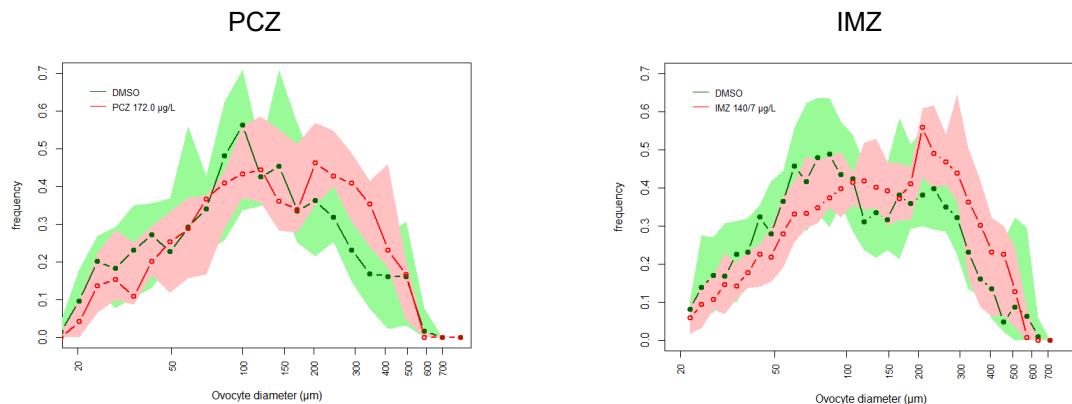
**Figure 3.** Prédictions de l'état basal de l'axe gonadotrope – comparaison des concentrations mesurées et des simulations du modèle.

23 µg IMZ/L, 239 µg IMZ /L, 26 µg PCZ/L et 227 µg PCZ /L. Ces niveaux d'E2 sont corrélés à une diminution de la VTG à 29 µg IMZ/L et 105 µg IMZ/L et à une induction de l'expression du gène de l'aromatase mesuré par fluorescence à 29 µg IMZ/L. Des résultats similaires ont été observés en réponse à une exposition au PCZ (De Oliveira et al. 2020).

L'ensemble de ces résultats expérimentaux ont été prédits par le modèle dans une plage de variation d'un facteur deux pour l'état physiologique (Fig. 3) ainsi que pour les effets sur l'E2, la VTG et l'aromatase (Ly et al. under review). Le modèle calibré a été également capable de prédire des données de la littérature autant sur les niveaux physiologiques qu'à la suite d'une exposition au PCZ chez le poisson zèbre (Ly et al. under review).

### c. Modèle de la dynamique des ovocytes au poisson zèbre [Livrable 2.2.2 & Livrable 2.3.1]

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

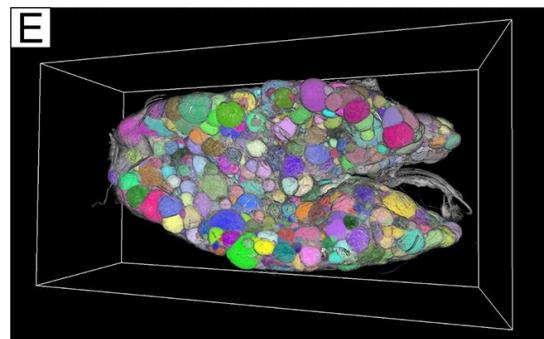


**Figure 4.** Fréquences des classes de tailles des ovocytes après 21 jours d'exposition au prochloraz (PCZ, 172.0 µg/L) ou à l'imazalil (IMZ, 140,7 µg/L) en comparaison aux témoins solvant (DMSO). Les zones grises représentent les intervalles de confiance (95%). n = 8-9 individus par condition.

L'exposition au PCZ ou à l'IMZ pendant 21 jours (TG229 OCDE) altère la distribution des classes de tailles des ovocytes au sein des ovaires en comparaison des témoins, avec une augmentation de la fréquence des ovocytes de grande taille et une diminution de la fréquence des ovocytes de petite taille (Fig. 4).

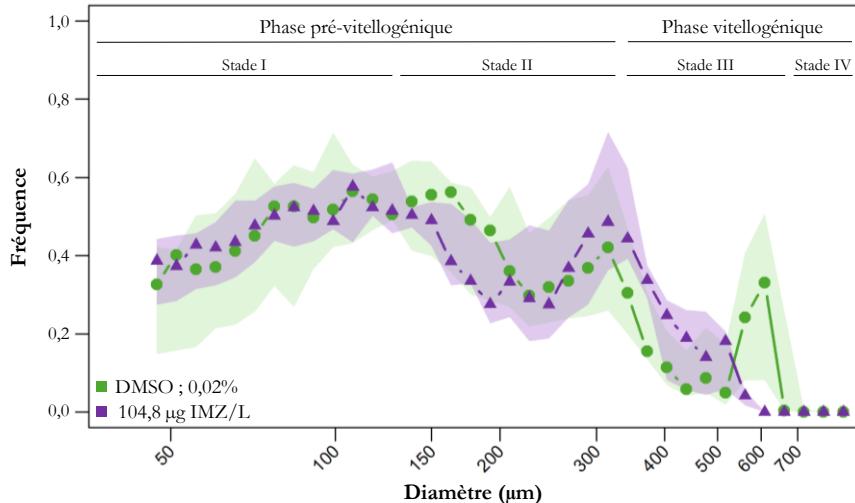
Afin d'obtenir une vision plus fine du processus d'ovogenèse, une technique d'analyse automatique des images d'ovaires en 3D basé sur l'utilisation d'outils de Deep-Learning a été adaptée au poisson zèbre au cours du projet (Lesage et al., 2023). Cette technique permet une analyse de l'ovaire entier (dénombrement de l'ensemble des ovocytes et tailles) permettant ainsi de s'affranchir des problèmes de représentativité des analyses sur coupes histologiques (Fig. 5).

Grace à ce pipeline d'analyse 3D, un suivi précis de l'ovogenèse a été réalisé chez des poissons zèbres en condition non exposés et a permis de déterminer le nombre total d'ovocytes dans les ovaires de femelles à différents temps après la ponte (1.5, 4, 8, 24 h) ainsi que leur distribution dans les différentes classes de tailles (données



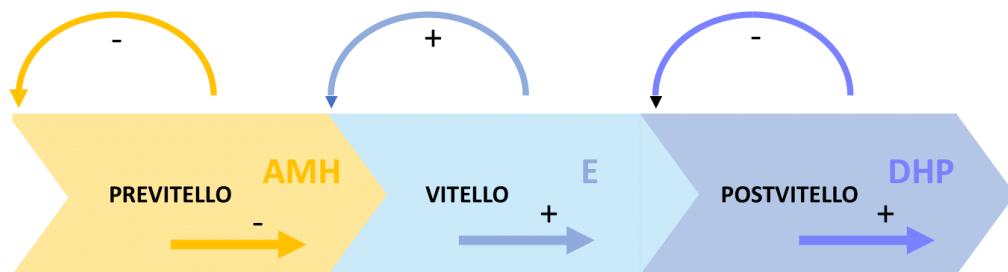
**Figure 5.** Reconstruction 3D d'un ovaire de poisson zèbre (imagerie par microscopie confocale) fusionnée avec la détection automatique des ovocytes au sein de l'ovaire (analyse par le pipeline développé dans Lesage et al., 2023).

non montrées). Ces analyses 3D ont également été appliquées sur les ovaires des poissons zèbres exposés pendant 21 jours à l'IMZ (TG229 OCDE), et ont permis de confirmer les effets obtenus avec les analyses 2D (proportions plus importantes d'ovocytes de grande taille et moins importante de petite taille en comparaison des témoins) (Fig. 6). De plus, le nombre total d'ovocytes dans les ovaires des poissons exposés était plus important que chez les témoins (6181 +/- 828 et 4240 +/- 631 respectivement), certainement en raison de la diminution des pontes chez ces individus exposés, et expliquant en partie l'augmentation de leur indice gonado-somatique.



**Figure 6.** Effets d'une exposition de 21 jours à l'IMZ sur les fréquences des classes de tailles des ovocytes chez le poisson zèbre transgénique *cyp19a1a-eGFP*.  $n_{DMSO}=5$ .  $n_{IMZ}=4$ . Analyse réalisée sur les imageries des ovaires en 3D selon le pipeline décrit dans Lesage et al., 2023.

