

Exposome et santé publique

De la recherche à l'expertise

Rencontre scientifique

Mardi 30 novembre 2021 • Maison de la RATP - Paris 12^e

Déclinaison du concept de ‘*something from nothing*’ sur le modèle de culture organotypique de testicules fœtaux humains

Séverine Mazaud-Guittot, chargée de recherche,
UMR 1085, Inserm / Université de Rennes1 / EHESP, IRSET. Rennes
Thèse de Pierre Gaudriault, sous la direction de Bernard Jégou.

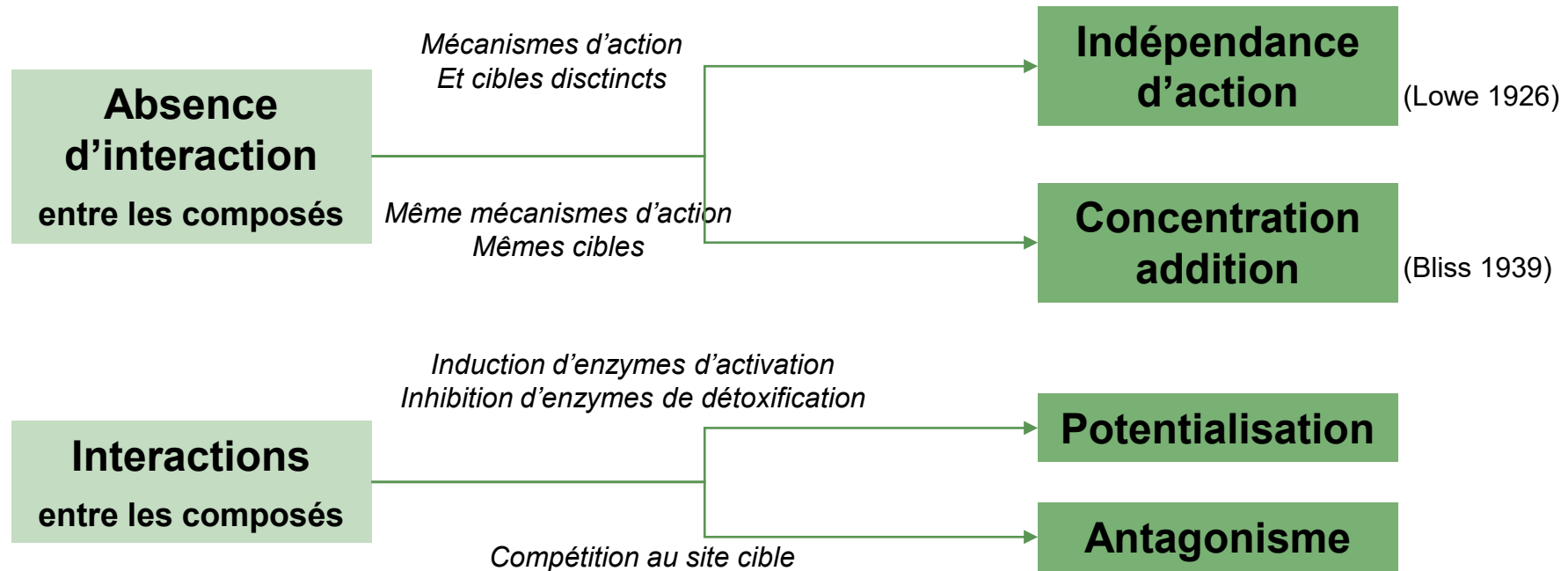
Du criblage de composés en mono-exposition à l'étude de mélanges

Le testicule foetal humain: chef d'orchestre de la masculinisation

Organe complexe, hétérogène, en cours de différenciation

- ➔ *Reproduire les mélanges de la « vraie vie »*
Comparer avec des conditions témoins
et les composés seuls
Autant de *vraies vies* que d'individus
Combien de composés ?
Quelles concentrations ?
Données de l'exposome foetal en 2012...
- ➔ *Tester des modèles théoriques d'effets de mélanges*
Comparer des modèles prédits avec des résultats d'expériences

La science des mélanges en **toxicologie**



(d'après Heys KA et al 2016, doi.org/10.1039/C6RA05406D)

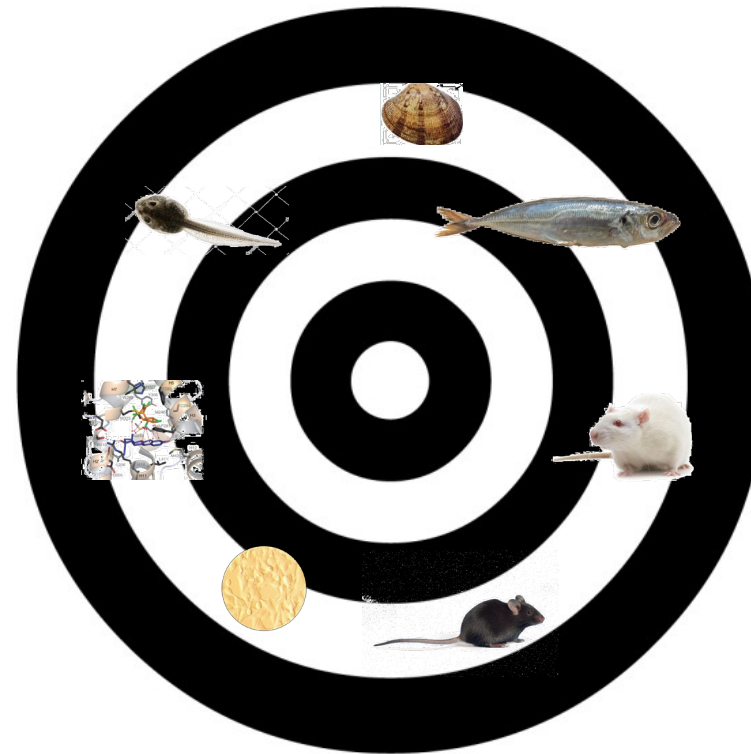
Du concept de mélange au « *Something from nothing* »

Environ. Sci. Technol. 2002, 36, 1751–1756

Something from "Nothing" — Eight Weak Estrogenic Chemicals Combined at Concentrations below NOECs Produce Significant Mixture Effects

ELISABETE SILVA,
NISSANKA RAJAPAKSE, AND
ANDREAS KORTENKAMP*

➔ *Yeast estrogen screen*



- Lignées cellulaires animales
- Mollusques
- Poissons
- Rats
- Souris
- Amphibiens
- Lignées cellulaires Humaines

➔ *Qu'en est-il de l'Homme ?*

Hypothèse de travail: Addition des concentrations

Plusieurs produits chimiques présentant une activité anti-androgénique produiront-ils des effets conjoints même s'ils sont combinés à des concentrations qui elles-mêmes n'induisent pas de réponses observables ?

A 10 ^{-w} M ⇒ pas d' effet	→	A 10 ^{-w} M	⇒ effet ???
B 10 ^{-x} M ⇒ pas d' effet		+ B 10 ^{-x} M	
C 10 ^{-y} M ⇒ pas d' effet		+ C 10 ^{-y} M	
D 10 ^{-z} M ⇒ pas d' effet		+ D 10 ^{-z} M	

$$EDx_{mixture} = \left(\frac{p_1}{EDx_1} + \frac{p_2}{EDx_2} + \frac{p_n}{EDx_n} \right)^{-1}$$

