

# Perturbateurs endocriniens

Recherche et perspectives

Dossier du participant

**08**  
juillet 2019

Maison de la RATP  
Espace du Centenaire  
189, rue de Bercy - 75012 Paris

# Éditorial

Pour réduire l'exposition de la population et de l'environnement aux perturbateurs endocriniens, la France est le premier pays à s'être doté d'une stratégie nationale sur les perturbateurs endocriniens (SNPE), publiée en avril 2014. Copilotée par les ministères chargés de l'environnement et de la santé, celle-ci a été mise en œuvre dans le plan national Santé-Environnement 2015-2019 (PNSE 3).

De la compréhension des mécanismes d'activation des processus cellulaires ou tissulaires par les perturbateurs endocriniens à la biosurveillance humaine pour évaluer l'exposition de la population, recherches fondamentales et appliquées sont au cœur de cette stratégie. Dans un contexte de forte incertitude, elles sont indispensables pour prendre en compte le rôle des expositions environnementales dans l'augmentation de certaines maladies (maladies métaboliques, maladies reproductives, obésité...), asseoir les mesures de prévention ou précaution pour toutes les questions ayant trait à la perturbation endocrinienne et, in fine, mieux guider l'action publique. De façon complémentaire, l'approfondissement des mécanismes d'action des perturbateurs endocriniens peut contribuer à la compréhension de leur rôle potentiel dans le développement des pathologies précitées ainsi qu'à leur prévention.

**L'organisation conjointe par l'Anses et l'ANR de ces rencontres scientifiques dédiées aux perturbateurs endocriniens vise à renforcer les coopérations au sein de la communauté scientifique nationale en favorisant un dialogue ouvert avec les parties prenantes, associations environnementales et organisations professionnelles, et les décideurs publics. Par leur caractère transversal, elles sont l'occasion de faire le point sur les avancées de la recherche et mettre en exergue la continuité entre les différents projets financés par le programme national de recherche Environnement-Santé-Travail (PNR EST) de l'Anses et les programmes de l'ANR.**

L'Anses soutient la recherche au travers du pilotage du Programme national de recherche Environnement-Santé-Travail (PNR EST), qui permet de développer les connaissances en appui aux politiques publiques et aux travaux d'évaluation des risques sanitaires. La thématique des perturbateurs endocriniens fait partie des thématiques couvertes depuis plusieurs années par le PNR EST et elle a fait l'objet d'un soutien supplémentaire pour ses appels à projet 2018 et 2019. En matière d'expertise (évaluation des dangers et risques associés aux perturbateurs endocriniens), l'Anses poursuit la dynamique engagée dès 2009. Elle évalue notamment, dans le cadre de la SNPE, au moins cinq substances chimiques par an, suspectées d'avoir des propriétés de perturbateurs endocriniens. Les efforts doivent porter sur le développement de tests d'innocuité et de toxicité adaptés et sur la recherche d'alternatives aux perturbateurs endocriniens.

Pour sa part, l'ANR s'engage à promouvoir la recherche française en favorisant l'émergence de projets collaboratifs pluridisciplinaires et en cohérence avec les agendas stratégiques national et européen. Les projets financés sur la thématique des perturbateurs endocriniens intéressent la pluralité des disciplines de la communauté scientifique. Les résultats générés aujourd'hui complètent les premiers résultats majeurs dans ce domaine financés par l'ANR et contribuent à élargir le champ des questions abordées et les équipes de recherche qui y répondent. Les projets abordent des sujets aussi divers que les effets sur la santé et la reproduction, avec en particulier la question des expositions chroniques (à faibles doses ou les mélanges), ou encore la compréhension des interactions entre santé et environnement (criblage, modélisation...) et des liens entre anomalies de santé et perturbation endocrinienne.

À travers leurs missions respectives, l'Anses et l'ANR partagent la même ambition de soutenir sur le long terme la recherche sur les perturbateurs endocriniens. Si des mesures concrètes visant à réduire l'exposition des consommateurs aux perturbateurs endocriniens ont déjà été prises, il demeure essentiel d'encourager la recherche, de mobiliser la communauté scientifique française sur la thématique de l'exposome chimique, auquel les perturbateurs endocriniens participent, et de favoriser ainsi l'émergence d'idées et d'approches nouvelles dans le cadre du défi que représente le 4<sup>e</sup> Plan national santé environnement « Mon environnement, ma santé ».