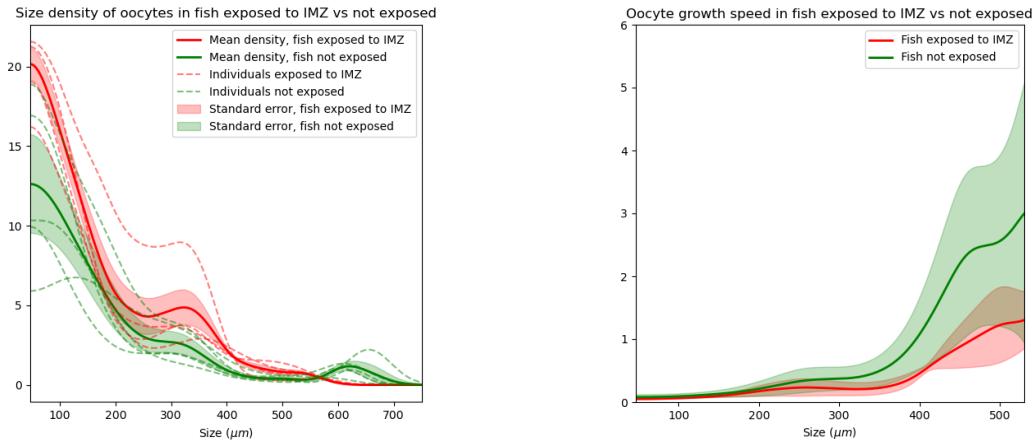
A partir de l'ensemble de ces données, nous avons développé un modèle mathématique générique de dynamique de population ovocytaire chez le poisson zèbre (Clément et al., 2024). La population d'ovocytes est structurée en taille (diamètre) au sein de l'ovaire, variable structurante naturelle car bon indicateur de la maturité des ovocytes. La dynamique de la population d'ovocytes est représentée par une équation aux dérivées partielles de type transport, régie par le taux de recrutement (nombre de nouveaux ovocytes par unité de temps), et la vitesse de croissance des ovocytes, qui dépend de leur taille. Dans la version complète du modèle, le taux de recrutement et la vitesse de croissance dépendent aussi de l'état de la population ovocytaire, afin de prendre en compte les principales régulations de nature hormonale chez le poisson zèbre (Fig. 7). Nous avons fait l'étude mathématique de ce modèle prenant en compte les régulations (existence et unicité de solution, comportement en temps long), mais il reste des étapes avant de pouvoir l'appliquer directement sur les données produites durant le projet.



**Figure 7.** Principales étapes de l'ovogenèse chez le poisson zèbre, avec des boucles de rétroaction. Les codes couleurs délimitent les principales étapes de maturation des ovocytes. Les flèches horizontales correspondent aux taux de croissance, tandis que les flèches circulaires correspondent au recrutement dans chaque étape. Les symboles + (respectivement -) distinguent les boucles de rétroaction positive des boucles de rétroaction négative, médiées par différents signaux hormonaux.

A partir des données de dénombrement et mesure de taille des ovocytes chez des poissons zèbres adultes de même âge, nous avons reconstruit la densité d'ovocytes en fonction de leur taille (panel gauche Fig. 8) pour quatre poissons témoins et cinq poissons exposés à l'IMZ (105 µg IMZ/L). En supposant que la dynamique ovocytaire est lente chez les poissons adultes, et que l'exposition à l'IMZ n'a pas d'impact sur le recrutement de nouveaux ovocytes, nous pouvons estimer la vitesse de

croissance des ovocytes en fonction de leur taille, pour des poissons zèbres non exposés et exposés à l'IMZ (panel droit Fig. 8). On observe que la vitesse de croissance des ovocytes en vitellogenèse est significativement plus lente chez les poissons zèbres exposés à l'IMZ. Cela est cohérent avec un effet inhibiteur de l'IMZ sur la synthèse de vitellogénine, en lien avec l'inhibition de l'aromatase.



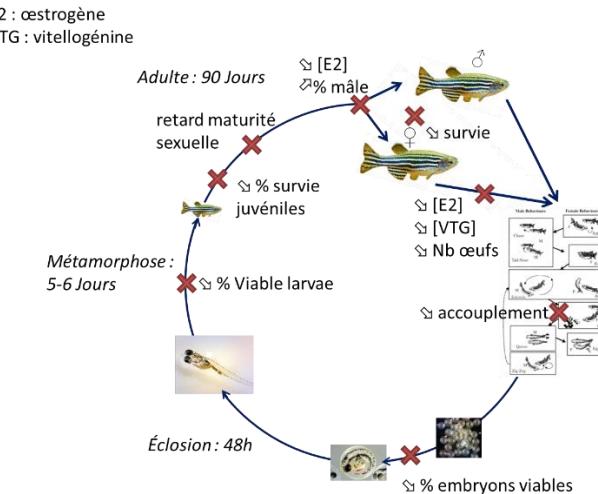
**Figure 8.** À gauche, densités d'ovocytes en fonction de leur taille dans des ovaires de poissons exposés à l'IMZ (rouge) et non exposés (vert). Ces densités sont estimées à partir des données de dénombrement et mesure de taille des ovocytes par une méthode à noyau (kernel density estimation). À droite, vitesse de croissance moyenne des ovocytes en fonction de leur taille (et incertitude sur la vitesse) pour des poissons exposés à l'IMZ (rouge) vs non exposés (vert), estimées à partir des densités et du modèle de dynamique de population ovocytaire.

#### d. Modèle individu-centré de la dynamique de population.

La prédiction des conséquences de la perturbation de l'axe gonadotrope et de l'ovogenèse sur le cycle de vie des individus et la dynamique de population a été réalisé en utilisant un modèle précédemment développé au cours du projet MOZAIC (APR PNRPE 2011-2015) (Beaudouin et al., 2015). Il s'agit d'un modèle individu-centré (IBM, *Individual Based Model*) de dynamique de population du poisson zèbre intégrant un modèle de type "dynamic energy budget" (DEB). Dans ce modèle, dont le comportement en situations écologiques a été évalué et validé (Beaudouin et al., 2015), nous avons intégré les effets du PCZ afin de prédire son impact à long terme sur les populations de poisson zèbre.

Pour cet objectif, une revue de la littérature a été réalisée et les différents effets connus du PCZ sur la physiologie et le comportement du poisson zèbre. Ce travail a permis de récupérer des données expérimentales afin de modéliser des relations doses-réponse intégrées par la suite dans le modèle DEB-IBM. Au total, les données de 17 études ont été retenues pour modéliser les doses-réponse. Les effets identifiés du PCZ sur le poisson zèbre sont résumés dans la Figure 9. Une fois les paramètres de dose-réponse estimés pour les variables d'intérêt, celles-ci ont été incorporées dans le modèle individu centré DEB-IBM et codé sous NetLogo (version 6.4.0, Wilensky (1999)).

Les concentrations des scénarios d'exposition ont été sélectionnés sur la base de concentrations sans effet ou des concentrations d'effets retrouvés (Partie B, Tableau 1). Une période de 3 ans avant l'exposition a été simulée pour que les populations atteignent un état d'équilibre (période d'exposition marquée par les lignes rouges verticales, Fig 10). La capacité de récupération de la population de



**Figure 9.** Effets du PCZ sur le poisson zèbre à différents stades du cycle de vie. Les croix rouges indiquent une perturbation.

poissons zèbres a été testée en intégrant une période de récupération post-exposition (après la seconde ligne verticale pointillée rouge, Fig 10).

Ainsi, les simulations ont été réalisées, selon une exposition constante de 10 ans à six concentrations : de 0,17 µg/L à 172 µg/L (détalée dans la partie B). Chaque scénario a été simulé pour 300 populations pour estimer la variabilité inter-populations.

Dès 24,9 µg/L, le PCZ entraîne une baisse de l'effectif des adultes et des juvéniles au sein d'une population de poissons zèbres et le sex-ratio des populations est modifié. Cependant, lorsque l'exposition cesse, une certaine résilience est observée avec une ré-augmentation des effectifs. Néanmoins, en présence d'autres facteurs écologiques de stress, actuellement ignoré par le modèle, il est probable que la population finisse par disparaître.

Ces premières simulations pourront être améliorées par la suite en intégrant, notamment, des effets pour lesquels moins de données sont disponibles dans la littérature, comme par exemple, les effets sur le comportement (mobilité) ou les effets transgénérationnels. De plus, il est important de noter que la modélisation des effets (relation doses-réponse) repose essentiellement sur des données mesurées après 21 jours d'exposition. Lors d'une exposition plus longue, une aggravation des effets est probable (pas de données pour le valider).

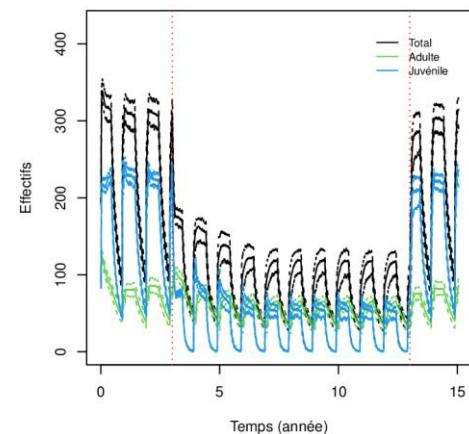
#### e. Intégration de l'ensemble des modèles

L'étape finale du projet était d'intégrer l'ensemble des modèles dans un cadre informatique unifié (programmation, couplage, documentation des différents modèles). Cette étape a été partiellement réalisé car les différents modèles ont été appliqués à différents scénarios d'exposition pour l'évaluation des dangers pour le PCZ, sans pour autant pour l'instant être intégrés dans un cadre informatique commun. Ce dernier point sera un des objectifs du projet Ovotox financé par le GIS FC3R (AAP "Approches numériques") qui débute en 2025.