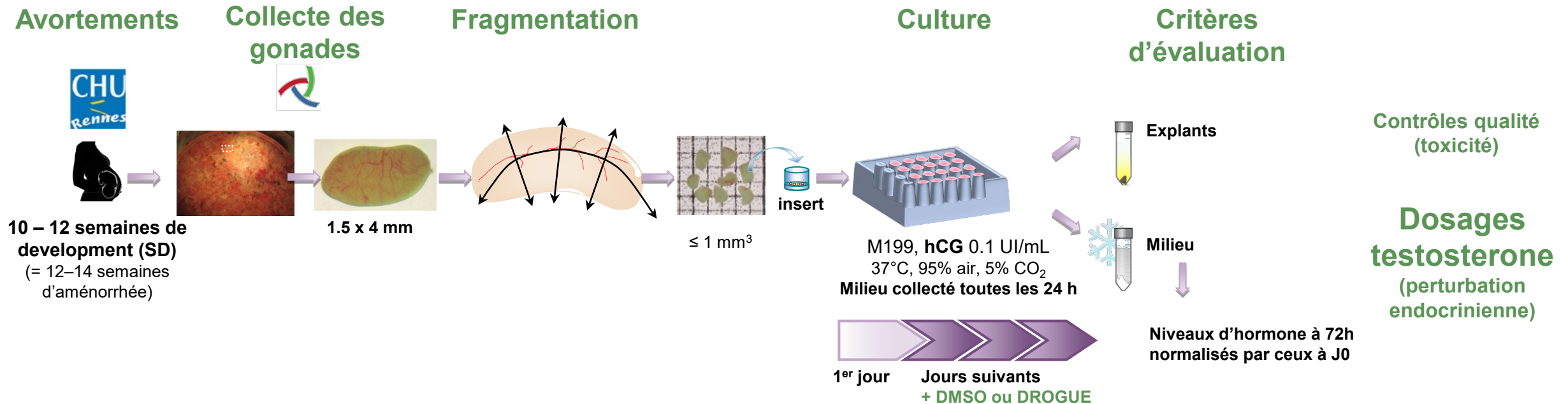
EDx mixture = effet du mélange

EDx 1 = effet du composé 1

p1 = proportion du composé 1

Modèle expérimental: testicule foetal humain

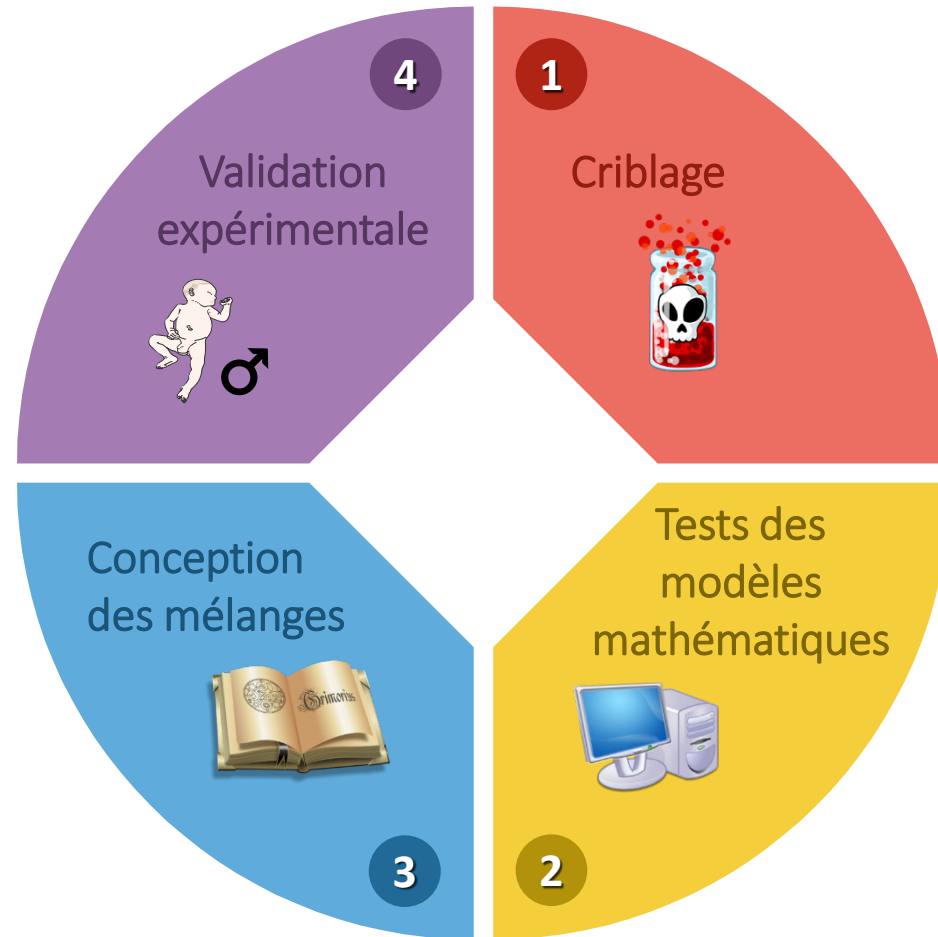
Culture organotypique



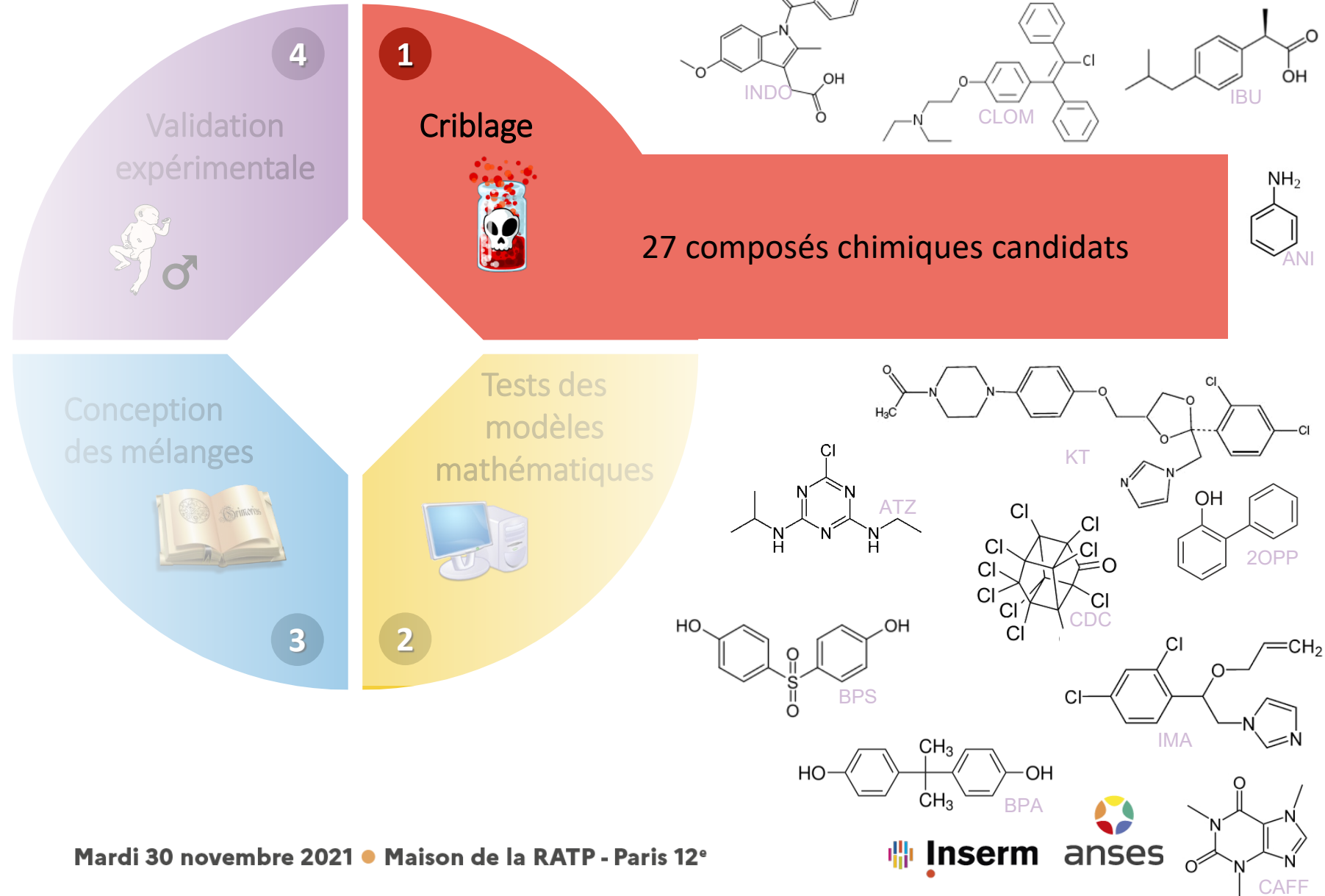
➤ *Choix des composés chimiques*

- Des propriétés anti-androgéniques avérées dans des lignées cellulaires, chez l'animal
- Association entre consommation pendant la grossesse et survenue de malformations du tractus uro-génital mâle.

Stratégie expérimentale



Etape 1



Etape 1: les 27 candidats

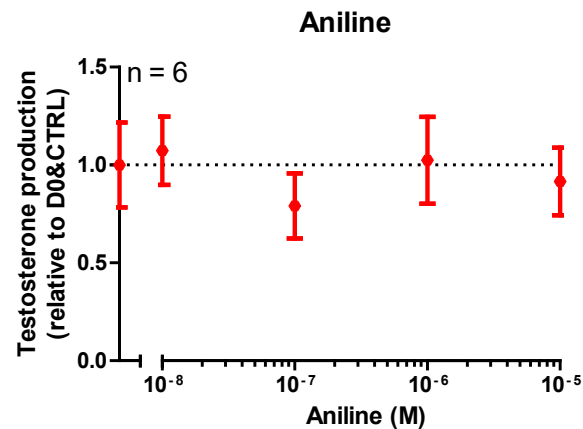
Group	Chemical
Médicaments	Aspirin
	Clomiphene
	Ibuprofene
	Indomethacine
	Ketoconazole
	Paracetamol
	Theophylline
	Valproic acid

Group	Chemical
Produits socio-culturels	Caffeine
	Ethanol
	Paraxanthine (caffeine metabolite)
	Theobromine (caffeine metabolite)
	Theophylline (caffeine metabolite)
	1,3,7 Trimethyluric acid (caffeine metabolite)

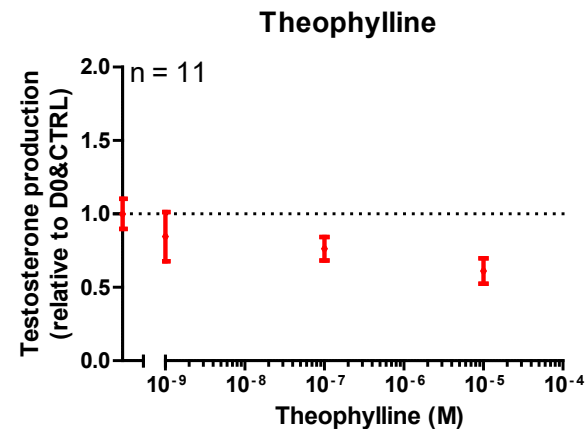
Group	Chemical
Polluants industriels	Aniline
	Bisphenol A
	Bisphenol B
	Bisphenol E
	Bisphenol F
	Bisphenol S

Group	Chemical
Pesticides, herbicides, fongicides...	Atrazine
	Bitertanol
	Chlordecone
	Glyphosate
	Imazalil
	Orto-phenylphenol
	Prochloraz
	Propiconazole

