PNRPE

PROGRAMME NATIONAL DE RECHERCHE SUR LES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS

Séminaire

Présentation des Projets

APR2013

LIVRET DU PARTICIPANT

19 septembre 2014

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

Ministère de l'Écologie, du Développement durable et de l'Énergie

anses
agence nationale de sécurité sanitaire alimentation, environnement, travail

PROGRAMME

8H30 - *Accueil.*

9H15	**Introduction.** ***Philippe COURTIER***. Chef de Service. DRI, CGDD, MEDDE
9h30	**MULTIPEST-** Caractérisation des multi-expositions environnementales aux pesticides chez la femme enceinte. ***Nathalie BONVALLOT***
9h50	**PLAYLIST-** Propriétés et affinité de ligands de récepteurs susceptibles de fixer des perturbateurs endocriniens chez *Lymnaea stagnalis* (Mollusque, Gastéropode). ***Laurent LAGADIC***
10h10	**THYDIS-**Mélanges de perturbateurs thyroïdiens: effets sur le développement neuronal embryonnaire. ***Barbara DEMENEIX***
10h30	**BPADia-** Etude de la relation entre l'exposition au bisphénol A et le risque de développer un diabète de type 2 ou une obésité dans la cohorte prospective D.E.S.I.R. ***Jérémie BOTTON***
10h50	**GONABIS-** Effets du Bisphénol A et de ses substituts sur le développement des gonades. ***Gabriel LIVERA***
11h10	**BPActions-** Effets du BPA et de ses substituts sur le testicule fœtal humain et spécificités liées à l'espèce. ***Bernard JEGOU***
11h30	**ADIPOTOX-** Interaction des substituts du bisphénol A avec la physiologie des adipocytes humains. ***Odile POULAIN-GODEFROY***
11h50	**X-SLIMs-** Criblage de perturbateurs endocriniens des récepteurs nucléaires des oxysterols LXRs. ***Jean-Marc LOBACCARO***
12h10 – 13h	**Discussion générale**

PNRPE

PROGRAMME NATIONAL DE RECHERCHE SUR LES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS

Résumés

MULTIPEST (janvier 2014 et octobre 2016)

Characterization of environmental multiple exposure to pesticides in pregnant women

Caractérisation des multi-expositions environnementales aux pesticides chez la femme enceinte

Nathalie BONVALLOT[1] ; Cécile CHEVRIER[2] ; Sylvaine CORDIER[2] ; Jean-Pierre CRAVEDI[3] ; Laurent DEBRAUWER[3] ; Emilien JAMIN[3] ; Barbara LE BOT[1] ; Jean-François MARTIN[3] ; Fabien MERCIER[1] ; Marie TREMBLAY-FRANCO[3].

1-EHESP, INSERM IRSET, Rennes ; 2-INSERM IRSET, Université Rennes 1, Rennes ; 3-INRA Toxalim, Toulouse. Contact : nathalie.bonvallot@ehesp.fr

Introduction

La région Bretagne est la première région agricole française, avec près de 70 % de surfaces dédiées à l'agriculture. L'utilisation de pesticides engendre des contaminations des différents compartiments de l'environnement, par les substances mères ou leurs produits de transformation, pouvant conduire à une exposition de l'homme. Parmi les pesticides utilisés, de nombreuses molécules sont suspectées d'être des perturbateurs endocriniens. Même si les résultats d'études concernant les effets liés aux expositions environnementales à faibles doses des pesticides restent controversés, une exposition à un âge précoce de la vie pourrait entrainer des effets sur les systèmes reproducteur ou neurologique en développement et conduire à des effets à long terme.

Différentes études réalisées sur le continent américain (Californie, Chili) ont montré que les usages agricoles de pesticides pouvaient induire une exposition des populations riveraines. A notre connaissance, très peu de données sont disponibles à l'heure actuelle en France. Disposer d'outils permettant de caractériser l'exposition aux pesticides à proximité des activités agricoles constituerait donc une plus-value pour développer des programmes de surveillance des expositions et le cas échéant mettre en œuvre les moyens de réduction des expositions adaptés.

Ce travail s'appuie sur la cohorte mères-enfants PELAGIE dans laquelle des modifications de marqueurs métaboliques ont été associées à la proximité résidentielle des femmes enceintes à certaines activités agricoles (Bonvallot et al. 2013, PlosOne).

Objectifs

Le projet vise à développer une nouvelle stratégie de mesure de l'exposition complexe aux pesticides chez les femmes enceintes de la cohorte PELAGIE pour caractériser leurs

expositions environnementales, et à terme identifier les modifications métaboliques en lien avec ces expositions.

Méthodologie à mettre en œuvre

Les pesticides ou métabolites seront identifiés à l'aide d'une méthode non ciblée à partir de profils métaboliques urinaires de femmes enceintes provenant de la cohorte PELAGIE, Bretagne, France. Les analyses seront réalisées par chromatographie en phase liquide à ultra-haute performance (UHPLC) couplée à la spectrométrie de masse à haute résolution (HRMS). Les molécules seront également quantifiées par UHPLC-MS/MS à l'aide d'une approche multi-résidus, après hydrolyse enzymatique suivie d'une étape d'extraction sur phase solide en ligne. Des méthodes d'analyses statistiques multivariées (analyses en composantes principales (ACP), régression Partial Least Square (PLS)) seront mises en œuvre pour discriminer les groupes de population à partir de la caractérisation de leur exposition.