Ces Rencontres Scientifiques sont l'occasion de présenter les résultats des projets financés et de favoriser des croisements fructueux entre les différentes études afin que les résultats puissent se traduire rapidement par une meilleure protection de la santé humaine.

**Roger GENET**

Directeur général de l'Anses

**Thierry DAMERVAL**

Président-directeur général de l'ANR

8 h 30 *Accueil des participants*

9 h 00 **ACCUEIL**

**Thierry DAMERVAL**, Président-directeur général, Agence nationale de la recherche (ANR)  
**Roger GENET**, Directeur général, Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses)

9 h 30 **OUVERTURE**

Ministère de la Transition écologique et solidaire (sous réserve)  
Ministère des Solidarités et de la Santé (sous réserve)  
Ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation (sous réserve)

10 h 00 **PRÉSENTATION INTRODUCTIVE**

Sakina MHAOUTY-KODJA, CNRS UMR8246 - Inserm U1130- Sorbonne Université, Paris

10 h 30 **SESSION 1 – EFFETS DES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS SUR LA DESCENDANCE**

Modérateurs : Joëlle LE MOAL, Santé Publique France, Saint-Maurice & Rémy SLAMA, Inserm, CNRS, Université Grenoble Alpes, Grenoble

**Expositions prénatales aux phénols et santé de l'enfant : analyse longitudinale (ANR)**  
Claire PHILIPPAT, IAB Inserm U1209, CNRS UMR 5309, Université Grenoble Alpes, Grenoble

**Développement d'une approche intégrative modélisatrice pour évaluer l'exposition interne fœtale humaine à un contaminant, appliquée au bisphénol A au titre de molécule modèle (ANR)**

**Développement d'une approche intégrative pour évaluer l'exposition interne fœtale humaine au bisphénol S (PNR EST Anses)**

Nicole HAGEN-PICARD, Toxalim, UMR 1331, INRA, ENVIT, INP-EI Purpan, UPS, Université de Toulouse, Toulouse

**Effets des phtalates sur le développement et les fonctions placentaires : impact du mono-2-ethylhexyl phtalate (MEHP) sur l'expression et l'activité de PPAR $\gamma$  (PNR EST Anses)**  
Séverine DEGRELLE, UMR-S 1139 Université Paris Descartes, Inserm, Paris

**Devenir et effets de polluants organiques persistants (PCB, PBDE) sur la reproduction des poissons, le développement et la survie de la descendance (ANR)**

Marie-Laure BEGOUT, Ifremer - Département ressources biologiques et environnement, La Rochelle

**Effets d'un substitut potentiel du bisphénol A, le BADGE, sur le développement des cellules germinales fœtales chez la souris et l'homme (PNR EST Anses)**

Virginie ROUILLER-FABRE, Laboratoire développement des Gonades/ UMR Stabilité génétique cellules souches et radiations, Université de Paris, CEA, Fontenay-aux-Roses

**Contribution à l'évaluation de l'exposition de l'Homme aux substituts et dérivés du bisphénol A et à la caractérisation du danger associé (ANR)**

Jean-Philippe ANTIGNAC, LABERCA UMR1329, ONIRIS INRA, Nantes

12 h 20 *Déjeuner libre*

13 h 30 **SESSION 2 – MÉCANISMES D'ACTION : FAIBLES DOSES ET MÉLANGES**

Modérateurs : Patrick BALAGUER, Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier (IRCM) INSERM U1194 & Claude EMOND, Université de Montréal

**Les récepteurs alternatifs du bisphénol A et des xénoestrogènes : pertinence sur la perturbation endocrinienne (PNR EST Anses)**

Jean-Marc VANACKER, IGFL, CNRS UMR5242, ENS Lyon, Lyon

**Approches intégrées pour évaluer les effets des progestatifs chez les poissons et leurs occurrences environnementales (ANR)**