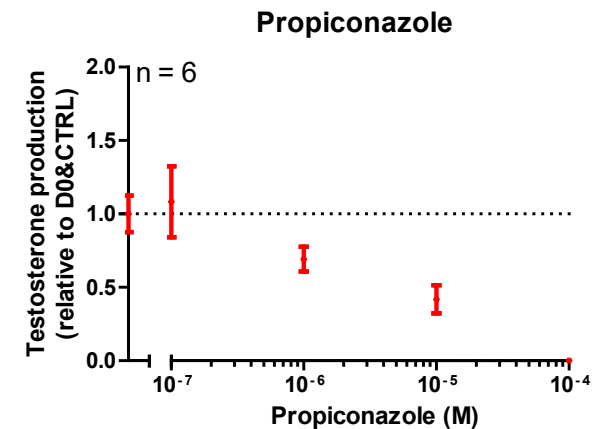
Etape 1: Etablissement des courbes concentration-niveaux de testostérone pour *chaque* composé



Norm-androgénique



Anti-androgénique modéré

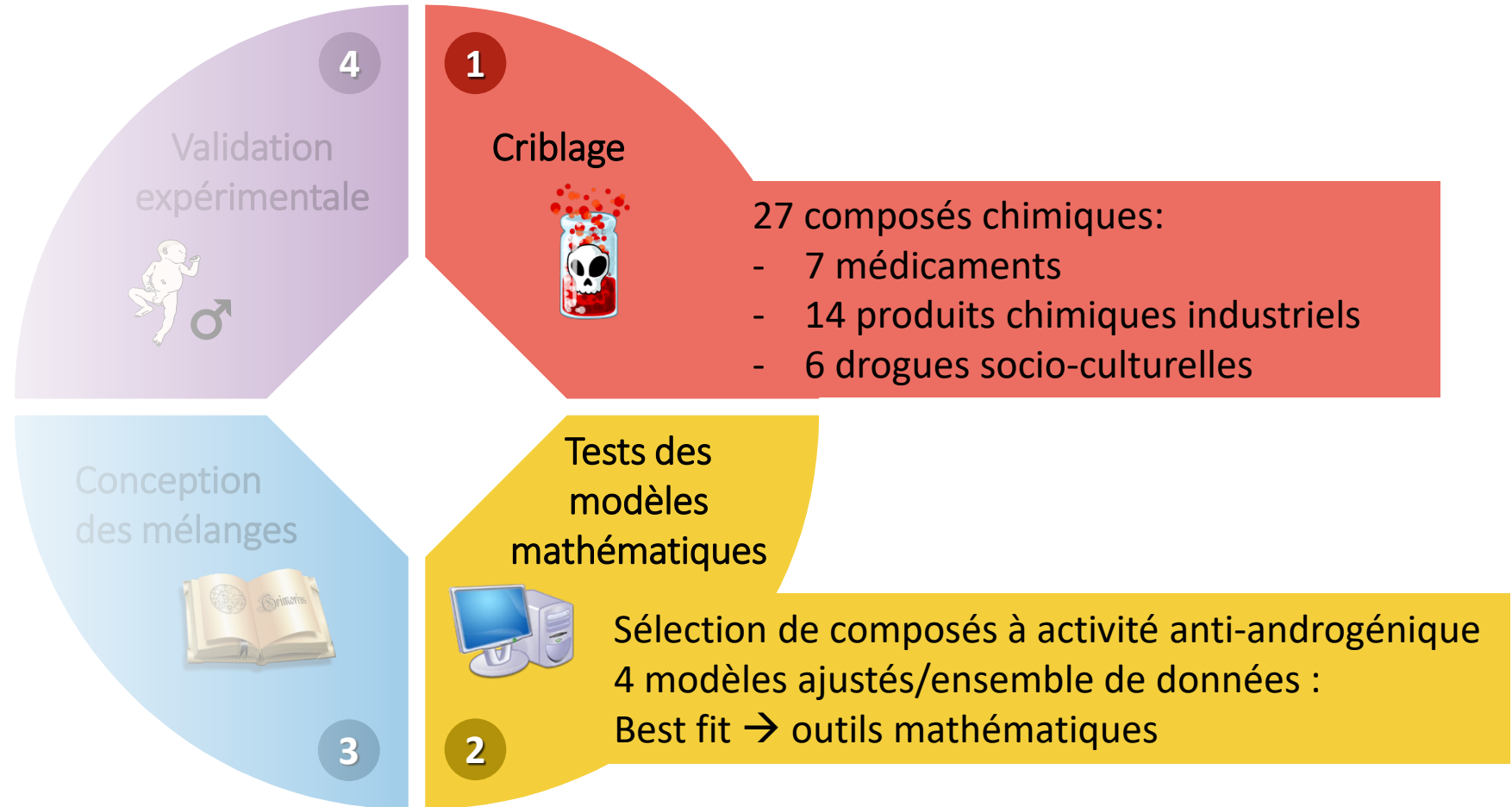


Anti-androgénique complet



*27 composés testés,
3 types de réponses,
11 composés anti-androgéniques*

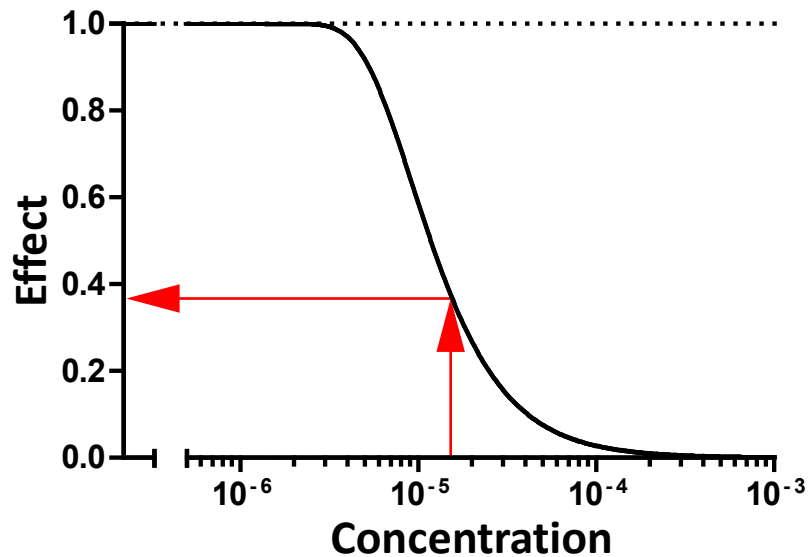
Etape 2



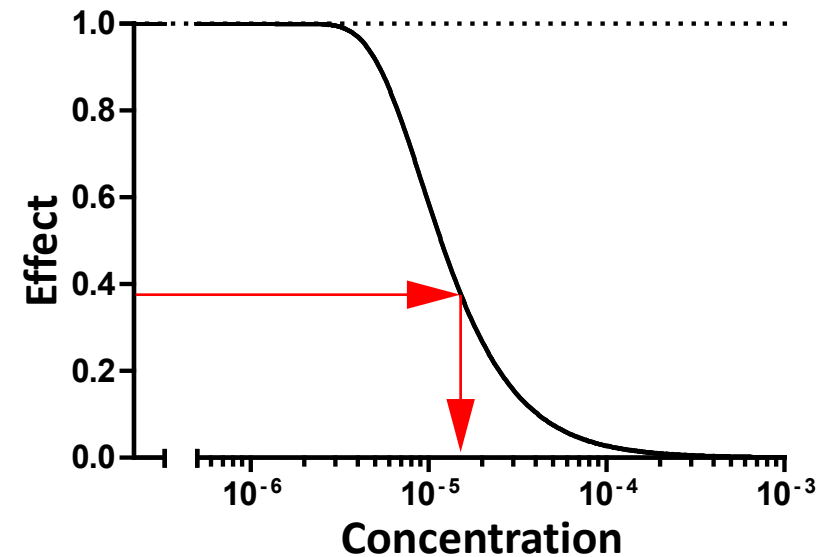
Etape 2: Modélisation mathématique pour chaque composé

Quelle concentration x d'un produit chimique produit l'effet $y = f(x)$

L'effet considéré $y = f(x)$ est produit par quelle concentration de x ?

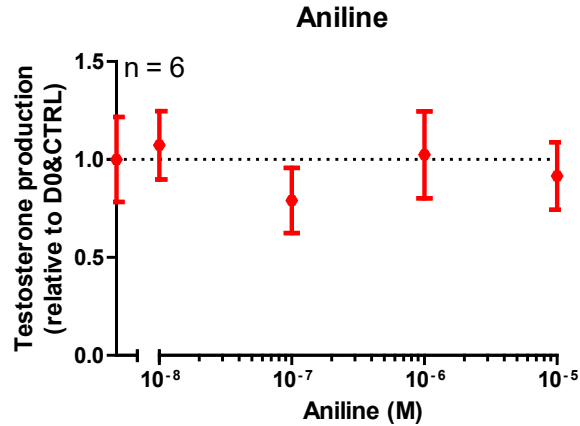


Modélisation

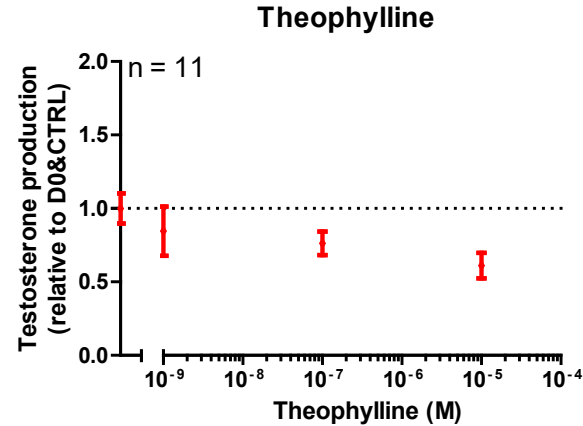


➔ 4 modèles systématiquement testés (Logit, Weibull, Logit généralisé I et II)