Retombés Attendues

L'approche non-ciblée d'analyse HRMS est une méthode globale permettant de détecter et identifier des métabolites non recherchés en première intention. Cette approche permet en plus d'interroger les données *a posteriori* pour rechercher d'éventuels métabolites supplémentaires sans recourir à une nouvelle analyse. La mise en œuvre de cette méthode permettra de mieux cibler les pesticides qui contribuent à l'exposition environnementale à proximité des activités agricoles.

De plus, l'association de cette approche à une technique de mesure multi-résidus et la comparaison à l'analyse métabolomique déjà réalisée devrait conduire à l'identification de groupes de pesticides contribuant à des effets sur l'organisme humain. Dans ce contexte, les principaux résultats attendus sont :

- Des données originales françaises d'exposition aux pesticides de femmes enceintes résidant à proximité de cultures ;
- La confirmation ou non de l'hypothèse d'un lien entre proximité résidentielle aux cultures et exposition aux pesticides en Bretagne, France ;
- L'identification des substances les plus contributrices à l'exposition de proximité ;
- L'interprétation des modifications métaboliques en lien avec ces expositions.

A ce jour, les programmes de biosurveillance reposent sur la mesure de quelques familles de pesticides majoritaires, comme par exemple les organophosphorés. L'intérêt du présent projet pour le décisionnaire est de pouvoir disposer de techniques d'analyse

novatrices permettant de mesurer dans des matrices biologiques des pesticides ou leurs métabolites habituellement peu pris en compte, ce qui permettrait à terme d'adapter les programmes de biosurveillance aux molécules auxquelles la population est réellement exposée.

PLAYLIST (novembre 2013 - novembre 2016)

Properties and ligand affinity of endocrine disruptor-binding receptors in *Lymnaea stagnalis* (Mollusc, Gastropod)

Propriétés et affinité de ligands de récepteurs susceptibles de fixer des perturbateurs endocriniens chez *Lymnaea stagnalis* (Mollusque, Gastéropode)

Laurent LAGADIC[1] ; Patrick BALAGUER[2] ; William BOURGUET[3] ; Marie-Agnès COUTELLEC[1]

1-INRA UMR0985 AgroCampus Ouest, Rennes ; 2- Inserm U896 - Université Montpellier1 - Institut Régional du Cancer, Montpellier ; 3- Inserm UMR1054 – CNRS UMR 5048- Université Montpellier1, Montpellier. Contact : Laurent.Lagadic@rennes.inra.fr

Introduction

Le gastéropode aquatique *Lymnaea stagnalis* a été retenu pour le développement de Lignes Directrices de l'OCDE pour des tests de reprotoxicité sur mollusque aquatique. Aucun protocole de ce type n'est encore actuellement disponible. Il s'agit de tests *in vivo* sur cycle de vie partiel ou complet qui se positionnent respectivement aux niveaux 4 et 5 du Cadre Conceptuel de l'OCDE pour les tests et l'évaluation des perturbateurs endocriniens. Le développement de ces protocoles de test a été pris en charge par un groupe d'experts européens dans lequel l'INRA coordonne plus spécifiquement tous les travaux portant sur la lymnée. Le projet de Ligne Directrice sur cycle de vie partiel devrait pouvoir être soumis à l'OCDE à la fin de l'année 2014. Ce test *in vivo* repose essentiellement sur des mesures de traits de vie caractérisant la reproduction, notamment fécondité et fertilité. Ces critères peuvent varier sous l'effet de perturbateurs endocriniens mais ils peuvent aussi réagir à des composés agissant sur la reproduction par d'autres modes d'action. Il est donc indispensable d'associer ce test de niveau 4 avec des tests permettant d'identifier le(s) mécanisme(s) qui sous-tende(nt) les effets *in vivo*.

Objectifs

L'objectif du programme PLAYLYST est précisément de développer des méthodes *in silico* (niveau 1) et *in vitro* (niveau 2) permettant d'identifier sans équivoque le caractère perturbateur endocrinien de composés qui s'avèreraient positifs dans le test de reprotoxicité de niveau 4 et, par la suite, de niveau 5 lorsque le test sur cycle de vie complet sera disponible.

Méthodologies à mettre en œuvre

L'option retenue dans PLAYLYST est d'avoir recours à l'expression des gènes du récepteur aux œstrogènes (ER) et du récepteur au rétinoïde X de la lymnée (respectivement dénommés LymER et LymRXR) dans un système cellulaire rapporteur sur lequel seront testés un certain nombre de perturbateurs endocriniens parmi lesquels se trouvent l'éthynylestradiol, le bisphenol A (et certains de ses substituts) et différents types de pesticides. Du point de vue méthodologique, PLAYLYST se décomposera en plusieurs étapes consistant successivement à (i) exploiter les ressources génétiques disponibles chez la lymnée et/ou d'autres espèces de mollusques pour obtenir la séquence codante des gènes ER et RXR, (ii) synthétiser des vecteurs d'expression de ces gènes, (iii) tester leur inductibilité par des ligands connus des récepteurs ER et RXR humains par transfection transitoire ou stabilisée. En complément de cette démarche, qui aboutira à un test *in vitro* de niveau 2, les domaines de fixation des ligands sur LymER et LymRXR seront modélisés de façon à tester *in silico* un plus grand nombre de ligands (niveau 1).