François BRION, Ineris, Verneuil-en-Halatte

**Rôle du récepteur Ah et effets de ses ligands sur le système nerveux (ANR)**

Mathieu BERANECK, UMR 8002 CNRS, Université de Paris, Paris

**Effets d'une exposition au bisphénol S et au bisphénol F par voie transcutanée versus orale, sur le développement des réponses immunitaires : comparaison avec le bisphénol A (PNR EST Anses)**

Laurence GUZYLACK-PIRIOU, INRA, ENV, INP, Université Toulouse III Paul Sabatier, Toulouse

**Perturbateurs endocriniens : gérer les risques dans un contexte de manque d'information (PNR EST Anses)**

Jean-Marc BRIGNON, Ineris, Verneuil-en-Halatte

**Perturbateurs endocriniens : évaluations réglementaires au niveau européen et national**

Léa RIFFAUT & Christophe ROUSSELLE, Anses, Maisons-Alfort

**15 h 10** *Pause café*

**15 h 25** **SESSION 3 – AUTRES EFFETS DES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS**

Modérateurs : Luc BELZUNCES, UR 406 INRA, Avignon & Olivier KAH, Irset, Inserm UMR 1085, Rennes

**Distribution de la chlordécone dans la prostate et perturbations moléculaires induites en lien avec la promotion tumorale (ANR)**

François LAURENT, INRA UMR 1331 Toxalim, Toulouse

**Exploration de l'exposition chronique et faible dose de molécules environnementales dans un modèle de progression tumorale du cancer du sein (ANR)**

Pascale COHEN, UMR Inserm 1052, CNRS 5286, Université Claude Bernard Lyon I, Lyon

**Evaluation des effets de pesticides sur la signalisation thyroïdienne et la neurogénèse (PNR EST Anses)**

Jean-Baptiste FINI, UMR 7221 MNHN, CNRS, Paris

**Le centre ARTEMIS, plateforme de prévention en santé environnementale dédiée à la reproduction (ARS Nouvelle-Aquitaine et Anses)**

Patrick BROCHARD, Université de Bordeaux, CHU de Bordeaux, Bordeaux

**16 h 30** **Bilan et perspectives**

Armelle DEGEORGES, Anses, Maisons-Alfort & Catherine MOUNEYRAC, ANR, Paris

**16 h 40** **CONCLUSION**

**Toxicité des perturbateurs endocriniens : implications pour la santé publique et la société**

Robert BAROUKI, UMR-S 1124, Inserm, Université Paris Descartes, Paris

**17 h 00** **CLÔTURE**

# Session 1 – Effets des perturbateurs endocriniens sur la descendance

**Modérateurs : Joëlle LE MOAL, Santé Publique France, Saint-Maurice & Rémy SLAMA, Inserm, CNRS, Université Grenoble Alpes, Grenoble**

## Expositions prénatales aux phénols et santé de l'enfant : analyse longitudinale

***Claire PHILIPPAT, Valérie SIROUX, Céline VERNET, Rémy SLAMA***

*Inserm, CNRS, Univ. Grenoble Alpes, Institute for Advanced Biosciences (IAB), U1209, Épidémiologie environnementale appliquée à la reproduction et la santé respiratoire, Grenoble*

### **Biographie**

L'équipe d'épidémiologie environnementale a pour objectif général d'identifier des facteurs de risque environnementaux dont l'exposition est modifiable à des troubles liés à la croissance, au neurodéveloppement et à la santé respiratoire des enfants et de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à ces effets possibles. Cette équipe se concentre notamment sur les polluants atmosphériques, les perturbateurs endocriniens et l'exposome dans son ensemble.

### **Résumé**

Les phénols sont une famille de perturbateurs endocriniens pour laquelle la littérature animale a mise en évidence des effets délétères sur la santé animale. Le fait que leur demi-vie chez l'homme soit courte (probablement comprise entre quelques heures et quelques jours) et que les expositions varient au cours des jours et des semaines entraînent de très fortes variations temporelles des concentrations urinaires de phénols. Les quelques études épidémiologiques portant sur leurs effets sur la santé se sont appuyées sur un petit nombre (1 à 3) d'échantillons d'urine pour évaluer l'exposition, ce qui reflète imparfaitement l'exposition moyenne au cours de périodes prolongées telles que la grossesse.