### B. Evaluation des dangers

L'évaluation du caractère PE du PCZ sur l'environnement selon la méthodologie recommandée par le guide pour les pesticides dans un contexte réglementaire (ECHA/EFSA, 2018) a été menée. Pour mener l'analyse, les données du rapport européen d'évaluation des risques de la substance (E.C., 2007, 2010, 2011; EFSA, 2011a, b) et de la littérature scientifique ont été recensées puis compilées avec les données expérimentales de toxicité et les outils de modélisation développés dans le cadre du projet GinFiz. Compte tenu (i) des données déjà expertisées dans le cadre du dossier européen d'évaluation des risques concluant au fait que le PCZ est une substance ayant des effets de type PE chez les mammifères, (ii) de l'absence de cadre réglementaire pour l'utilisation des données touchant aux effets de type PE chez les invertébrés et (iii) du modèle biologique poisson zèbre utilisé dans le cadre du projet GinFiz, la présente évaluation s'est recentrée sur les organismes vivants vertébrés non mammifères, et plus particulièrement les poissons téléostéens.

Les premières étapes nécessaires à l'évaluation telles que recommandées par le guide ont été menées : revue systématique de la littérature, évaluation de la pertinence et de la fiabilité des données, compilation des preuves d'effet pour leur analyse. Nous avons ensuite sélectionné 22 études jugées fiables pour l'évaluation des effets chez les poissons permettant de recenser 98 lignes de preuves utiles à l'évaluation. Sur cette base, la quasi-totalité des preuves recensées peuvent être reliées à la stéroïdogenèse et, en particulier, à la voie de toxicité déjà décrite chez le poisson sur la perturbation de la fécondité liée à une inhibition de l'aromatase gonadique (AOP 25, Villeneuve (2016)). De nombreuses données mécanistiques (59 lignes de preuves, *in vitro* et *in vivo*) permettent de confirmer le mode d'action endocrinien du PCZ relié à l'AOP 25.



**Figure 10.** Effectifs lors d'une exposition de dix ans au PCZ à 172 µg/L, précédée et suivie de trois ans sans exposition. Les intervalles de confiance à 95% sont matérialisés par les lignes pointillées. Les lignes pointillées verticales rouges correspondent, de gauche à droite, au début et à la fin de l'exposition.

Ces premières simulations pourront être améliorées par la suite en intégrant, notamment, des effets pour lesquels moins de données sont disponibles dans la littérature, comme par exemple, les effets sur le comportement (mobilité) ou les effets transgénérationnels. De plus, il est important de noter que la modélisation des effets (relation doses-réponse) repose essentiellement sur des données mesurées après 21 jours d'exposition. Lors d'une exposition plus longue, une aggravation des effets est probable (pas de données pour le valider).

Des données d'effets néfastes apicaux sont également recensées dans la littérature disponible (39 lignes de preuves) : effets reproductifs et développementaux, effets sur la croissance des individus (longueur des individus parents exposés et sur les individus des première et seconde générations lors d'expositions longues) et la différentiation sexuelle. D'après ces études, le PCZ provoque une déviation du sex-ratio en faveur des mâles (14 lignes de preuves, (Baumann et al., 2013; Baumann et al., 2015) (Holbech et al., 2012; Kinnberg et al., 2007; Thorpe et al., 2011; Zok and Kaufmann, 1988)). Si beaucoup des effets néfastes apicaux sont considérés dans un cadre réglementaire comme des informations complémentaires à l'évaluation (preuves « sensibles aux modalités EATS mais non diagnostic d'un mode d'action endocrinien »), les effets sur le sex-ratio, eux, sont considérés comme étant le témoin d'effets néfastes à mettre en lien directement avec un mode d'action endocrinien (« effets médiés EATS »). Le guide ECHA/EFSA considère de plus que le sex-ratio (effet apical) a une pertinence écologique ((ECHA/EFSA, 2018); (OECD, 2018)). Certaines précautions sont à prendre pour utiliser les données de sex-ratio disponibles, car ce paramètre est influencé par de nombreux facteurs, comme la méthode employée pour le déterminer. En ce qui concerne les données de sex-ratio recensées et validées pour le PCZ, toutes ont été déterminées sur la base d'une analyse histologique des gonades et peuvent donc être considérées comme fiables sur cet aspect (Dang and Kienzler, 2019). De façon générale, on peut donc considérer que l'exposition des poissons au PCZ affecte la différentiation sexuelle en faveur des mâles, ce qui est cohérent avec le fait que la différentiation sexuelle est influencée par l'équilibre des niveaux d'hormones androgéniques et estrogéniques et que l'expression des gènes de l'aromatase joue un rôle crucial dans cet équilibre (e.g. (Hinfray et al., 2018); (Maack and Segner, 2003)). Les 17 lignes de preuves restantes correspondent pour beaucoup à des paramètres indicateurs d'effets qui ne sont pas considérés dans l'évaluation réglementaire comme des témoins d'un mode d'action endocrinien en raison de leur nature sensible à d'autres modalités ou du fait que ces effets peuvent être l'expression de faux positifs dus à des facteurs confondants. Ce sont les paramètres liés à la reproduction et au développement. Deux d'entre eux cependant (fécondité et succès à l'éclosion) sont reportés comme des preuves d'effets suffisantes, et sont observés dans plusieurs études chez plusieurs espèces. De plus, trois lignes de preuves peuvent être considérées comme des preuves complémentaires d'effets (rapport gonado-somatique (GSI), survie des embryons et délai d'atteinte de la maturité). Toutes ces données peuvent être reliées avec l'AOP 25 déjà identifiée de la perturbation de la fécondité liée à l'inhibition de l'aromatase gonadique.

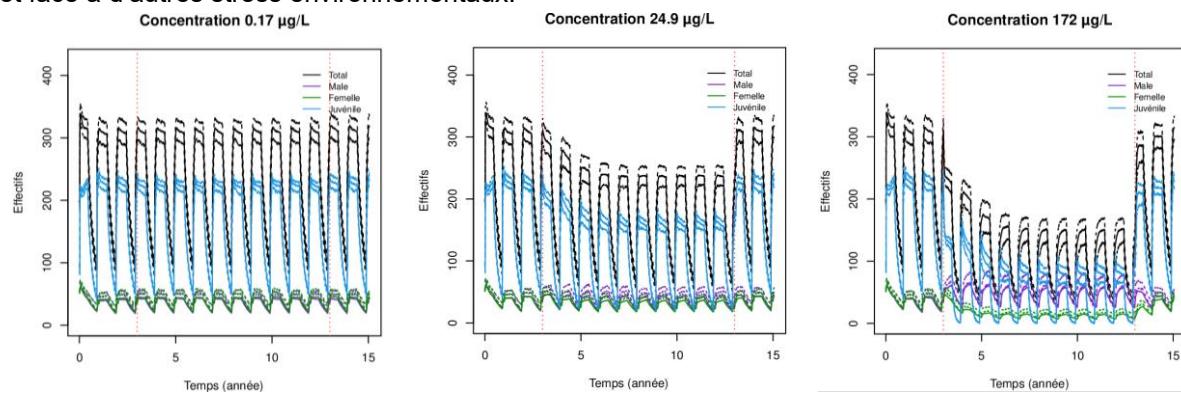
Les données expérimentales produites dans le cadre du projet viennent compléter la matrice des données existantes recensées et ci-avant discutées, avec une cohérence parfaite sur les effets observés (inhibition de l'aromatase gonadique, diminution des concentrations d'estriadiol et de VTG circulant, diminution du nombre cumulé d'œufs pondus) et les hypothèses mécanistiques sous-jacentes. En ce qui concerne les niveaux des concentrations sans effets observés et des plus faibles concentrations d'exposition où des effets ont été observés, il est notable que les données expérimentales produites lors de l'exposition des poissons au PCZ durant 21 jours sur un essai court de la reproduction (TG 229, (OECD, 2012)) permettent de recenser pour la première fois un effet apical à une concentration d'exposition de 1,7 µg/L seulement ((De Oliveira et al., 2020)). En effet, à cette concentration, la survie des juvéniles 96h après éclosion des œufs est affectée à hauteur de 27,5%, ce qui n'avait jamais été observé chez des juvéniles après une exposition parentale. Cette concentration d'effets complète de façon pertinente les preuves recensées comme sensibles aux modalités EATS mais insuffisante pour diagnostiquer un mode d'action endocrinien.

**Tableau 1.** Concentrations d'exposition au prochloraz (µg/L) utilisées pour la simulation des modèles GinFiz et preuves empiriques sous-jacentes à leur sélection.