Retombés attendues

Les principales retombées du programme PLAYLYST se conçoivent en termes de développement de tests *in silico* et/ou *in vitro* en appui au test *in vivo* disponible chez *Lymnaea stagnalis*. Plus précisément, le test *in vitro* permettra d'identifier, parmi les substances qui seront à l'origine d'effets sur la reproduction, celles dont le mécanisme d'action passe par des récepteurs nucléaires. La nécessité de disposer, pour une même espèce, de tests *in vitro* et *in vivo* est unanimement reconnue par les experts dans le domaine de l'évaluation des perturbateurs endocriniens, notamment au sein de l'OCDE, de l'US EPA ou d'ECETOC. La combinaison de tests *in vitro* et *in vivo* existe pour certains vertébrés ; ce n'est pas encore le cas pour les invertébrés. Le programme PLAYLYST devrait permettre de combler cette lacune.

Indépendamment de ces retombées appliquées, PLAYLYST permettra d'acquérir des connaissances de nature plus fondamentale sur la fonctionnalité des récepteurs ER et RXR chez la lymnée, contribuant ainsi à répondre aux questionnements sur le rôle biologique de ces récepteurs chez les mollusques.

THYDIS (janvier 2014 - décembre 2017)

Thyroid disrupting mixtures and embryonic neurodevelopment

Mélanges de perturbateurs thyroïdiens : effets sur le développement neuronal embryonnaire

Barbara A, DEMENEIX[1], Jean-Baptiste FINI[1], Sébastien LE MEVEL[1], Bilal MUGHAL[1]

1-Evolution des régulations endocriniennes UMR 7221 ; MNHN/ CNRS, Paris.

Contact : demeneix@mnhn.fr

Introduction

La signalisation thyroïdienne agit comme un lien entre notre environnement et l'expression de réseaux de gènes contrôlant le développement embryonnaire du cerveau. Plusieurs données associent l'exposition aux mélanges de perturbateurs thyroïdiens au risque de pathologies neuro-développementales comme les troubles du spectre autistique. Le criblage de mélanges chimiques, pouvant modifier les interactions gène/environnement, devient donc urgent. Ces mélanges peuvent contribuer significativement à l'augmentation exponentielle des troubles neuro-développementaux qui engendrent des coûts socio-économiques énormes pour nos sociétés.

Ce projet très ciblé utilisera des modèles embryonnaires d'amphibien et de souris. Le premier sera utilisé pour un criblage rapide des effets perturbateurs thyroïdiens de mixtures décrites chez la femme enceinte. En plus de la conservation de la signalisation thyroïdienne et du développement cérébral au cours de l'évolution, il existe des fenêtres critiques de prolifération, migration ou différenciation cellulaires permettant un développement cérébral normal.

Après avoir défini des doses minimales et des fenêtres critiques d'exposition, le modèle souris sera utilisé pour des études phénotypiques et génomiques. Les mixtures seront testées sur un nombre restreint de souris gestantes.

Les résultats de ce projet permettront d'accroitre la connaissance sur les substances chimiques affectant la signalisation thyroïdienne et les réseaux de gènes impliqués dans le développement cérébral.

En outre, le gène cibles validés par qPCR pourront être utilisés pour générer des modèles mutants pour tester de nouvelles hypothèses sur les interactions gène/environnement potentiellement à l'origine de troubles du développement neurologique.

Objectifs

L'objectif global de ce projet est de tester l'hypothèse selon laquelle il existe un lien direct entre l'exposition embryonnaire à des cocktails chimiques perturbateurs thyroïdiens et les troubles neurodéveloppementaux tels que les troubles du spectre autistique (TSA).

Le premier objectif de ce projet est d'étudier le potentiel perturbateur thyroïdien d'une quinzaine de molécules chimiques retrouvées dans les fluides de femmes enceintes (sang, liquide amniotique…). Nous évaluerons leurs effets seuls ou en mixture.

La deuxième question à résoudre est de savoir comment l'exposition à des cocktails de produits chimiques au cours du développement précoce affecte, dans le tissu cérébral, l'expression des gènes de signalisation de la thyroïde et du développement du système nerveux.

Méthodologie à mettre en œuvre

Le travail est divisé en trois tâches sur trois ans :

• Tâche 1: Évaluation des effets d'un mélange chimique établit à partir des données épidémiologiques recueillies auprès des femmes enceintes sur le xénope. Deux mesures seront utilisées, l'expression du gène rapporteur GFP dans la larve de xénope pour évaluer le potentiel des substances seules ou en mixture, puis l'expression de gènes endogènes impliqués dans la signalisation thyroïdienne et /ou le développement neuronal.
• Tâche 2: Caractérisation de la fenêtre critique de l'exposition sur l'embryon de xénope.
• Tâche 3: Un protocole d'exposition sur le modèle de la souris gravide sera établi. Par RNAseq sur les cortex et cervelets des nouveau-nés, nous établirons une cartographie des gènes affectés suite à une exposition *in utero*

Retombés Attendues

Les principaux résultats découlant de ce travail devraient constituer la base d'articles scientifiques à fort impact et générer des connaissances utiles aux organismes de réglementation et décision. L'exposition de deux modèles différents et complémentaires, à un mélange de produits chimiques, avant la formation de la glande thyroïde est une approche complètement nouvelle. Elle fournira des informations utiles pour les questions de santé publique car plusieurs données démontrent que cette période représente une fenêtre de vulnérabilité très sensible pour le développement neuronal. Ceci est particulièrement important car les défauts de développement neurologique représentent des défis sociétaux et économiques majeurs. Par exemple, les troubles du spectre autistique (TSA ou ASD Autism spectrum disorders) augmentent de manière exponentielle et inexpliquée depuis une vingtaine d'années.