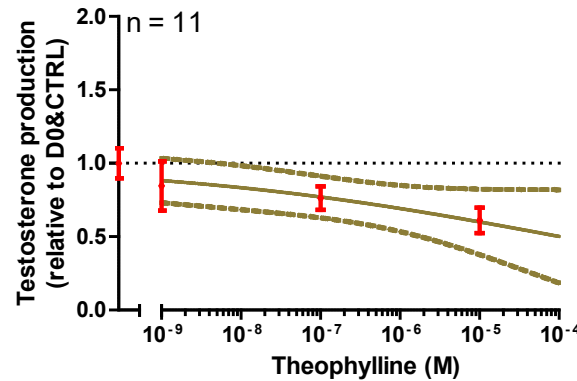
Etape 2: Modélisation mathématique pour chaque composé



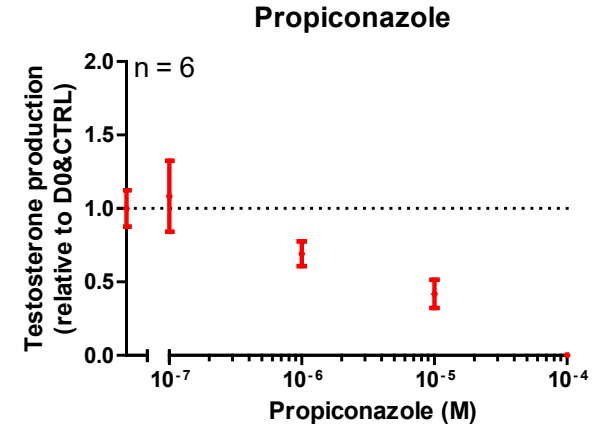
Pas de modèle applicable



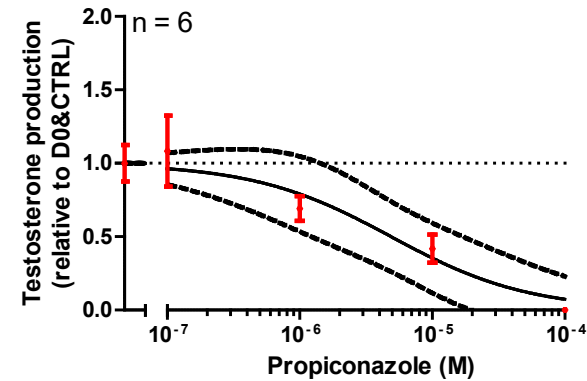
Theophylline



Logit



Propiconazole



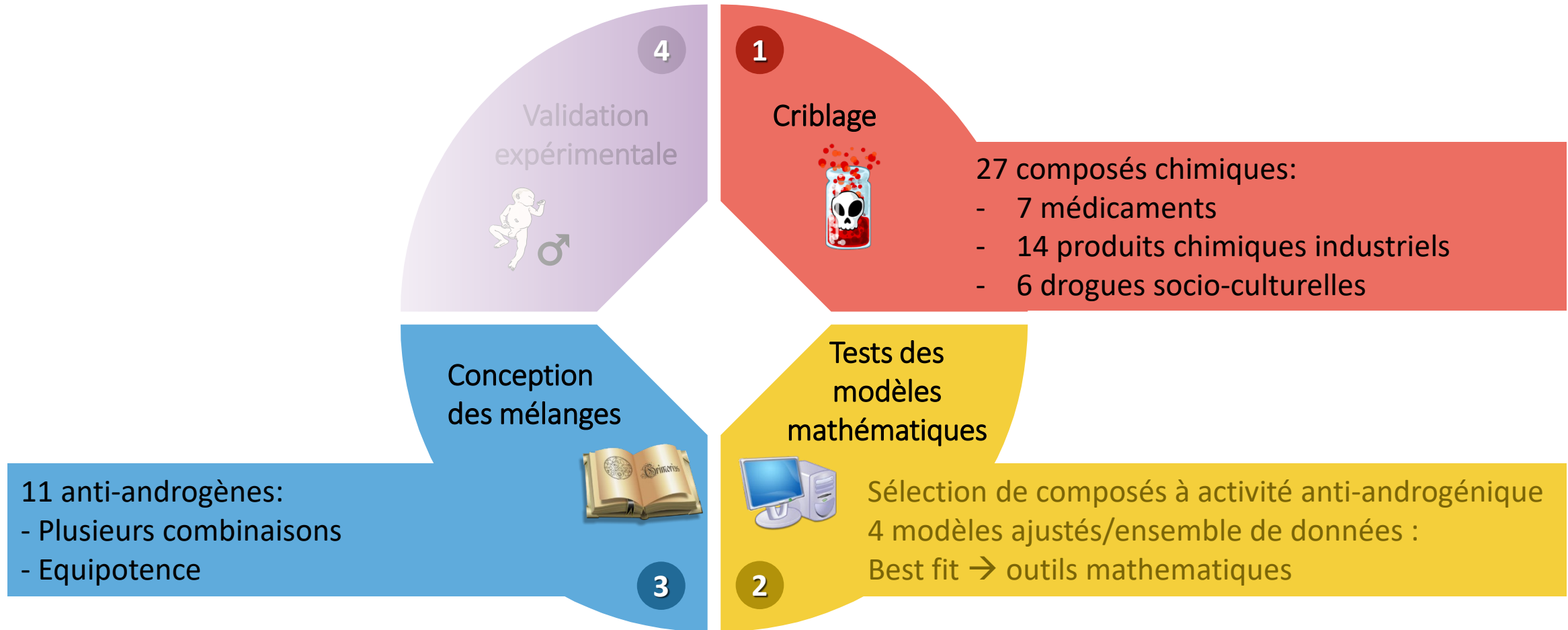
Logit

- Prédiction
- - Intervalles de confiance
- Points expérimentaux

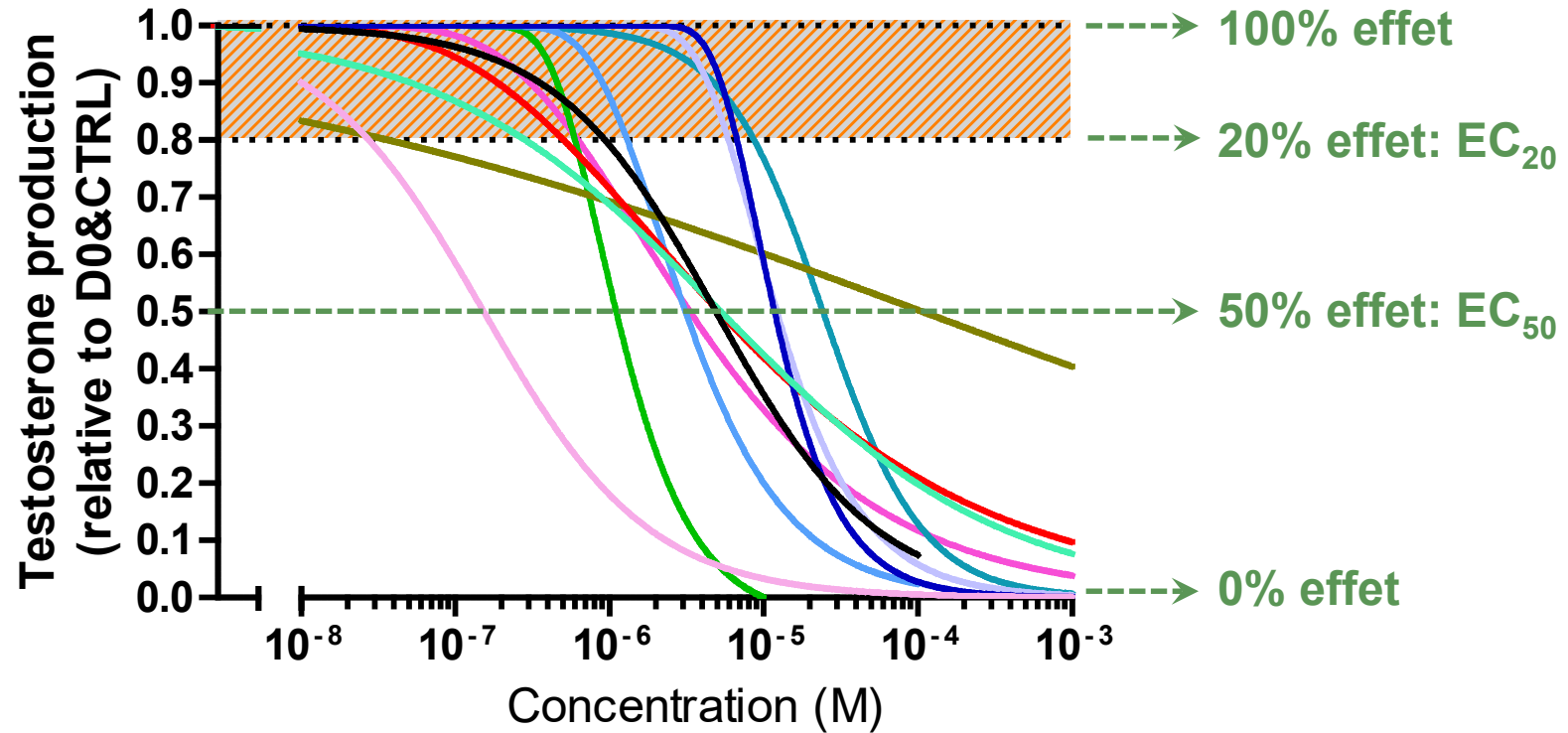
Etape 2: Modélisation mathématique pour chaque composé