Prochloraz exposure concentration (µg/L)		Empirical evidence	Indicative of
0.17	0.1 * Lowest NOEC <sup>‡</sup> /LOEC <sup>‡</sup> (see below)	De Oliveira et al., 2020	- Aromatase inhibition, MIE, molecular/cellular
1.7	Lowest LOEC <sup>Embryo</sup> survival, 24h and 96h comparing pre-exposure to exposure period Lowest NOEC <sup>‡</sup> aromatase inhibition	De Oliveira et al., 2020	- Apical endpoint / developmental effects / KE
24.9	Lowest NOEC <sub>reproduction-f0-gen</sub> used for regulatory risk assessment in the DAR and estimated as covering ED effects (corresponding to a LOEC 49.5 µg/L based on reduction of cumulated number of eggs per female, exposure 189 days during a Fish Full Life Cycle assay)	Zok and Kaufmann, 1988	Reproductive effects, KE Apical
100	Lowest LOEC <sub>sex ratio</sub>	Baumann et al., 2013	Reproductive effects, KE, apical, EATS-mediated
172	Lowest LOEC <sub>reproduction-f0-gen</sub>	De Oliveira et al., 2020	Reproductive effects, KE, apical, Sensitive to, but not diagnostic of

La qAOP fournit des prédictions sur des variables populationnelles en se reposant sur les modèles développées et couplés au sein du projet. Cette qAOP a été utilisé pour simuler une exposition continue sur 10 ans de poissons zèbres au PCZ et prédire les conséquences des perturbations de l'axe HPG et de l'ovogénèse sur le cycle de vie des individus et la dynamique des populations (Fig. 11). Les niveaux des 5 concentrations de PCZ ont été sélectionnés sur la base de concentrations sans effet ou des concentrations d'effets retrouvés dans les lignes de preuves précédemment analysées : 0.17, 1.7, 24.9, 100.0 et 172.0 µg/L.

Les résultats de cette simulation permettent premièrement de mettre en évidence qu'une réduction des effectifs de juvéniles s'opère dès la première année d'exposition à la concentration de 24,9 µg/L. Cette concentration de 24,9 µg/L a pourtant été estimée sans effet sur les paramètres reproductifs (nombre d'œufs cumulés pondus), utilisée comme telle dans l'évaluation européenne des risques du prochloraz et jugée comme couvrant les effets PE. A partir de la concentration d'exposition de 100 µg/L, tout comme à 172 µg/L, et toujours dans la quatrième année d'exposition, l'effondrement des effectifs de juvéniles est total. Une récupération s'opère néanmoins dans les dernières années de la simulation après l'arrêt de l'exposition. Deuxièmement, la simulation indique que cette exposition au prochloraz provoque également un effet sur la proportion de mâles et de femelles visible dès 24,9 µg/L, et plus significatif à partir de 100 µg/L d'exposition (Fig. 11). Cette observation est également visible sur le troisième paramètre de sortie étudié : la taille des individus mâles et femelles augmente de façon concentration-dépendante aux mêmes concentrations d'exposition, respectivement 24,9 puis 100 µg/L. Cette observation est à mettre en lien avec la modification de la structure de la population observée suite à la diminution du nombre de juvéniles produit. Même si leur sévérité est probablement sous-estimée dans nos premières simulations (vérification à faire de la validité du modèle avec des données empiriques correspondant à des durées d'exposition supérieures à 21 jours), les effets prédicts ont probablement des conséquences pour la pérennité des populations dans un contexte multi-contaminé et face à d'autres stress environnementaux.



**Figure 11.** Effectifs modélisés lors d'une exposition de dix ans au PCZ précédée et suivie de trois ans de non-exposition ou récupération. Les intervalles de confiance à 95% sont matérialisés par les lignes pointillées. Les lignes pointillées verticales rouges correspondent de gauche à droite au début de la période d'exposition et à la fin de l'exposition.

En conclusion, les travaux réalisés dans le cadre du projet GinFiz, à savoir les expérimentations et leur exploitation dans le cadre de la qAOP, confortent le poids de l'évidence concernant les effets PE du prochloraz. Premièrement, compte tenu de l'ensemble des preuves d'effets disponibles chez le poisson, il est considéré que la modalité S est suffisamment étudiée pour conclure sur cette modalité. Lorsqu'un effet indésirable médié EATS est en outre identifié dans l'ensemble des données probantes, la méthodologie d'identification des PE indique que le lien biologiquement plausible est déjà préétabli en l'absence d'informations prouvant le contraire (i.e. un mode d'action non PE avéré). Dans le cas du prochloraz, toutes les études disponibles examinant le sex-ratio ont montré un effet sur ce paramètre. Par conséquent, même si ce travail ne prend pas en compte l'ensemble des données disponibles (mammifères et amphibiens en plus des poissons), il existe un support empirique (doses-réponses) suffisamment solide pour démontrer dans un contexte réglementaire la plausibilité biologique du lien entre le mode d'action endocrinien de l'inhibition de l'aromatase gonadique et l'inhibition de la fécondité pouvant conduire à un déclin de la population de poissons. Deuxièmement, pour l'identification des PE susceptibles d'agir sur les écosystèmes, le guide recommande qu'une démonstration soit faite de la répercussion des effets au niveau populationnel. Les modèles développés dans le cadre du projet GinFiz, assemblés dans la qAOP et appliqués au prochloraz, remplissent cette fonction. Les travaux réalisés apportent notamment une conclusion fondamentale selon laquelle les effectifs des populations sont susceptibles de s'effondrer à des concentrations d'exposition en-deçà des concentrations démontrées comme affectant la fécondité. Ainsi, nos résultats apportent une preuve supplémentaire à l'identification du fongicide prochloraz comme PE pour l'environnement, en démontrant la pertinence des effets au niveau populationnel dans l'approche poids de la preuve que la réglementation des pesticides recommande d'appliquer.

## Résultats scientifiques

La majorité des objectifs initiaux ont été atteints, et pour certaines tâches, les résultats du projet ont même dépassé les attentes. Cependant, comme mentionné précédemment lors du rapport intermédiaire, les partenaires en charge des expériences *in vivo* et des analyses chimiques ont subi un fonctionnement perturbé en raison des difficultés engendrées par la pandémie de COVID-19, et la réalisation de leurs travaux a donc été retardée par rapport au plan initial. A cause de la disponibilité plus tardive des données, le développement des modèles des dernières tâches du projet et l'évaluation des dangers n'ont pu être que partiellement réalisés (ovogenèse, cycle de vie, et dynamique de population). Ainsi, l'intégration de l'ensemble des modèles dans un cadre informatique unifié et l'application aux deux substances selon différents scénarios (tâche 2.4) n'a été que partiellement réalisée. En effet, les différents modèles ont été appliqués à différents scénarios d'exposition pour l'évaluation des dangers pour le PCZ, mais uniquement partiellement pour l'IMZ.

Afin de construire le modèle de dynamique des hormones stéroïdiennes chez le poisson zèbre (modèle de l'axe gonadotrope), un suivi de la cinétique des hormones stéroïdiennes a été effectué à différents temps sur des poissons zèbres exposés au PCZ ou à IMZ à différentes concentrations (1.7, 17, 172 µg/L – concentrations réelles). Pour cela, des prélèvements ont été effectués pour mesurer les concentrations plasmatiques de stéroïdes circulants (estradiol, ou E2 et 11-kétotestostérone, ou 11-KT). Les méthodes classiquement utilisées pour doser les stéroïdes chez les poissons (ELISA) présentent un manque de spécificité (lié aux anticorps utilisés), une plage dynamique limitée et une absence d'étalement interne, empêchant une quantification juste des concentrations hormonales. Afin de s'affranchir de ces limites, une méthodologie de dosage des stéroïdes circulants à partir de très petits volumes de sang par LC-MSMS a été mise au point au cours du projet GinFiz. Cette méthode permet une quantification rapide et précise de plusieurs hormones en une seule analyse (E2 et 11-KT). De plus, contrairement aux concentrations souvent obtenues dans des homogénats de corps entier chez des espèces de petites tailles, l'adaptation de ces dosages aux petits volumes a permis d'acquérir des données sur le compartiment biologique d'intérêt pour la construction des modèles mathématiques (plasma).

Par ailleurs, les échantillons récoltés lors de l'expérience de suivi du cycle de l'ovogénèse chez les poissons non exposés ont permis de tester, chez le poisson zèbre, une méthode d'histologie 3D des ovaires (stage Antoine Mergot), et ont ainsi permis de compléter la comparaison interspécifique de cette méthode utilisant des outils de deep learning pour une analyse fiable d'images 3D complexes d'ovaires (Lesage et al. 2023). Cette méthodologie a ensuite été utilisée pour analyser finement les effets de l'IMZ sur l'ovogénèse à partir des échantillons produits lors du suivi de la reproduction (TG229 OCDE) chez des poissons transgéniques *cyp19a1a-GFP*.