Ce projet apportera une contribution importante à la recherche sur les perturbateurs endocriniens et, par son approche analysant des interactions entre gènes et environnement, ouvrira le champ de nouvelles recherches visant à analyser le rôle de gènes dont l'expression est dérégulée après l'exposition aux mélanges chimiques. Ce projet fera la lumière sur l'étiologie et permettra d'informer sur la prévention des risques. Cela aidera les politiciens et les décideurs à avoir une vision plus précise et juste de l'impact d'une exposition précoce à des produits chimiques de l'environnement, ce qui est absolument nécessaire à une bonne évaluation des risques.

BPADia (janvier 2014 – décembre 2015)

Exposure to bisphenol A and the risk of obesity and type 2 diabetes in the French prospective cohort study D.E.S.I.R

Exposition au bisphénol A et risque d'obésité et de diabète de type 2 dans l'étude de cohorte prospective française D.E.S.I.R.

Fanny RANCIERE[1]**;** Beverley BALKAU[1;] **Jérémie BOTTON**[1]

1- Inserm UMR-S 1018, Univ Paris Sud, Villejuif.

Contact : jeremie.botton@inserm.fr

Introduction

La forte augmentation de la prévalence du diabète de type 2 (DT2) et de l'obésité au cours des dernières décennies n'est pas entièrement expliquée par l'augmentation de la sédentarité et une mauvaise alimentation. Un rôle des contaminants environnementaux est de plus en plus suggéré, particulièrement des perturbateurs endocriniens comme le bisphénol A (BPA). Le BPA est un composé chimique, couramment utilisé dans la production des matières plastiques de type polycarbonate. On le retrouve par exemple dans des récipients alimentaires en plastique, des boîtes de conserve. De manière intéressante, la production de produits contenant du BPA a augmenté concomitamment à l'augmentation rapide de la prévalence du DT2 et de l'obésité. Le bisphénol S (BPS) qui est actuellement utilisé comme substitut du BPA a peu été étudiée à ce jour.

Des études expérimentales récentes sont en faveur d'un lien plausible entre BPA et DT2/obésité. Le BPA pourrait affecter le métabolisme du glucose à travers divers mécanismes : résistance à l'insuline, dysfonctionnement des cellules bêta pancréatiques, adipogenèse, inflammation, stress oxydant. Les autres bisphénols présentent des analogies structurelles avec le BPA et des effets similaires ont été observés *in vitro*.

Plusieurs études épidémiologiques portent sur le lien entre exposition au BPA et DT2/obésité. La plupart sont transversales, et seules deux études longitudinales ont été récemment publiées. Aucune ne dispose de données répétées ce qui permet de limiter les biais de classement pour cette substance à faible demi-vie. De plus, les résultats sont contradictoires. Par conséquent, d'autres études prospectives sont indispensables. A notre connaissance, il n'y a pas encore d'études épidémiologiques portant sur l'impact sanitaire du BPS.

Objectifs

Le principal objectif de notre projet est d'étudier l'impact de l'exposition au BPA et à l'un de ses substituts, le BPS, sur le développement du diabète et de l'obésité dans la cohorte prospective française D.E.S.I.R., conçue pour l'étude des facteurs de risque du syndrome métabolique et du diabète. Les objectifs spécifiques sont:

1) Caractérisation les niveaux urinaires de BPA et de BPS, dans un échantillon d'adultes : effets de l'âge, du sexe, de la masse grasse, du niveau socio-économique, étude de la variation intra- et inter-sujets au cours du temps ;

2) Etude de la relation entre BPA et incidence du diabète/de l'obésité ;

3) Exploration de la relation entre BPA, BPS et des variables continues comme la glycémie, l'HbA1c, l'insuline, l'index HOMA d'insulino-résistance, la cholestérolémie.

Méthodologie à mettre en œuvre

Les participants de D.E.S.I.R., âgés de 30-65 ans à l'inclusion (1994-1996), ont été suivis tous les 3 ans pendant 9 ans. Nous avons sélectionné 947 sujets selon un schéma cas-cohorte, incluant 201 sujets ayant déclaré un diabète (traitement ou glycémie à jeun ≥7.0 mmol/L ou HbA1c ≥6.5%) au cours du suivi, et 244 une obésité (IMC ≥ 30 kg/m^2).

L'exposition au BPA a été estimée par la mesure de son principal métabolite urinaire, le BPA-glucuronide (BPA-G), à l'inclusion. La mesure sera répétée 3 ans plus tard pour 850 sujets. Le BPS-G sera analysé à l'inclusion, puis 3, 6 et 9 ans plus tard, chez 25 sujets.