Chemical	Modèle			Mixture composition and fraction of individual compounds			
	Model	EC ₅₀ (M)	Toxicity (M)	Mixture I	Mixture II	Mixture III	Mixture IV
Ketoconazole	Weibull	9.97 x 10 ⁻⁷	10 ⁻⁵	0.20	0.20	0.025	
BPA	Weibull	6.07 x 10 ⁻⁶	>10 ⁻⁵	0.45	0.45	0.053	0.057
Valproic acid	Weibull	4.71 x 10 ⁻⁶	>10 ⁻⁵	0.16	0.30	0.021	
Clomiphene	Logit	5.72 x 10 ⁻⁶	>10 ⁻⁵	0.19		0.026	
Theophylline	Logit	5.04 x 10 ⁻⁵	10 ⁻⁵		0.05	0.002	2.21x10 ⁻⁵
BPS	Weibull	1.72 x 10 ⁻⁵	10 ⁻⁴			0.355	0.302
Chlordecone	Logit	1.66 x 10 ⁻⁵	10 ⁻⁴			0.243	0.277
Imazalil	Logit	9.19 x 10 ⁻⁶	10 ⁻⁴			0.275	0.337
Bitertanol	Logit	1.30 x 10 ⁻⁵	10 ⁻⁵				0.003
Prochloraz	Logit	2.23 x 10 ⁻⁷	10 ⁻⁵				0.001
Propiconazole	Logit	5.18 x 10 ⁻⁶	10 ⁻⁵				0.023

Etape 3



Etape 3 : Détermination des EC₅₀ et EC₂₀: Equipotence



Les ratios de composés chimiques dans le mélange ont été déterminés sur le **principe de l'équipotence à l'EC₅₀**.

$$P_i = \frac{ECx_i}{\sum_{i=1}^n ECx_i}$$

Etape 3 : Conception de 4 mélanges

Chemical	Modèle			Mixture composition and fraction of individual compounds			
	Model	EC ₅₀ (M)	Toxicity (M)	Mixture I	Mixture II	Mixture III	Mixture IV
Ketoconazole	Weibull	9.97 x 10 ⁻⁷	10 ⁻⁵	0.20	0.20	0.025	
BPA	Weibull	6.07 x 10 ⁻⁶	>10 ⁻⁵	0.45	0.45	0.053	0.057
Valproic acid	Weibull	4.71 x 10 ⁻⁶	>10 ⁻⁵	0.16	0.30	0.021	
Clomiphene	Logit	5.72 x 10 ⁻⁶	>10 ⁻⁵	0.19		0.026	
Theophylline	Logit	5.04 x 10 ⁻⁵	10 ⁻⁵		0.05	0.002	2.21x10 ⁻⁵
BPS	Weibull	1.72 x 10 ⁻⁵	10 ⁻⁴			0.355	0.302
Chlordecone	Logit	1.66 x 10 ⁻⁵	10 ⁻⁴			0.243	0.277
Imazalil	Logit	9.19 x 10 ⁻⁶	10 ⁻⁴			0.275	0.337
Bitertanol	Logit	1.30 x 10 ⁻⁵	10 ⁻⁵				0.003
Prochloraz	Logit	2.23 x 10 ⁻⁷	10 ⁻⁵				0.001
Propiconazole	Logit	5.18 x 10 ⁻⁶	10 ⁻⁵				0.023

Mixture I : ketoconazole, BPA, valproic acid, clomiphene

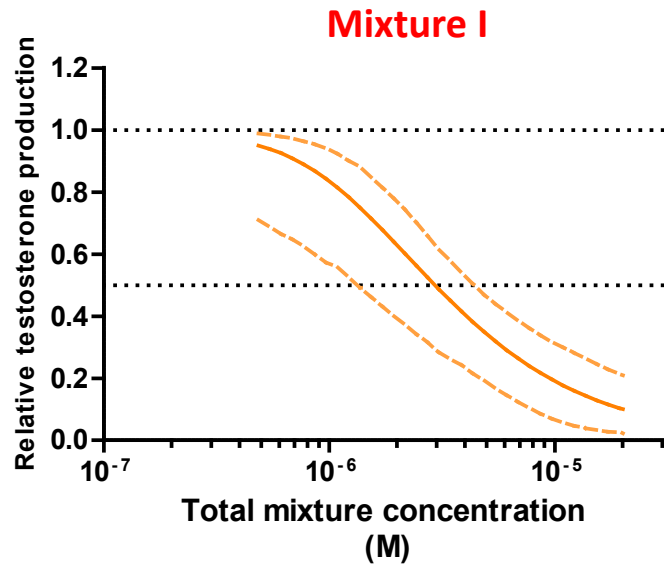
Mixture II : ketoconazole, BPA, valproic acid, theophylline

Mixture III : ketoconazole, BPA, valproic acid, clomiphene, theophylline, BPS, chlordecone, imazalil

Mixture IV : BPA, theophylline, BPS, chlordecone, imazalil, bitertanol, prochloraz, propiconazole

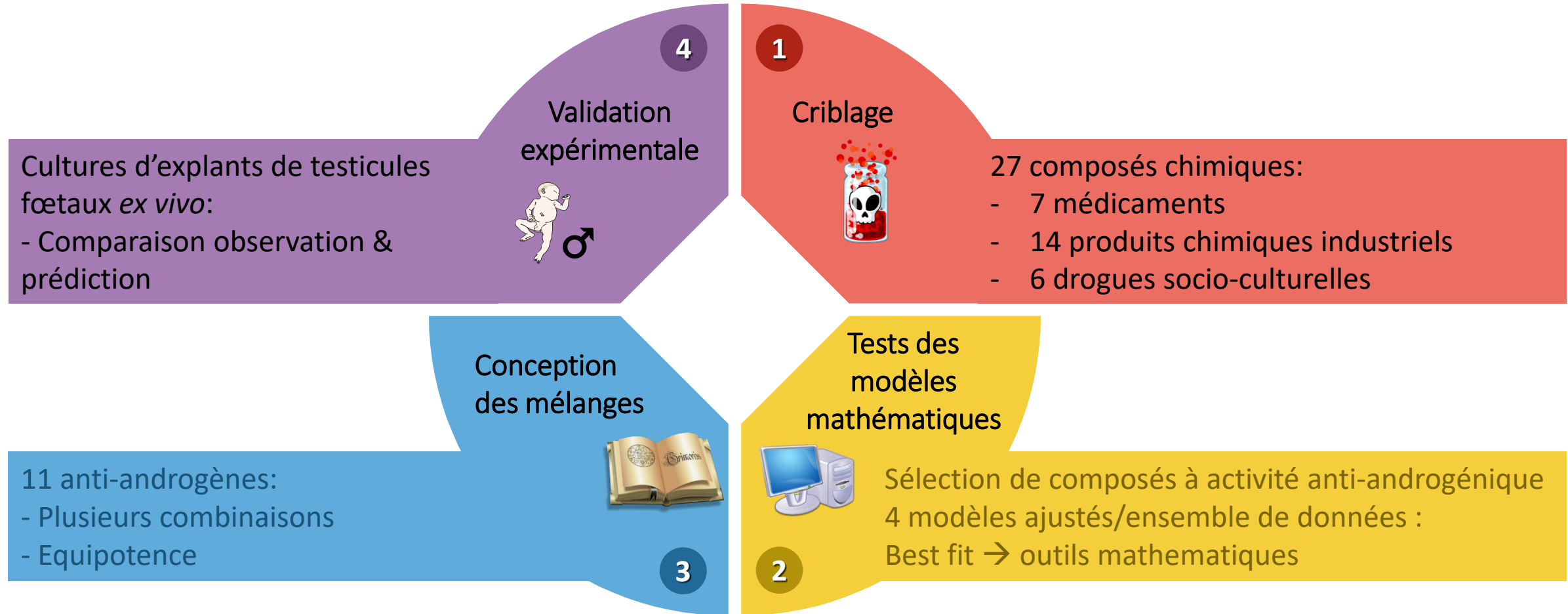
Etape 3 : Prédiction des effets des mélanges (Additivité)

4 component mixtures



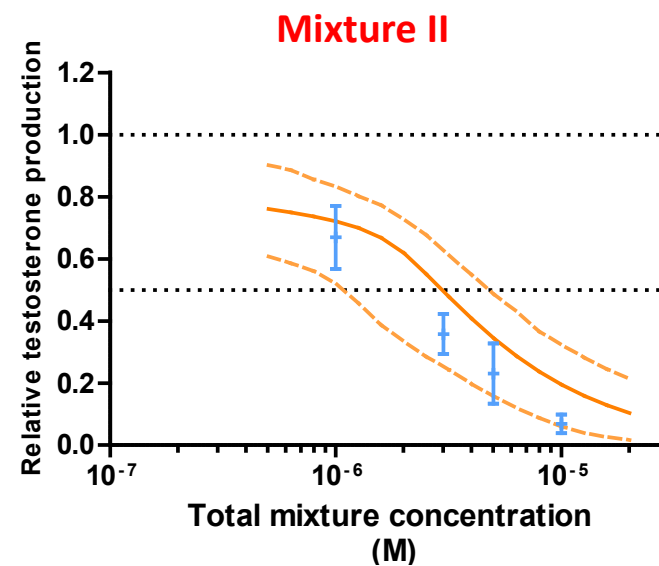
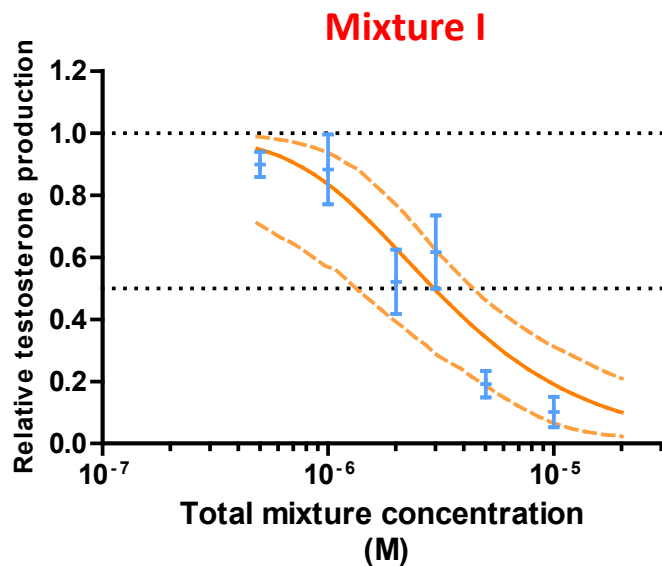
Pour chaque mélange, calcul des courbes concentration-réponse selon le principe d'additivité des concentrations