Grace au protocole de suivi *in vivo* de l'aromatase A dans les gonades de poissons zèbres transgéniques *cyp19a1a-eGFP* développé dans le projet précédent (AIDEZ), cette expérience (TG 229 OCDE) a également permis de suivre la cinétique d'effet de l'IMZ sur l'aromatase gonadique, données qui ont été intégrées au modèle PBK-TD de l'axe gonadotrope, appelé par la suite PBK-HPG, afin de modéliser les rétrocontrôles existants sur cette enzyme clé pour la reproduction.

En parallèle les travaux pour mettre au point les analyses histologiques 2D ont permis d'approfondir l'analyse des données obtenues lors du projet AIDEZ sur les effets du PCZ et de l'IMZ et de mettre en évidence les effets de ces substances sur la dynamique de l'ovogénèse (article en préparation De Oliveira et al.).

Les connaissances sur la TK des composés PCZ et IMZ chez les poissons étaient jusqu'à présent limitées. Afin de combler ce manque de données *in vivo*, deux expériences ont été conduites dans le projet. L'analyse et la modélisation de ses données ont permis de montrer que ces substances étaient activement transportées à travers les branchies, ce qui conduit à une faible fraction réellement absorbée par les poissons. Les résultats du modèle confirment également que les deux molécules sont largement métabolisées par le foie en glucuronides. Le développement d'un modèle PBK spécifique pour ses deux substances permet de prédire les concentrations internes dans les tissus dans le cas d'expositions répétées ou chroniques. Ainsi, nous pouvons modéliser différents scénarios d'exposition pour permettre une meilleure évaluation des expositions et prédire les cascades d'effets entraînés dans ces différents cas.

En s'appuyant sur les nouvelles données expérimentales produites, pour étudier les conséquences sur la physiologie de l'inhibition de l'enzyme aromatase, nous avons développé une approche intégrative combinant un modèle PBK avec un modèle TD de l'axe gonadotrope chez le poisson zèbre. De façon novatrice par rapport aux modèles existants, le modèle PBK-HPG développé permet de tenir compte

de la cinétique des substances pour prédire la dynamique des événements clés ou des effets indésirables. En effet, contrairement aux autres modèles de l'axe gonadotrope qui ne prennent pas en compte la TK (*i.e.* considèrent une exposition constante), notre modèle est dynamique depuis l'étape d'exposition, jusqu'à la cascade d'effets en résultant. Cela améliore la précision des prédictions des résultats biologiques, permet d'évaluer différents scénarios d'exposition (constant ou par pulse), simplifie l'extrapolation entre substance, et renforce la comparabilité entre espèces. De plus, le modèle montre d'excellentes performances : l'homéostasie de l'axe gonadotrope ainsi que les effets de l'exposition à l'IMZ ou au PCZ ont été prédits avec une erreur inférieure à un facteur 2.

En parallèle de la production de données complémentaires sur la dynamique de l'ovogenèse, un premier cadre de modélisation de ce processus a été proposé, en visant à ce qu'il soit suffisamment générique pour être utilisé chez les mammifères et les poissons, pour exploiter un maximum de données possible pour son développement. Différentes approches de modélisation de la dynamique de population des follicules ovariens ont été comparées (Bonnet et al. 2020). Nous avons développé un modèle à compartiments, basé sur des équations différentielles ordinaires, du développement des follicules ovariens tout au long de la vie (Ballif et al. 2022b). Nous avons également développé un modèle continu, structuré en taille, basé sur des équations aux dérivées partielles. Nous avons réalisé une analyse de bifurcation pour les états stationnaires de ce modèle (Clément et al., 2024).

Enfin, en évaluation des dangers, les données expérimentales produites dans le cadre du projet, venues compléter la synthèse des données existantes dans la littérature de preuves d'effets à mettre en lien avec des mécanismes d'action endocrinien et des effets néfastes, ont permis de constituer un jeu de données suffisant pour conforter le poids de l'évidence concernant les effets PE du prochloraz. De façon notable, les conclusions apportées sur la base des modèles développés dans le cadre du projet GinFiz, assemblés dans la qAOP et appliqués au prochloraz, apportent en outre une preuve supplémentaire à l'identification du fongicide prochloraz comme PE pour l'environnement, en démontrant la pertinence des effets au niveau populationnel dans l'approche poids de la preuve que la réglementation des pesticides recommande d'appliquer.

### **Tableau de suivi de réalisation des tâches et d'utilisation des ressources**

L'ensemble des tâches réalisées lors du projet a été décalé et une demande de prolongation de 6 mois a été effectuée (difficultés engendrées par la pandémie de COVID-19, comme signalé dans le rapport intermédiaire). Les dates de fin prévues sont donc celles mises à jour lors de la demande de prolongation en 12/2023.

Les sous tâches 2.3 et 2.4 n'ont pu être réalisées que pour le PCZ et ont donc été révisées par rapport au plan initial des travaux.

Tâche	Partenaire responsable	Etat d'avancement	Date de fin prévue	Principales réalisations
Tâche 1 : Coordination du projet				
Tâche1 : Rapport intermédiaire	Ineris UMR-I02 SEBIO	Réalisée	20/07/2022	
Tâche1 : Rapport final	Ineris UMR-I02 SEBIO	Réalisée	11/11/2024	
Tâche 2 : Développement de la qAOP				
Sous-tâche 2.1 : Modèles sub-individuels Modèle PBK de deux fongicides azolés	Ineris UMR-I02 SEBIO	Réalisée	20/05/2023	Modélisation de la cinétique des substances étudiées chez le poisson zèbre à l'aide d'un modèle PBK. Article publié
Sous-tâche 2.1 : Modèles sub-individuels Modèle PBK-TD de l'axe gonadotrope	Ineris UMR-I02 SEBIO	Réalisée	20/01/2024	Modélisation des effets des substances étudiées chez le poisson zèbre sur la dynamique des hormones stéroïdiennes de l'axe gonadotrope. Article soumis
Sous-tâche 2.2 : Production de données complémentaires Analyses chimiques	EPOC UMR 5805	Réalisée	Exp A. 20/10/2022 Exp B. 20/12/2023	Obtention des données de dynamique hormonale au cours du cycle reproducteur chez les poissons témoins et exposés (expression de <i>cyp19a1a</i> , concentrations en VTG et E2 et 11-KT circulantes)

				Analyse des concentrations des deux fongicides azolés dans l'eau et dans les tissus
Sous-tâche 2.2 : Production de données complémentaires Histologie 2D et 3D	LPGP INRAE	Réalisée	20/01/2024	Imagerie 3D de l'ovaire de zebrafish : dénombrement et mesure des diamètres de l'ensemble des ovocytes Un article publié, un article à soumettre.
Sous-tâche 2.3 : Modèles individu et population. Modèle de l'ovogenèse physiologique et en situation exposée	UMR PRC INRAE	Réalisée partiellement / révisée	20/05/2024	Modélisation dose-dépendante de la fécondité du poisson zèbre proportionnelle au niveau de perturbation de l'aromatase A.
Sous-tâche 2.3 : Modèles individu et population. Modélisation des effets sur la dynamique de population	Ineris UMR-I02 SEBIO	Réalisée partiellement / révisée	20/05/2024	Prédiction des effets du PCZ sur la dynamique de population du poisson zèbre sous différents scénarios environnementaux et toxicologiques. Rapport de stage Ingénieur METATOX AgroParisTech
Sous-tâche 2.4. Assemblage des modèles Application de l'AOP quantitative à un premier cas d'étude : PCZ	Ineris UMR-I02 SEBIO	Réalisée	20/06/2024	Les modèles composants la qAOP ont tous été appliqués sur le cas d'étude PCZ
Sous-tâche 2.4. Assemblage des modèles Application de l'AOP quantitative à un premier cas d'étude : IMZ	Ineris UMR-I02 SEBIO	Réalisée partiellement / retardée	20/06/2024	Le modèle PBK-HPG a été appliqué au cas d'étude de l'IMZ Les modèles individu (fécondité) et population n'ont pas encore été appliqués au cas d'étude de l'IMZ
Tâche 3 : Evaluation des dangers				
Application et évaluation de l'apport des outils développés en tâche 2 au travers de la mise en œuvre du guide ECHA/EFSA pour l'identification des propriétés PE	Ineris ETES	Réalisée	20/09/2024	Publication en rédaction sur l'évaluation des propriétés de perturbation endocrine pour le PCZ dans un contexte réglementaire et apport des données produites dans le cadre du projet.