Nous identifierons les facteurs et marqueurs associés aux niveaux de BPA et BPS. L'association entre BPA et l'incidence du diabète/obésité sera analysée par des modèles de régression logistique et de Cox.

Retombés Attendues

Si notre étude permet de mettre en évidence des associations entre BPA et incidence de l'obésité et du diabète, l'hypothèse d'un lien entre l'exposition à ce perturbateur endocrinien et l'apparition de ces pathologies sera renforcée. En revanche, si nous ne retrouvons pas d'association significative, nos résultats remettront en doute les résultats positifs des études transversales et souligneront leurs limites.

Vu le peu d'études prospectives actuellement publiées, ce projet améliorera la connaissance sur les conséquences métaboliques de l'exposition au BPA chez l'Homme. La réponse à cette question de recherche est fondamentale pour la santé publique.

La caractérisation de l'exposition au BPS va permettre de suivre chez les sujets étudiés, l'évolution des concentrations urinaires au cours du temps, entre 1994 et 2005. Sa mise en relation avec des marqueurs biologiques tels que le glucose et les lipides sanguins, sera la première étude de cette nature en France.

Les résultats de cette étude seront communiqués dans des conférences internationales sur le diabète, l'obésité et l'environnement et seront soumis pour publication dans des journaux internationaux à comité de lecture.

Les résultats seront communiqués au service de communication de l'INSERM pour diffusion à la communauté scientifique et civile.

Nous prévoyons d'utiliser les données de cette étude comme exemple lors des activités d'enseignement de l'épidémiologie en Faculté de Pharmacie dont Jérémie Botton est responsable.

GONABIS (décembre 2013 et décembre 2016)

Effects of BPA and substitutes on the developing ovary

Effets du Bisphénol A et de ses substituts sur le développement des gonades.

Gabriel LIVERA[1] ; **Virginie ROUILLER-FABRE[1]**; Julien DAIROU[2] ; Alexandra BENACHI[3]; René HABERT[1] ; Marie-Justine GUERQUIN[1] ; Delphine MOISON[1] ; Sébastien MESSIAEN[1] ; Emmanuelle MARTINI[1] ; Linh CHI BUI[2] ; Jean MARIE-DUPRET[2] ; Fernando RODRIGUES-LIMA[2] ; Stéphanie POZZI-GAUDIN[3]

1-Laboratoire de Développement des Gonades / INSERM UMR967, CEA, Université Paris 7, Fontenay-aux-Roses; 2- Réponses Moléculaires et Cellulaires aux Xénobiotiques / Université Paris 7, Paris 3- Service de gynécologie et d'obstétrique H A. Béclère / APHP, Clamart. Contact : gabriel/livera@cea.fr

Introduction

Les gonades fœtales sont extrêmement sensibles à de très nombreux polluants et représentent ainsi un tissu 'sentinelle' de choix. De nombreux perturbateurs endocriniens (PE), dont le bisphénol A (BPA), peuvent altérer le développement gonadique. Celui-ci constitue une étape clef pour l'acquisition du potentiel reproducteur de l'individu et il est grandement suspecté que l'arrivée de multiples substances chimiques dans notre environnement moderne soit une cause de l'augmentation des pathologies touchant l'appareil reproducteur. Chez les rongeurs, une exposition pré et post-natale au BPA a été associée à une modification de la morphologie ovarienne (Markey 2003). Des effets irréversibles sur la fertilité des femelles ont été observés dans plusieurs espèces/souches de mammifères comme les souris, les rats Sprague-Dawley (Kato 2003; Moral 2008), Wistar (Durando 2007 ; Ramos 2003), Fisher 344 (Khurana 2000) et le mouton (Evans 2004). D'autre part, pendant la vie fœtale, le BPA perturbe l'appariement des chromosomes homologues et la recombinaison méiotique (Susiarjo 2007), deux événements nécessaires pour la future ségrégation des chromosomes. De tels effets semblent récurrents puisqu'ils ont été rapportés *in vivo* chez la souris, le macaque et le nématode C. elegans et *in vitro* dans l'ovaire fœtal humain (Hunt 2012 ; Brieño-Enríquez 2011). Ces effets pourraient être la cause d'aneuploïdies ovocytaires, une des causes majeures de fausses couches chez la femme.

Objectifs

L'objectif général du projet GONABIS est de fournir des informations expérimentales à très court terme sur l'innocuité ou la nocivité potentielle des substituts du BPA. Ces informations concerneront les gonades fœtales, des tissus sensibles à de nombreux PE et dont l'altération peut avoir des conséquences critiques à très long terme. Parmi les objectifs associés à ce projet se trouve l'identification des voies de signalisation du BPA et de ses substituts. Un modèle *in vivo* de xénogreffe de gonades fœtales humaines offrira un point de comparaison au plus proche des conditions physiologiques. Le consortium proposé permet de garantir une étude complète et non biaisé et ainsi l'obtention de résultats fiables, utiles aux décideurs.

Méthodologie à mettre en œuvre

Le présent projet exploitera la sensibilité des cellules gonadiques murines et humaines, pour tester l'effet de divers substituts du BPA afin de mesurer leur toxicité potentielle. Leur(s) effets seront comparés à celui du BPA. De même, ils seront comparés à ceux d'agonistes et antagonistes de voies de signalisation afin d'élucider leur mécanisme d'action. Leurs effets seront analysés en culture organotypique, modèle reproduisant le développement ovarien. De plus, un modèle *in vivo* (xénogreffes) pertinent pour la physiologie des gonades humaines sera développé. Le consortium réuni comprend trois équipes qui cumulent l'ensemble des expertises nécessaires au projet: analyse du développement des gonades (G. Livera), mesure des taux de bisphénols (J. Dairou), expertise clinique (A. Benachi).