Etape 4



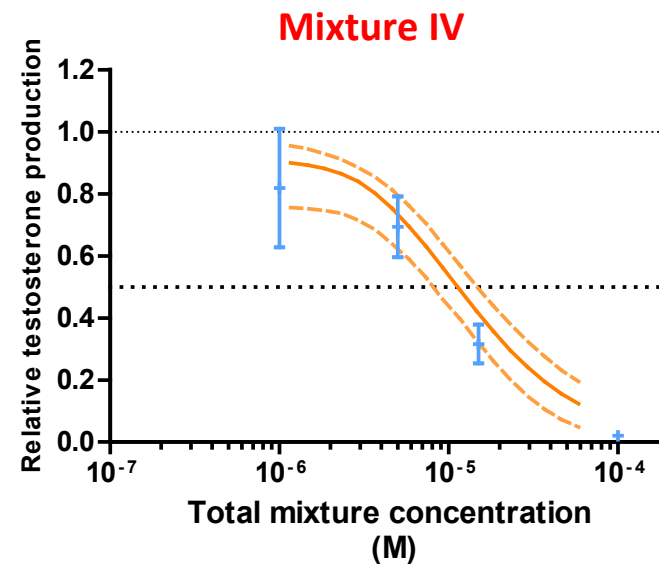
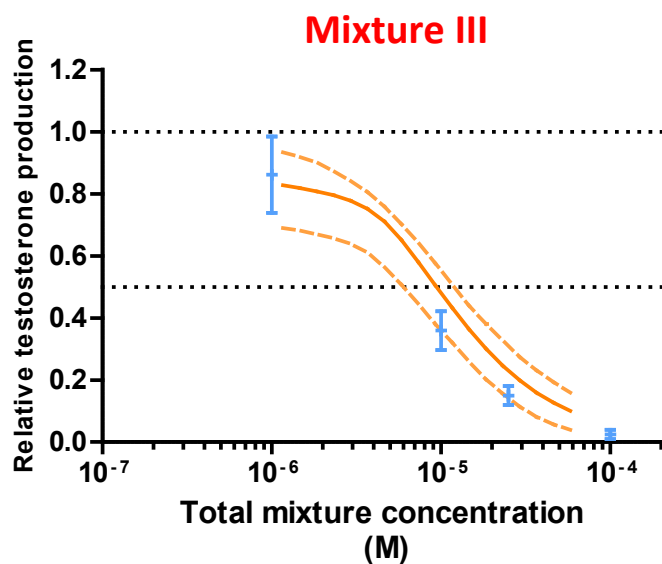
Etape 4: Comparaison prédiction / expérimentation des effets des mélanges

4 component mixtures



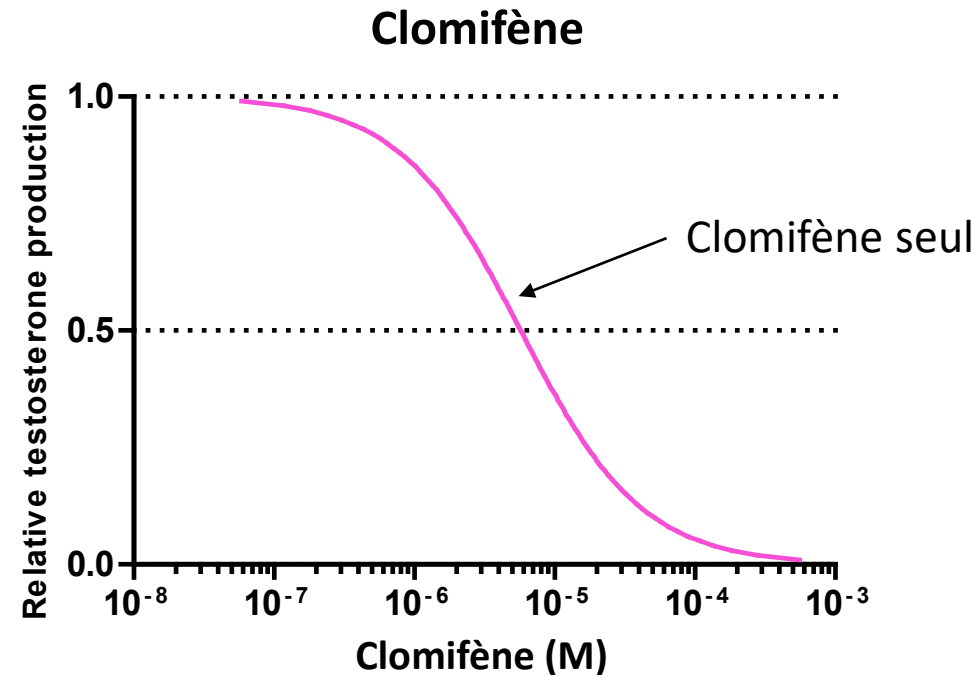
- Prédiction selon le modèle de concentration addition
- - - Intervalles de confiance
- Niveaux de testostérone observés après exposition au mélange

8 component mixtures



Etape 4: *something from nothing* ?

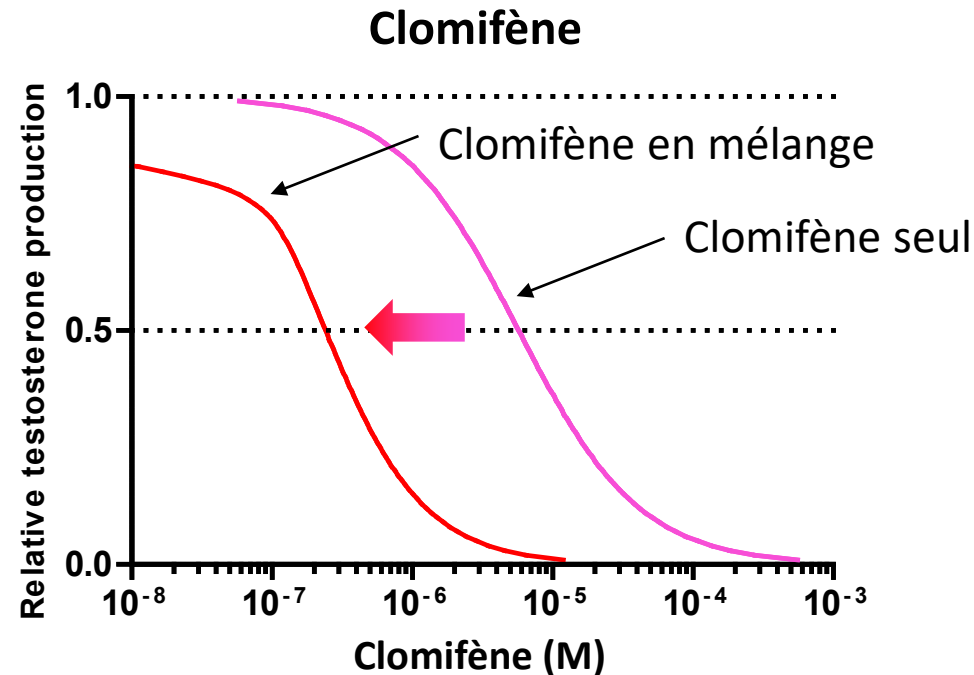
Question : Quelle est la concentration de clomifène en mélange nécessaire pour produire le même effet Y que le clomifène seul ?