### ***Liste du personnel financé par ou ayant contribué au projet***

<b>Nom</b>	<b>Organisme</b>	<b>Fonction</b>	<b>Temps consacré au projet</b>
M. Rémy BEAUDOUIN	Ineris UMR-I02 SEBIO	Coordination, encadrement étudiants, modélisation PBK-HPG, modélisation dynamique de population	840 h
Mme Nathalie Hinfray	Ineris ESMI	Coordination et réalisation des expérimentations tâche 2, encadrement étudiant.	705 h
Mme Alice James	Ineris ETES	Coordination et réalisation tâche 3, encadrement étudiant.	425 h
Mme Edith Chadili	Ineris ESMI	Support technique (tâche 2)	190 h
Mme Maryse Marlière	Ineris ETES	Collecte des données bibliographiques (tâche 3)	10 h
Mme Lydia Boutigny Mme Valérie Malvaux	Ineris	Gestion	20 h
Nedelec Gaëlle	Ineris	Support juridique	1 h
Hélène Budzinski	Equipe UMR EPOC	Analyses concentration substances chimiques dans l'eau et tissus, et dosage stéroïdes circulants	140 h
Karyn Le Menach	Equipe UMR EPOC	Analyses concentration substances chimiques dans l'eau et tissus, et dosage stéroïdes circulants	260 h

Violette Thermes	LPGP INRAE	Production des données expérimentales. Livrable 2.2.2. Analyse des données, encadrement des étudiants, rédaction article	308 h
Manon Thomas	LPGP INRAE	Réalisation des expériences Livrable 2.2.2	154 h
Manon Lesage	LPGP INRAE	Réalisation des expériences, rédaction article Livrable 2.2.2	154 h
Antoine Mergot	LPGP INRAE	Réalisation des expériences Livrable 2.2.2	924 h
Romain Yvinec	Inrae - Unité MUCSA	Encadrement étudiants, modélisation de l'ovogenèse	380 h
Frederique Clement	Inria - Unité MUSCA	Encadrement étudiants, modélisation de l'ovogenèse	380 h

### **Listes des étudiants impliqués dans le projet :**

Nom : Louis Fostier

- Principal sujet d'intérêt : Modélisation de l'ovogenèse de poisson
- Responsable : Romain Yvinec et Frederique Clement
- Niveau d'étude (Doctorat, Master, ...) : Doctorat
- Titre de Thèse : « Modélisation mathématique multi-échelle de l'ovogenèse chez les poissons »

Nom : Tu-Ky Ly

- Principal sujet d'intérêt : modélisation PBK-TD de l'axe gonadotrope et des effets du PCZ et de l'IMZ chez le poisson zèbre.
- Responsable : Rémy Beaudouin et Nathalie Hinfray
- Niveau d'étude : Doctorat
- Titre de Thèse : « Modélisation de voies de toxicité (qAOP) conduisant à une diminution de la fécondité chez le poisson zèbre. »

Nom : Antoine Mergot

- Principal sujet d'intérêt : Mise au point des analyses histologiques 2D et 3D sur les ovaires de poissons zèbre traités ou non aux fongicides azolés. Les étapes de la méthode mise en place : fixation, montage dans des blocs de paraffine, sections histologiques, marquage, et les images acquises ont été débruiter, segmenter et analyser à l'aide d'algorithmes d'intelligence artificielle. Le nombre et le diamètre des ovocytes ont pu être mesurés par le logiciel ImageJ.
- Responsable : Violette THERMES (Inrae) et Nathalie Hinfray (Ineris).
- Niveau d'étude : Master 2
- Titre de rapport : « Etude de l'impact de deux fongicides, le prochloraz et l'imazalil sur l'ovogenèse du poisson zèbre »

Nom : Hélène Frappier

- Principal sujet d'intérêt : Les données existantes dans la littérature sur le prochloraz ont été évaluées et renseignement du tableau des critères d'identification des perturbateurs endocriniens (guide ECHA/EFSA).
- Responsable : Alice James (Ineris)
- Niveau d'étude : Master 2
- Titre de rapport : « L'évaluation des dangers du prochloraz : Prise en compte de la perturbation endocrine »

Nom : Louis Fostier

- Principal sujet d'intérêt : Modélisation de l'ovogenèse de poisson
- Responsable : Romain Yvinec (unité MUSCA) et Frédérique Clément (unité MUSCA).

- Niveau d'étude : Master 2
- Titre de rapport : « Modélisation de l'ovogenèse de poisson »

Nom : Chloé FACTOU, Talia LAMBERT, Intila YALIKUN

- Principal sujet d'intérêt : Revue de la littérature a été réalisée et les différents effets connus du PCZ sur la physiologie et le comportement du poisson zèbre ont été recensés. Ce travail a permis de récupérer des données expérimentales afin de modéliser des relations doses-réponse et ainsi d'obtenir des valeurs toxicologiques (NEC, EC50, pente de l'effet), intégrées par la suite dans le modèle DEB-IBM.
  - Responsable : Rémy Beaudouin et Tu-Ky Ly (INERIS, UMR-I 02 SEBIO)
  - Niveau d'étude : AgroParisTech METATOX (Master 2)
- Titre de rapport : « Rapport de projet : UE Modélisation des risques liés aux contaminants chimiques (MORICO) ».

## 4. DISSEMINATION DES RESULTATS ET TRANSFERT DE CONNAISSANCES

### ***Liste des publications scientifiques***

1. Clément F., Fostier L., Yvinec R. 2024. Well-posedness and bifurcation analysis of a size-structured population model: Application to female gametes dynamics. <https://hal.science/hal-04699357v1>. [soumis]
2. Ballif, G., F. Clément, and R. Yvinec. 2022b. Nonlinear compartmental modeling to monitor ovarian follicle population dynamics on the whole lifespan. *Journal of Mathematical Biology*, 89(1), 2024, doi : 10.1007/s00285-024-02108-6 [Publié]
3. Tu-Ky LY, Julie DE OLIVEIRA, Edith CHADILI, Karyn LE MENACH, Hélène BUDZINSKI, Alice JAMES, Nathalie HINFRAY, Rémy BEAUDOUIN. Imazalil and prochloraz toxicokinetics in fish probed by a physiologically based kinetic (PBK) model. *ESPR*. doi: 10.1007/s11356-024-34642-7. [Publié]
4. Lesage M, Thomas M, Péicot T, Ly TK, Hinfray N, Beaudouin R, Neumann M, Lovell-Badge R, Bugeon J, Thermes V. 2023. An end-to-end pipeline based on open source deep learning tools for reliable analysis of complex 3D images of ovaries. *Development*. doi: 10.1242/dev.201185. [Publié]
5. Tu-Ky LY, Edith CHADILI, Karyn LE MENACH, Hélène BUDZINSKI, Cleo TEBBY, Nathalie HINFRAY, Rémy BEAUDOUIN. Integrating the Gonadotropin Axis in a PBK-TD Model: A Case Study on Azole Fungicides. [soumise à Aquatic Toxicology].
6. De Oliveira Julie, Chadili Edith, Mergot Antoine, Thermes Violette, Ly Tu-Ky, Piccini Benjamin, Palluel Olivier, Budzinski Hélène, Le Menach Karyn, Pardon Patrick, Beaudouin Rémy, Cousin Xavier, Brion François, Hinfray Nathalie. Endocrine effects of the azole fungicide Imazalil on aromatase expression, vitellogenesis and ovarian histology using cyp19a1a-eGFP-casper transgenic zebrafish. [à soumettre à Aquatic Toxicology].
7. Tu-Ky Ly, Blanche Goddyn, Frédérique Clement, Nathalie Hinfray, Rémy Beaudouin. 2024. Modeling of the HPG axis in teleost fish: physiological processes. *Critical Reviews in Toxicology*. [soumis]

### ***Participation à des manifestations scientifiques : posters et présentations***

1. Ly et al. 2022. Poster. « Modèle toxicocinétique pour un fongicide azolé chez trois espèces de poisson ». Colloque de la Société d'Ecotoxicologie Fondamentale et Appliquée (SEFA) 2022 à Metz.
2. Fostier et al. 2023. Poster. « Fish oogenesis modeling : oocyte population dynamics » Journées reprosciences 2023, 03/05/2023-05/05/2023, Paris.
3. Fostier et al. 2023. Communication orale. « Un modèle de dynamique de population cellulaire pour l'ovogénèse des poissons » Journées Math Bio Santé 2023, 27/11/23 - 01/12/23, Paris Marne La Vallée.
4. Hinfray et al. 2023. Poster. Zebrafish models and endocrine disrupting chemicals. 1st French zebrafish meeting. Montpellier, 18-20 octobre 2023.
5. Fostier et al. 2024. Poster. « A model of oocyte population dynamics for fish oogenesis ». Journées Math Bio Santé 2024, 24/06/24 - 28/06/24, Nantes.
6. Ly et al. 2023. Communication orale. « Physiologically Based Gonadotropin Axis Kinetic Model in Female Zebrafish (Danio Rerio) Exposed to Two Azole Fungicides (Prochloraz and Imazalil) ». 30 April - 04 May. 33rd SETAC Europe 2023 in Dublin (<https://europe2023.setac.org/>).
7. Ly et al. 2024. Communication orale. « Modeling Azole Fungicides' Endocrine Disruption: A Physiologically Based Kinetic Model of the Hypothalamus-Pituitary-Gonads Axis (PBK-TD) in Zebrafish», PRIMO, 26-29 mai 2024, Nantes (France)
8. Fostier et al. 2024 Poster. « Analysis of a size-structured fish oocyte population model ». European conference on mathematical and theoretical biology 2024, 22/07/24-26/07/24, Tolède, Espagne.