Retombés Attendues

L'utilisation de modèles pertinents, la définition de la nocivité ou de l'innocuité de substituts et de leur mécanisme d'action, devra permettre une meilleure évaluation des risques. Les résultats escomptés devront permettre de :

i) rapidement identifier les substituts se comportant comme le BPA et ceux dotés d'un effet néfaste sur l'ovaire,

ii) clarifier les mécanismes d'action du BPA et de ses substituts,

iii) développer un modèle au plus proche de la physiologie humaine et autorisant l'exposition chronique de manière fiable.

Malgré une littérature abondante, le(s) mécanisme(s) d'action du BPA au niveau gonadique reste(nt) inconnu(s). Quand aux substances de remplacement du BPA, la littérature concernant leurs effets sur la fonction de reproduction est quasi-inexistante.

Notre projet apportera de ce fait de précieuses informations sur les effets et le(s) mécanisme(s) d'action du BPA et des ses substituts potentiels et permettra le développement de modèles originaux et pertinents (xénogreffe de gonades fœtale humaines) pour étudier l'effet des perturbateurs endocriniens.

BPActions (décembre 2013 – décembre 2016)

BPA / BPA substitutes effects in the human fetal testis and the species-specific issue.

Effets du BPA et de ses substituts sur le testicule fœtal humain et spécificités liées à l'espèce

Bernard JÉGOU[1]; Antoine ROLLAND[1]; Frédéric CHALMEL[1]; Séverine Mazaud-Guittot[1]; Laurianne LESNÉ[1]; Christèle DESDOITS-LETHIMONIER[1]; Millissia BEN MAAMAR[1]; Isabelle COIFFEC[1]; Pierre GAUDRIAULT[1]

1-IRSET Inserm U1085, RENNES. Contact : bernard.jegou@inserm.fr

Introduction

L'incidence croissante des troubles de la reproduction masculine génère une prise de conscience grandissante dans l'hémisphère Nord. En particulier, un certain nombre d'études ont entrainé un important débat quant à savoir s'il existe ou non des liens étiologiques entre la qualité du sperme, le cancer du testicule, la cryptorchidie et l'hypospadias. Ces quatre éléments ont été proposés pour être les symptômes d'une dysgénésie testiculaire sous-jacente commune au cours du développement testiculaire, nommée syndrome de dysgénésie testiculaire (SDT). L'interprétation de cette fluctuation géographique et temporelle des indicateurs de santé reproductive masculine a été attribuée en partie à la variation des facteurs environnementaux, notamment d'un sous-groupe de produits chimiques appelés perturbateurs endocriniens. Parmi ces derniers, les perturbateurs endocriniens à activité anti-androgénique suscitent des préoccupations croissantes, en particulier en raison de leurs effets sur le testicule fœtal et leurs conséquences sur la santé reproductive. Les inquiétudes générées par le bisphenol A (BPA) et le fait que certains états aient été conduits à mettre en place des restrictions réglementaires à son utilisation ont incité certains industriels à développer des substituts au BPA dont les propriétés éventuelles de perturbateurs endocriniens nécessitent néanmoins d'être explorées.

Objectifs

La question centrale ici est de savoir si le BPA et ses substituts sont susceptibles ou non d'exercer des effets de perturbation endocrinienne sur les testicules fœtaux de mammifères; y compris chez l'humain.

Ce projet vise à étudier :

- les effets des substituts du BPA sur et le testicule fœtal de rat et humain en culture en référence au BPA lui-même.

- l'origine des différences observées au niveau de la réponse *in vitro* du testicule fœtal au BPA et/ou à ses substituts chez les rongeurs et l'homme, ces différences pouvant expliquer les spécificités liées à l'espèce; toutefois, les conditions de culture doivent aussi être étudiées et comparées de façon à optimiser l'évaluation du risque.

Méthodologie à mettre en œuvre

En utilisant le BPA comme molécule de référence nous étudierons:

- les effets de ses substituts (BPB, BPE, BPF, BPS, BADGE) sur le testicule fœtal de rat et humain en culture organotypique, selon des modalités expérimentales totalement maitrisées au laboratoire;

- les effets de différentes conditions de culture des testicules fœtaux dans le but d'élucider les différences importantes d'effets observées avec le BPA;

- les différences qui pourraient exister entre le testicule fœtal de rongeurs et d'homme en termes de biologie intrinsèque des cellules de Leydig productrices de testostérone. Ces différences pourraient aussi être à l'origine des discordances importantes observées lorsque les effets des perturbateurs endocriniens (notamment le BPA) sont testés sur la fonction testiculaire de ces différentes espèces. Ce dernier aspect de notre étude nous conduira à utiliser des technologies sophistiquées, notamment le RNAseq (transcriptome).