- Proportion de clomifène dans le mélange : 0.026
- La concentration [Mix] de mélange produit un effet Y

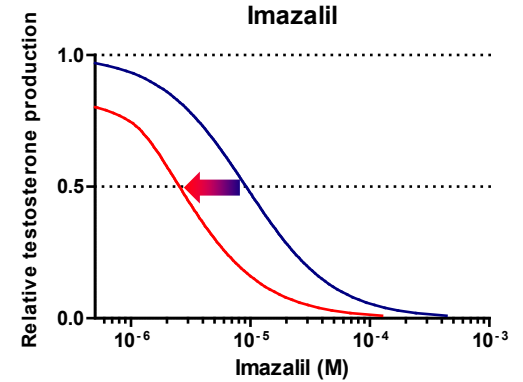
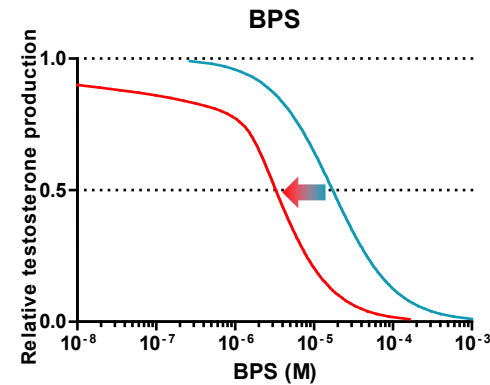
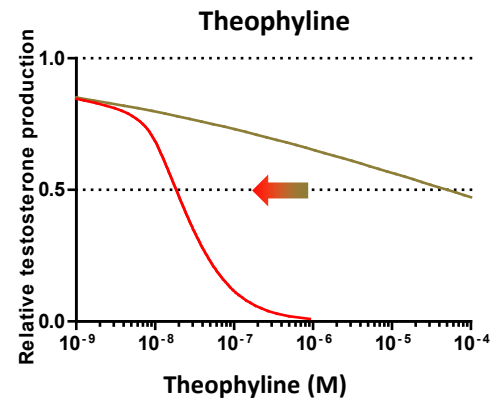
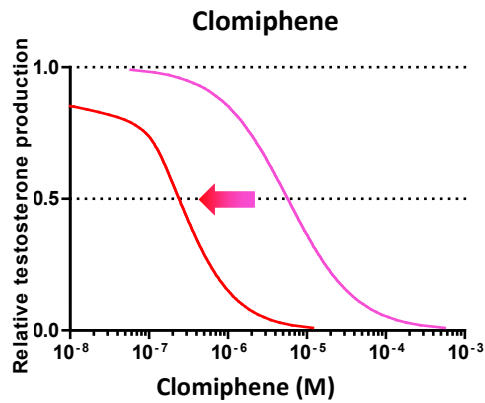
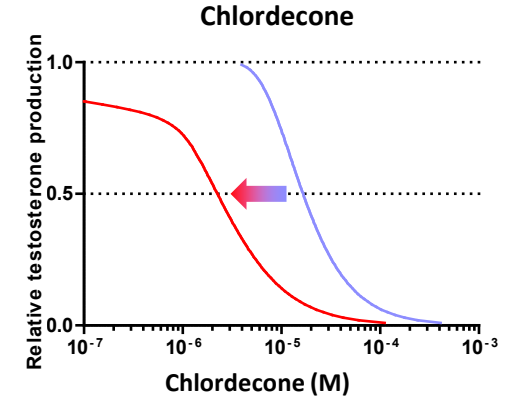
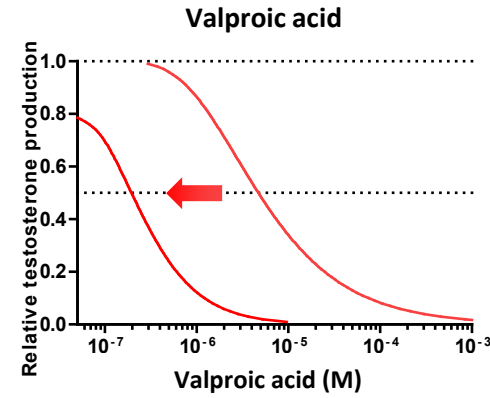
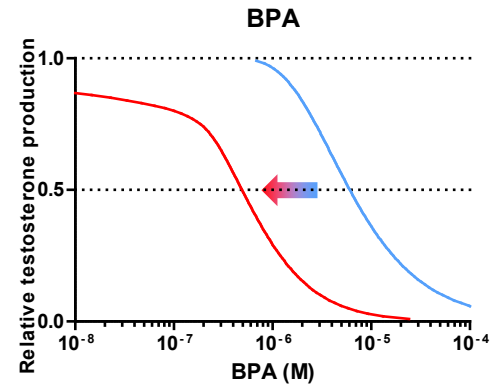
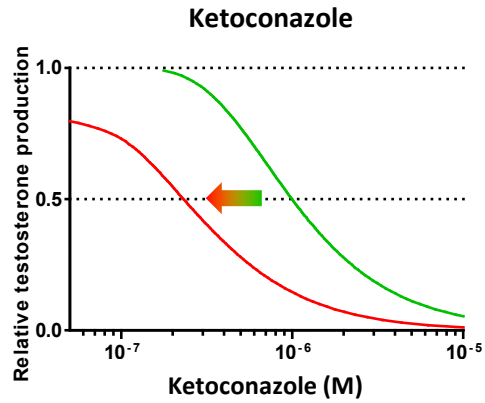
Etape 4: Conséquences

Question : Quelle est la concentration de clomifène en mélange nécessaire pour produire le même effet Y que le clomifène seul ?

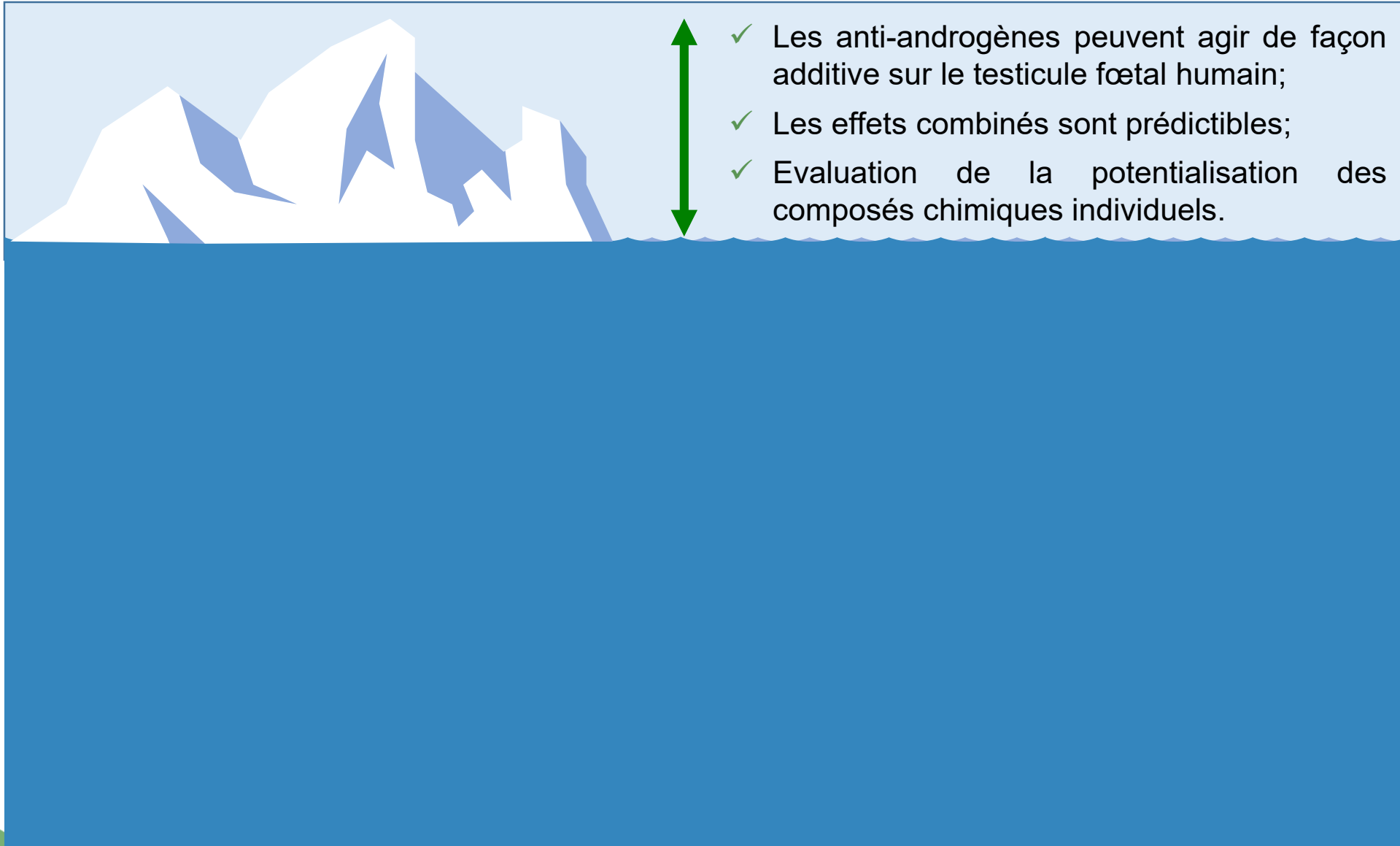


- Proportion de clomifène dans le mélange : 0.026
 - La concentration [Mix] de mélange produit un effet Y
- ⇒ La concentration [Clom] de clomifène nécessaire pour produire l'effet Y en mélange: $[Clom] = 0.026 \times [Mix]$