9. Fostier et al. 2024. Communication orale. « A model of oocyte population dynamics for fish oogenesis ». Biology and Medicine Through Mathematics conference 2024, 15/05/24-17/04/24, Richmond, Virginie, USA.
10. Ly et al. 2024. Communication orale. « Fongicides azoles et perturbation endocrinienne : Exploration des effets par un modèle cinétique à base physiologique de l'axe gonadotrope (PBK-HPG) chez le poisson zèbre», Webinaire "La Recherche en France sur les Perturbateurs Endocriniens", 29 mai 2024, France.
11. Ly et al. 2024. Poster. « Modeling Azole Fungicides' Endocrine Disruption: A Physiologically Based Kinetic Model of the Hypothalamus-Pituitary-Gonads Axis (PBK-HPG) in Zebrafish », ABIES days, 17-18 avril 2024, AgroParisTech, Campus Agro Paris-Saclay, France.
12. Ly et al. 2024. Poster. « Fongicides azolés et perturbation endocrinienne : Exploration des effets par un modèle cinétique à base physiologique de l'axe gonadotrope (PBK-HPG) chez le poisson zèbre », AG UMR-I02 Sebio, 1-2 juillet 2024, INERIS, Verneuil-en-Halatte, France.
13. Ly et al. 2024. Poster. « Fongicides azolés et perturbation endocrinienne : Exploration des effets par un modèle cinétique à base physiologique de l'axe gonadotrope (PBK-HPG) chez le poisson zèbre », SEFA, 3-4 juillet 2024, Besançon, France.
14. Clément F. et R. Yvinec, Comparative dynamics of female germ cell populations : insight from imaging and multiscale modeling, Journées INRAE-INRIA 2023, Jul 2023, Nancy, France
15. Yvinec et al, Time scale separation in life-long ovarian follicles population dynamics model. European Conference on Mathematical and Theoretical Biology - ECMTB 2022, European Society for Mathematical and Theoretical Biology (ESMTB); Society for Mathematical Biology (SMB), Sep 2022, Heidelberg, Germany.
16. Fostier et al., A model of oocyte population dynamics for fish oogenesis, Biology and Medicine through Mathematics Conference, 2024, Richmond (Va) USA.

### **Contribution à l'expertise**

Présentation orale du projet au Workshop - AOP & nouvelles perspectives in silico en écotoxicologie « Worksh'AOP ». Fondation Rovaltain, le 20 octobre 2021, Valence.

Suite à ce workshop un « Editorial trend » a été publié dans ESPR :

Baudiffier D, Audouze K, Armant O, Frelon S, Charles S, Beaudouin R, Cosio C, Payrastre L, Siaussat D, Burgeot T, Mauffret A, Degli Esposti D, Mougin C, Delaunay D, Coumoul X. Editorial trend: adverse outcome pathway (AOP) and computational strategy - towards new perspectives in ecotoxicology. Environ Sci Pollut Res Int. 2024 Jan;31(5):6587-6596. doi: 10.1007/s11356-023-30647-w. Epub 2023 Nov 15. PMID: 37966636.

### **Produits issus des travaux**

Les travaux réalisés dans le cadre de GinFiz permettront à d'aboutir au développement d'un outil informatique permettant l'utilisation de la qAOP mécaniste complète pour l'inhibition de l'aromatase comprenant : (i) un modèle PBK-TD de l'axe gonadotrope, (ii) un modèle mécaniste de dynamique de l'ovogenèse et (iii) un modèle DEB-IBM de dynamique de population.

### **Communication au grand public**

« La diminution de la fécondité chez le poisson zèbre ». Article dans les cahiers de la recherche dédiés à la thématique « Perturbateurs endocriniens ». Anses – Les Cahiers de la Recherche N° 23 - Santé, Environnement, Travail – Juin 2024

Article dans l'Édition N°20 (hiver 2020/2023) du magazine de l'université Paris-Saclay : explorations au coeur du système reproducteur.

Présentation du projet lors d'intervention devant les étudiants de :

- AgroParisTech, dominante d'approfondissement Métatox.
- UE Modélisation des risques liés aux contaminants chimiques (MORICO), AgroParisTech.
- UE TOXRISK 2023-2024, Master 2 Microbiologie Environnement Santé, MNHN/Sorbonne Université.
- Master Risques et Environnement (RE), Parcours Biodiversité, Santé, Environnement (BSE), Université Reims Champagne-Ardennes.
- UE ToxGenR. M1 Toxicologie et Pharmacologie. Université de Paris cité.
- UniLaSalle Rennes | Ecole des métiers de l'environnement (EME).

## 5. RETOMBEES ET PERSPECTIVES

### ***Contribution à l'évaluation et à la gestion des risques sanitaires***

Dans un contexte réglementaire de l'évaluation des effets de perturbation endocrinienne des pesticides, la méthodologie disponible dans le guide ECHA/EFSA recommande que soit menée une analyse des données expérimentales existantes. Cette méthodologie souligne aussi l'importance des modèles populationnels en tant qu'outils pour la production d'informations dites « complémentaires » pour l'évaluation (« supportive information »).

Les conclusions apportées sur la base des modèles développés, assemblés dans la qAOP et appliqués au prochloraz dans le cadre de la tâche d'évaluation des dangers du projet Ginfiz apportent une preuve supplémentaire à l'identification du fongicide prochloraz comme PE pour l'environnement. Les résultats du projet confirment ainsi la pertinence de l'application des modèles et du développement de qAOP pour démontrer les effets au niveau populationnel dans l'approche poids de la preuve que la réglementation des pesticides recommande d'appliquer.

A ce jour, l'utilisation de tels modèles ne se fait pas en routine dans le cadre des dossiers réglementaires d'évaluation du caractère PE car les évaluateurs manquent de modèles standardisés et validés. Les résultats obtenus dans le cadre du projet Ginfiz et leur communication doivent permettre d'encourager la standardisation et la validation de tels modèles pour leur usage en évaluation des risques.

### ***Poursuite des travaux***

L'intégration de l'ensemble des modèles dans un cadre informatique unifié et l'application aux deux substances selon différents scénarios (tâche 2.4) n'ont été que partiellement réalisés. La finalisation de cette tâche pour aboutir à une qAOP fonctionnelle sera un des objectifs du projet Ovotox financé par le GIS FC3R (AAP "Approches numériques") qui débute en 2025. Le projet s'appuie sur la poursuite de la collaboration entre les équipes de recherche MUSCA (équipe projet CNRS-INRAE-INRIA) et l'équipe TEAM (Ineris).

L'objectif sera de combiner les différents modèles développés dans Ginfiz et en particulier le modèle PBK-HPG et le modèle de dynamique de population des ovocytes pour optimiser leurs utilisations dans le contexte de la toxicologie et de développer un simulateur convivial permettant de simuler des qAOP pour les PE avec des résultats détaillés au niveau gonadique.

L'hypothèse principale de ce travail est que la combinaison des modèles apportera des avantages scientifiques et pratiques par rapport à leur utilisation séparée. L'ajustement global du modèle complet à partir de l'ensemble des données devrait améliorer la précision de l'estimation des paramètres, et donc des prédictions du modèle, par rapport aux modèles séparés. Un autre progrès majeur sera la représentation et la préiction adéquates du cycle ovarien/de la ponte, dont la dynamique entrelace des aspects endocriniens, bien capturés par les modèles HPG, et des aspects de biologie du développement et cellulaire, bien couverts par le modèle de l'ovogenèse.