Retombés Attendues

Ce projet totalement original permettra de cribler les activités délétères éventuelles des substituts du BPA dans le testicule fœtal des mammifères dont l'homme, ainsi que de savoir quelle part revient aux conditions de culture organotypiques et/ou à la biologie intrinsèque des cellules de Leydig de rongeurs et d'homme dans les différences observées lorsque les effets des perturbateurs endocriniens (notamment le BPA et ses substituts) sont étudiés sur le testicule fœtal. Ce dernier aspect de notre projet est essentiel pour progresser dans l'évaluation du risque des effets du BPA et de ses substituts chez l'homme, pour la validation des outils de criblage et pour le développement de nouveaux tests réglementaires.

ADIPOTOX (janvier 2014 et juin 2015)

Interaction of bisphenol A substitutes with human adipocyte physiology

Interaction des substituts du bisphénol A avec la physiologie des adipocytes humain

Odile POULAIN-GODEFROY[1,2] ; Audrey LELOIRE[1,2] ; Stéphane LOBBENS[1,2], Julie MAILLET[1,2], Mickaël CANOUIL[1,2], Véronique DHENNIN[1,2], Delphine ALLORGE[3,2], Loïc YENGO[1,2], Stéphane CAUCHI[1,2] & Philippe FROGUEL[1,2]

1- CNRS UMR8199, Institut Pasteur de Lille, EGID 2- Université Lille Nord de France, Lille 3- EA4483. Contact : odile.poulain@good.ibl.fr

Introduction

Le bisphénol A (BPA) et les phtalates sont des composés présents dans notre environnement, utilisés comme plastifiants et dans de nombreux procédés de chimie industrielle. Ils ont été récemment suspectés d'être responsables de l'épidémie de maladies métaboliques. En effet, il a été montré que le BPA et les phtalates interagissent avec l'adipogénèse et peuvent induire des modifications épigénétiques. Cependant, pour contourner les lois restrictives appliquées à son utilisation, les industriels ont commencé à utiliser différents substituts du BPA, pour lesquels les effets potentiellement délétères sur la santé sont peu documentés.

Objectifs

Plusieurs voies métaboliques ont été décrites comme cibles du BPA et des phtalates. Pour caractériser au mieux les similarités ou divergences entre ces produits et les substituts utilisés, notre objectif est de déterminer leurs gènes cibles dans un modèle d'adipocytes primaires humains par une approche génomique, en nous focalisant en parallèle sur des données d'expression (mRNA), les facteurs qui peuvent réguler cette expression (miRNA) et les marqueurs épigénétiques (met DNA).

Méthodologie à mettre en œuvre

Des bisphénols (BPA, BPF et BPS) ou du di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) seront ajoutés lors de la différenciation d'adipocytes primaires humains provenant de donneuses non diabétiques (Lonza). L'expression génique (ARNm), le profil d'expression des microARN (miARN) ainsi que les sites de méthylation de l'ADN seront évalués à l'aide de

puces à ADN. Les effets délétères de ces composés sur la différenciation et la physiologie des adipocytes seront analysés par la combinaison des niveaux d'expression des ARNm, des miARN et des sites de méthylation. Les voies métaboliques concernées seront déterminées par l'utilisation du logiciel IPA (Ingenuity Pathway Analysis). Une validation par qPCR des gènes les plus dérégulés sera effectuée.

Retombées attendues

Nous espérons 1) pouvoir étayer une différence ou une similitude d'effets entre le BPA et ses substituts, 2) caractériser sur le génome humain des biomarqueurs d'exposition et/ou d'effets de ces différents composés. Ces données pourront être par la suite utilisées pour développer des tests de toxicité sur des cellules humaines et permettront d'élucider les mécanismes impliqués. En particulier, nous prévoyons par la suite de cribler des banques de tissus de patients obèses pour déterminer une association potentielle de ces marqueurs avec l'insulino-résistance.

X-SLIMs (décembre 2013 novembre 2016)

Screening of endocrine disruptors of the nuclear receptors for oxysterols LXRs

Criblage de perturbateurs endocriniens des récepteurs nucléaires des oxysterols LXRs.

Amalia TROUSSON[1-4], Allan FOUACHE[1-4], Silvère BARON[1-4], Anthony ALIOUI[1-4], Sandrine PLANTADE[1-4], David VOLLE[1-4], **Jean-Marc A. LOBACCARO[1-4]**

1- Clermont Université, Université Blaise Pascal, Génétique Reproduction et Développement, BP 10448, F-63000 CLERMONT-FERRAND, France ; 2- CNRS, UMR 6293, GReD, F-63171 AUBIERE, France ; 3- INSERM, UMR 1103, GReD, F-63171 AUBIERE, France ; 4- Centre de Recherche en Nutrition Humaine d'Auvergne, F-63000 CLERMONT-FERRAND, France. Contact : j-marc.lobaccaro@univ-bpclermont.fr