Etape 4: Conséquences

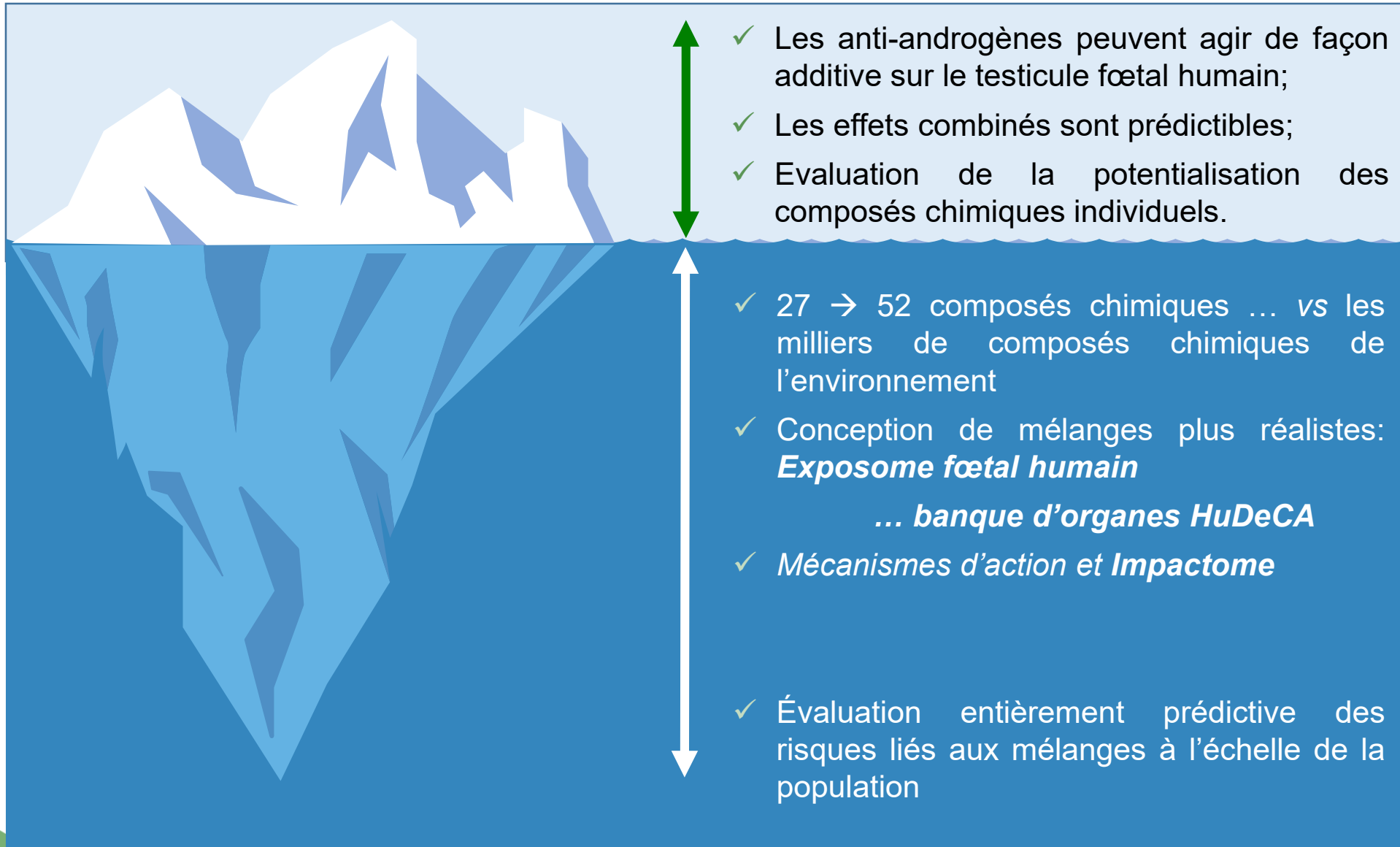


Conclusions



- ✓ Les anti-androgènes peuvent agir de façon additive sur le testicule foetal humain;
- ✓ Les effets combinés sont prédictibles;
- ✓ Evaluation de la potentialisation des composés chimiques individuels.

Conclusions



Endocrine Disruption in Human Fetal Testis Explants by Individual and Combined Exposures to Selected Pharmaceuticals, Pesticides, and Environmental Pollutants

Pierre Gaudriault,^{1,2} Séverine Mazaud-Guittot,^{1,2} Vincent Lavoué,³ Isabelle Coiffec,^{1,2} Laurianne Lesné,^{1,2} Nathalie Dejuccq-Rainsford,^{1,2} Martin Scholze,⁴ Andreas Kortenkamp,⁴ and Bernard Jégou^{1,2,5}



Pierre Gaudriault

Isabelle Coiffec-Dorval
Christèle Desdoits-Lethimonier
Laurianne Lesné
Nathalie Dejuccq-Rainsford
Bernard Jégou



Dr. Vincent Lavoué
Infirmières, sages-
femmes du centre

*Les femmes qui ont donné
leur consentement.*

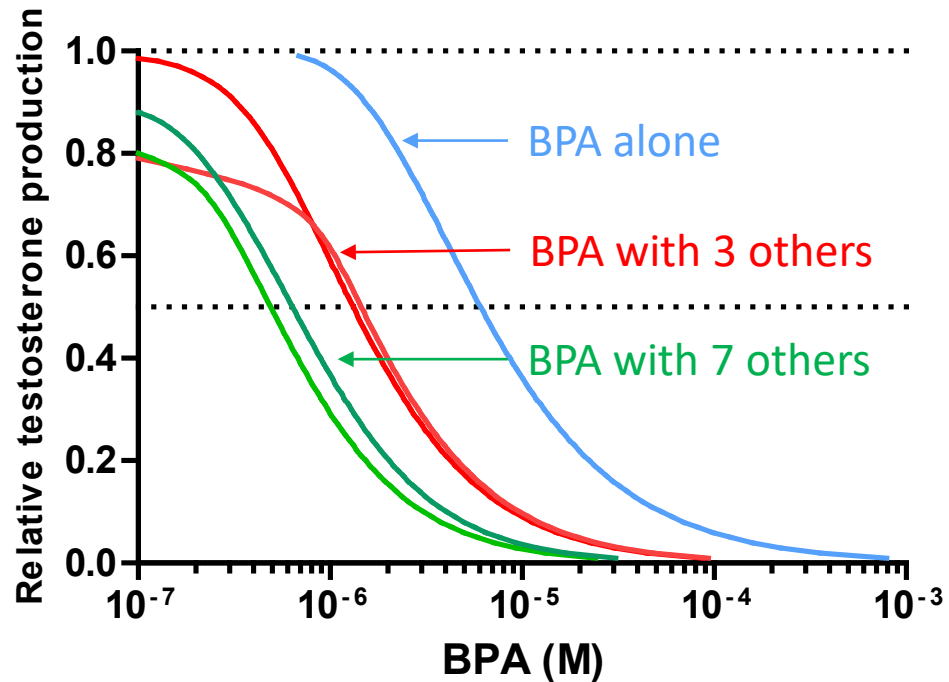


Andreas Kortenkamp
Martin Scholze



Etape 4: Conséquences

Question : Est-ce un phénomène général (variation du nombre de composés et de la composition d'un mélange) ?



	Condition	EC ₅₀ (M)
Alone	BPA alone	6.07 x 10 ⁻⁶
4 component mixtures	BPA in Mix I	1.32 x 10 ⁻⁶
	BPA in Mix II	1.45 x 10 ⁻⁶
8 component mixtures	BPA in Mix III	4.91 x 10 ⁻⁷
	BPA in Mix IV	6.37 x 10 ⁻⁷

- Potentialisation by factor 10 when co-exposed to 7 other chemical
→ Same concentration produces greater effect

Etape 3 : Détermination des EC₅₀ et EC₂₀

		Modèle		Mixture composition and fraction of individual compounds			
Chemical	Model	EC ₅₀ (M)	Toxicity (M)	Mixture I	Mixture II	Mixture III	Mixture IV
Ketoconazole	Weibull	9.97 x 10 ⁻⁷	10 ⁻⁵	0.20	0.20	0.025	
BPA	Weibull	6.07 x 10 ⁻⁶	>10 ⁻⁵	0.45	0.45	0.053	0.057
Valproic acid	Weibull	4.71 x 10 ⁻⁶	>10 ⁻⁵	0.16	0.30	0.021	
Clomiphene	Logit	5.72 x 10 ⁻⁶	>10 ⁻⁵	0.19		0.026	
Theophylline	Logit	5.04 x 10 ⁻⁵	10 ⁻⁵		0.05	0.002	2.21x10 ⁻⁵
BPS	Weibull	1.72 x 10 ⁻⁵	10 ⁻⁴			0.355	0.302
Chlordecone	Logit	1.66 x 10 ⁻⁵	10 ⁻⁴			0.243	0.277
Imazalil	Logit	9.19 x 10 ⁻⁶	10 ⁻⁴			0.275	0.337
Bitertanol	Logit	1.30 x 10 ⁻⁵	10 ⁻⁵				0.003
Prochloraz	Logit	2.23 x 10 ⁻⁷	10 ⁻⁵				0.001
Propiconazole	Logit	5.18 x 10 ⁻⁶	10 ⁻⁵				0.023



prochloraz > ketoconazole > valproic acid > propiconazole > clomiphene > BPA > imazalil > bitertanol > chlordecone > BPS > theophylline

Modélisation mathématique pour chaque composé

Model	Function	Inverse ^a
Logit	$f(x) = \frac{1}{(1 + \exp[-\eta])}$	$x = \text{POW}\left(\frac{\log_e(K) - \hat{\beta}_1}{\hat{\beta}_2}\right)$ with $K = \left(\frac{Y}{1 - Y}\right)$
Weibull	$f(x) = 1 - \exp(-\exp[\eta])$	$x = \text{POW}\left(\frac{\log_e(K) - \hat{\beta}_1}{\hat{\beta}_2}\right)$ with $K = -\log_e(1 - Y)$
Generalized Logit I	$f(x) = \frac{1}{(1 + \exp[-\eta])^{\beta_3}}$	$x = \text{POW}\left(\frac{-\log_e(K) - \hat{\beta}_1}{\hat{\beta}_2}\right)$ with $K = \left(\frac{1}{Y}\right)^{1/\beta_3} - 1$
Generalized Logit II	$f(x) = 1 - \frac{1}{(1 + \exp[\eta])^{\beta_3}}$	$x = \text{POW}\left(\frac{\log_e(K) - \hat{\beta}_1}{\hat{\beta}_2}\right)$ with $K = \left(\frac{1}{1 - Y}\right)^{1/\beta_3} - 1$