## BIBLIOGRAPHIE

- Baumann, L., Holbech, H., Keiter, S., Kinnberg, K.L., Knorr, S., Nagel, T., Braunbeck, T., 2013. The maturity index as a tool to facilitate the interpretation of changes in vitellogenin production and sex ratio in the Fish Sexual Development Test. *Aquatic Toxicology* 128, 34-42.
- Baumann, L., Knorr, S., Keiter, S., Nagel, T., Segner, H., Braunbeck, T., 2015. Prochloraz causes irreversible masculinization of zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Science and Pollution Research* 22, 16417-16422.
- Beaudouin, R., Coulaud, R., Devillers, J., Dur, G., Pelosi, C., Pery, A., Souissi, S., 2017. Chapitre 5. Le changement d'échelle de l'individu à la population., in: Pery, A., Garric, J. (Eds.), *Les effets écotoxicologiques : de la molécule à la population*. ISTE editions, London, UK, pp. 149 - 213.
- Beaudouin, R., Goussen, B., Piccini, B., Augustine, S., Devillers, J., Brion, F., Pery, A.R., 2015. An individual-based model of zebrafish population dynamics accounting for energy dynamics. *PLoS One* 10, e0125841.
- Calow, P., Forbes, V.E., 2003. Does ecotoxicology inform ecological risk assessment? *Environmental Science & Technology* 37, 146A-151A.
- Clément, F., Fostier, L., Yvinec, R., 2024. Well-posedness and bifurcation analysis of a size-structured population model: Application to female gametes dynamics.
- Conolly, R.B., Ankley, G.T., Cheng, W.Y., Mayo, M.L., Miller, D.H., Perkins, E.J., Villeneuve, D.L., Watanabe, K.H., 2017. Quantitative Adverse Outcome Pathways and Their Application to Predictive Toxicology. *Environmental Science & Technology* 51, 4661-4672.
- Dang, Z., Kienzler, A., 2019. Changes in fish sex ratio as a basis for regulating endocrine disruptors. *Environment International* 130, 104928.
- De Oliveira, J., Chadili, E., Piccini, B., Turies, C., Maillot-Marechal, E., Palluel, O., Pardon, P., Budzinski, H., Cousin, X., Brion, F., Hinfray, N., 2020. Refinement of an OECD test guideline for evaluating the effects of endocrine disrupting chemicals on aromatase gene expression and reproduction using novel transgenic cyp19a1a-eGFP zebrafish. *AQUATIC TOXICOLOGY* 220.
- E.C., 2007. Draft Assessment Report (DAR) - public version. Initial risk assessment by the rapporteur Member State Ireland for the existing active substance PROCHLORAZ of the first stage (part B) of the review programme referred to in Article 8(2) of Council Directive 91/414/EEC.
- E.C., 2010. Addendum to the Draft Report and Proposed Decision. Rapporteur Member State's summary, evaluation and assessment of the additional data and information. Programme for Inclusion of Active Substances in Annex 1 to Council Directive 91/414/EEC. Re-submission : Regulation 33 of 2008 - chapter III (accelerated procedure) - PROCHLORAZ.
- E.C., 2011. Final Addendum to the Draft Report and Additional Report. Rapporteur Member State Ireland for the existing active substance PROCHLORAZ of the third stage Part B of the review programme referred to in Article 8(2) of Council Directive 91/414/EEC and upon resubmission in the framework of the accelerated procedure as laid down in Commission REgulation (EC) No 33/2008.
- E.C., 2017. Regulation 2017/2100/EC of 4 September 2017 setting out scientific criteria for the determination of endocrine-disrupting properties pursuant to Regulation (EU) No 528/2012 of the European Parliament and Council. OJ L 301, 17.11.2017, pp. 1-5.
- E.C., 2018. Regulation 2018/605/EC of 19 April 2018 amending Annex II to Regulation (EC) No 1107/2009 by setting out scientific criteria for the determination of endocrine disrupting properties. OJ L 101, 20.04.2018, pp. 33-36.
- ECHA/EFSA, 2018. Guidance for the identification of endocrine disruptors in the context of Regulations (EU) No 528/2012 and (EC) No 1107/2009. *EFSA Journal* 16, 135.
- EFSA, 2011a. Conclusion on pesticide peer review. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance prochloraz., *EFSA Journal*. European Food Safety Authority, p. 120.
- EFSA, 2011b. Peer Review Report on Prochloraz.
- Guillette, L.J., Jr., 2006. Endocrine disrupting contaminants--beyond the dogma. *Environ. Health Perspect.* 114 Suppl 1, 9-12.

Hinfray, N., Sohm, F., Caulier, M., Chadili, E., Piccini, B., Torch, C., Porcher, J.-M., Guiguen, Y., Brion, F., 2018. Dynamic and differential expression of the gonadal aromatase during the process of sexual differentiation in a novel transgenic cyp19a1a-eGFP zebrafish line. *General and Comparative Endocrinology* 261, 179-189.

Holbech, H., Kinnberg, K.L., Brander-Lavridsen, N., Bjerregaard, P., Petersen, G.I., Norrgren, L., Örn, S., Braunbeck, T., Baumann, L., Bomke, C., Dorgerloh, M., Bruns, E., Ruehl-Fehlert, C., Green, J.W., Springer, T.A., Gourmelon, A., 2012. Comparison of zebrafish (*Danio rerio*) and fathead minnow (*Pimephales promelas*) as test species in the Fish Sexual Development Test (FSDT). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 155, 407-415.

Hotchkiss, A.K., Rider, C.V., Blystone, C.R., Wilson, V.S., Hartig, P.C., Ankley, G.T., Foster, P.M., Gray, C.L., Gray, L.E., 2008. Fifteen years after "Wingspread"--environmental endocrine disrupters and human and wildlife health: where we are today and where we need to go. *Toxicol. Sci.* 105, 235-259.

Kidd, K.A., Blanchfield, P.J., Mills, K.H., Palace, V.P., Evans, R.E., Lazorchak, J.M., Flick, R.W., 2007. Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 8897-8901.

Kinnberg, K., Holbech, H., Petersen, G.I., Bjerregaard, P., 2007. Effects of the fungicide prochloraz on the sexual development of zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 145, 165-170.

Lesage, M., Thomas, M., Pécot, T., Ly, T.K., Hinfray, N., Beaudouin, R., Neumann, M., Lovell-Badge, R., Bugeon, J., Thermes, V., 2023. An end-to-end pipeline based on open source deep learning tools for reliable analysis of complex 3D images of ovaries. *Development* 150, 1185-1185.

Maack, G., Segner, H., 2003. Morphological development of the gonads in zebrafish. *Journal of Fish Biology* 62, 895-906.

Nash, J.P., Kime, D.E., Van der Ven, L.T.M., Wester, P.W., Brion, F., Maack, G., Stahlschmidt-Allner, P., Tyler, C.R., 2004. Long-term exposure to environmental concentrations of the pharmaceutical ethynodiol causes reproductive failure in fish. *Environmental Health Perspectives* 112, 1725-1733.

OECD, 2012. Test No. 229: Fish Short Term Reproduction Assay.

OECD, 2018. Revised Guidance Document 150 on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption, OECD Series on Testing and Assessment, OECD Publishing, Paris., p. 688.

Perkins, E.J., Gayen, K., Shoemaker, J.E., Antczak, P., Burgoon, L., Falciani, F., Gutsell, S., Hodges, G., Kienzler, A., Knapen, D., McBride, M., Willett, C., Doyle, F.J., Garcia-Reyero, N., 2019. Chemical hazard prediction and hypothesis testing using quantitative adverse outcome pathways. *Altex* 36, 91-102.

Sanchez, W., Sremski, W., Piccini, B., Palluel, O., Maillot-Maréchal, E., Betoule, S., Jaffal, A., Aït-Aïssa, S., Brion, F., Thybaud, E., Hinfray, N., Porcher, J.-M., 2011. Adverse effects in wild fish living downstream from pharmaceutical manufacture discharges. *Environment International* 37, 1342-1348.

Skakkebaek, N.E., Jorgensen, N., Main, K.M., Rajpert-De Meyts, E., Leffers, H., Andersson, A.M., Juul, A., Carlsen, E., Mortensen, G.K., Jensen, T.K., Toppari, J., 2006. Is human fecundity declining? *Int. J. Androl.* 29, 2-11.

Thorpe, K.L., Pereira, M., Schiffer, H., Burkhardt-Holm, P., Weber, K., Wheeler, J.R., 2011. Mode of sexual differentiation and its influence on the relative sensitivity of the fathead minnow and zebrafish in the fish sexual development test. *Aquatic Toxicology* 105, 412-420.

Toppari, J., 2002. Environmental endocrine disrupters and disorders of sexual differentiation. *Semin Reprod Med* 20, 305-312.

Tyler, C.R., Jobling, S., Sumpter, J.P., 1998. Endocrine disruption in wildlife: A critical review of the evidence. *Critical Reviews in Toxicology* 28, 319-361.

Villeneuve, D., 2016. Adverse Outcome Pathway on Aromatase Inhibition Leading to Reproductive Dysfunction (in Fish).

Villeneuve, D.L., Breen, M., Bencic, D.C., Cavallin, J.E., Jensen, K.M., Makynen, E.A., Thomas, L.M., Wehmas, L.C., Conolly, R.B., Ankley, G.T., 2013. Developing predictive approaches to characterize

adaptive responses of the reproductive endocrine axis to aromatase inhibition: I. Data generation in a small fish model. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 133, 225-233.

Wilensky, U., 1999. NetLogo. . Center for Connected Learning and Computer-Based Modeling, Northwestern University. Evanston, IL. .

Zok, S., Kaufmann, W., 1988. BAS 590 F (Prochloraz) – Life Cycle Test on the fathead minnow (*Pimephales promelas*), BASF DocID 2008/107075). Cited in Final Addendum to DAR of Prochloraz.