Introduction

Il est de plus en plus clair que les perturbateurs endocriniens environnementaux (PEEs) ont un rôle important dans l'augmentation de la prévalence de l'hyperplasie bénigne de la prostate (HBP). Cependant, à ce jour, les PEEs ont été essentiellement criblés pour leur impact sur l'activité des stéroïdes (androgènes et/ou estrogènes) dans la prostate. Notre groupe et d'autres ont démontré l'importance des récepteurs nucléaires LXRs dans l'homéostasie de la prostate : les souris déficientes pour un des récepteurs LXRs développent une HBP. La perturbation des voies métaboliques régulées par les LXRs entraînent donc une des pathologies les plus fréquentes et loin d'être bénigne. De nombreuses molécules antagonistes des LXRs, d'origine naturelle, ont été décrites ces 3 dernières années, suggérant que des PEEs peuvent altérer les voies régulées par les LXRs et être associés à la survenue de nombreuses pathologies dont l'HBP. Le criblage de ces molécules dans un modèle cellulaire est indispensable mais induit des biais inhérent au système même. Ce projet est basé sur le criblage de PEEs des LXRs, *in vivo*, dans de nouveaux modèles de drosophiles transgéniques, à courts termes et de souris transgéniques, à moyen termes. Ces drosophiles et ces souris exprimeront de façon ubiquiste un gène rapporteur hétérologue, facilement identifiable et mesurable, et activable par un récepteur LXR chimérique. Ces modèles permettront de cribler les molécules ciblant les voies des LXRs mais aussi de définir une nouvelle classe de PEEs pouvant être associée à la survenue de pathologie chez l'homme. De plus, de nouveaux risques d'exposition pourront également être identifiés.

Objectifs

Les objectifs du projet X-SLiMs est le criblage *in vivo* de molécules modulant l'activité des récepteurs nucléaires LXRα et LXRβ, pouvant entraîner une perturbation des voies de signalisation de ces récepteurs et ainsi être associées au développement de pathologie. Le but est le développement de deux types d'outils « animal » : dans un premier temps des lignées transgéniques de drosophiles pour un criblage rapide des molécules ; les vecteurs de transgénèses validés seront utilisés pour la création de deux souris transgéniques. L'obtention d'une souris double transgéniques permettra de différencier les molécules activant LXRα de celles modulant les activités de LXRβ.

Méthodologie à mettre en œuvre

Les lignées transgéniques exprimeront de façon ubiquiste un gène codant le domaine de liaison du ligand d'un LXR fusionné à un domaine de liaison de l'ADN liant spécifiquement des séquences d'activation génique. Pour les drosophiles, la 1^{ére} lignée exprimera $Gal4_{DBD}$-LXRα sous promoteur ubiquiste pUBI et permettra l'expression de la GFP sous contrôle de UAS lorsque LXRα est activé par un ligand spécifique ; la 2^{éme} lignée exprimera QF_{DBD}-LXRβ et la RFP (sous contrôle de QuAS). Pour les souris, la 1^{ére} lignée exprimera $Gal4_{DBD}$-LXRα sous promoteur ubiquiste CMX et permettra l'expression de la GFP sous contrôle de UAS ; la 2^{éme} lignée exprimera $WRKY_{DBD}$-LXRβ sous promoteur CMX et la RFP sous contrôle de W-box. Les plasmides seront tous testés en cultures cellulaires avant injection.

Retombés Attendues

Ces systèmes permettront : i) la mise en évidence d'antagonistes naturels ou non présents dans l'environnement ; ceci aidera à définir de nouveaux PEEs qui ne sont pas encore pris en compte dans la pharmacovigilance ; ii) le criblage d'agonistes spécifiques : les LXRs étant des cibles pharmacologiques, il est indispensable d'identifier de nouvelles familles de molécules modulatrices ; iii) de discriminer des ligands spécifiques des deux isoformes après obtention du double Tg ; en effet les domaines de liaison des deux isoformes des LXRs présentent une identité de 78% sur la protéine et il est très difficile *in silico* et même *in vitro* de distinguer des ligands spécifiques ; iv) de définir les sites d'action des molécules identifiées : les récepteurs LXRs étant ubiquistes, il sera fondamentale de définir les lieux où les LXRs sont activés par des formes vectorisées des molécules.

Programme National de Recherche sur les Perturbateurs Endocriniens (PNRPE).

Le PNRPE a pour objectif de soutenir des recherches fondamentales et appliquées en appui aux praticiens de l'action publique sur les questions de perturbation endocrinienne. Il est piloté par le ministère du développement durable (Commissariat général au développement durable, Direction de la recherche et de l'innovation) ; son animation scientifique a été confiée à l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'Alimentation, de l'environnement et du travail (Anses).

Pour plus d'information : ***http://www.pnrpe.fr***

Membres du Conseil Scientifique du PNRPE

Jacques AUGER; Patrick BALAGUER; Yannick BARTHE; Catherine BENNETAU-PELISSERO; Jean-Pierre BOURGUIGNON; François BRION; Thierry CAQUET; Marie-Christine CHAGNON; Sylvaine CORDIER; Xavier COUMOUL; Jean-Pierre CRAVEDI; Barbara DEMENEIX; James DEVILLERS; Silvia FASANO; Yves LEVI; Nicolas OLEA; Martine PERROT-APPLANAT; Alexandre PERY; Jean-Marc PORCHER; Rémy SLAMA (Président); Daniel VAIMAN.

Membres du Bureau du PNRPE

Paulina CERVANTES (Anses) ; Marion GUST (MEDDE-CGDD-DRI) ; Louis LAURENT ; Lionel MOULIN (MEDDE-CGDD-DRI) ; Rémy SLAMA (INSERM).

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
Ministère de l'Écologie, du Développement durable et de l'Énergie

anses
agence nationale de sécurité sanitaire alimentation, environnement, travail