Nos objectifs étaient

- 1) d'évaluer le biais dans la relation dose-réponse résultant de l'utilisation d'un échantillon d'urine unique pour évaluer l'exposition ;
- 2) de développer une méthodologie permettant d'estimer efficacement les niveaux urinaires de biomarqueurs à fortes variations temporelles ;
- 3) de s'appuyer sur cette méthodologie pour décrire avec précision les niveaux d'exposition à plusieurs phénols chez les femmes enceintes et les enfants en France et étudier les relations entre ces expositions précoces, la croissance de l'enfant et sa santé respiratoire ;

Les résultats de l'objectif 4 sont préliminaires et seront partiellement présentés.

### **Population et méthodes**

Concernant les objectifs 1, 2, 3 nous nous sommes basés sur 8 femmes enceintes de la cohorte SEPAGES-Faisabilité qui ont recueilli trois échantillons d'urine par jour pendant une semaine à trois reprises pendant leur grossesse. A l'aide de ces données couplées à une étude de simulation nous avons estimé le biais dans les relations dose-réponse lorsque qu'1 à 20 échantillons d'urine sont collectés par sujet pour évaluer les expositions au méthylparabène (variabilité modérée) et au bisphénol A (variabilité élevée).

Pour l'objectif 4, nous nous sommes appuyés sur la cohorte SEPAGES pour laquelle 484 femmes enceintes ont été recrutées dans la région grenobloise entre 2014 et 2017 et suivies avec leur enfant. Nous avons évalué 12 phénols environnementaux dans des pools intra-individuels constitués d'un grand nombre d'échantillons d'urine par sujet pendant la grossesse et la première année de vie. La santé respiratoire a été caractérisée par des mesures objectives de la fonction pulmonaire à l'âge de 2 mois. La croissance prénatale a été évaluée par des mesures échographique répétées et des mesures à la naissance.

## Résultats

L'utilisation d'un échantillon biologique pour évaluer l'exposition a entraîné un biais d'atténuation des relations dose-réponse de 30% pour le méthylparabène et de 68% pour le bisphénol A ; quatre et dix-huit échantillons, respectivement, étaient nécessaires pour réduire ce biais à 10%. Le pooling de ces échantillons pour un même sujet permet de limiter les biais et d'augmenter la puissance, sans augmenter les coûts de dosage, par rapport aux études reposant sur un échantillon biologique ponctuel.

Dans la cohorte SEPAGES, l'observance au protocole était bonne avec 479 (99%) et 445 (92%) des femmes ayant fourni des échantillons d'urine répétés pendant la grossesse et pour leur enfant durant la première année de vie. Parmi eux, 358 ont eu une évaluation de la fonction pulmonaire à 2 mois et 400 avaient des données complètes pour la croissance prénatale. Le taux de détection dans les pools d'urine était supérieur à 90% pour le bisphénol A, l'éthylparabène, le méthylparabène, l'oxybenzone et le triclosan, et inférieur à 5% pour le bisphénol AF, le B, F et le triclocarban.

## Conclusion

Pour les composés tels que le bisphénol A dont les concentrations urinaires sont très variables dans le temps, la collecte de quelques douzaines d'échantillons d'urine par participant est nécessaire pour fortement limiter le biais d'atténuation dans la relation dose-réponse. Les taux de détection du bisphénol A, du triclosan et du parabène étaient élevés dans la cohorte SEPAGES.

## Références

-Vernet C, Philippat C, Calafat AM, Ye X, Lyon-Caen S, P. Hainaut, Siroux V, Schisterman EF, Slama R. An empirical validation of the within-subject biospecimens pooling approach to minimize exposure misclassification in biomarker-based studies. Epidemiology. In Press

**Projet financé par l'ANR dans le cadre de l'appel à projets générique 2014.**



## Développement d'une approche intégrative modélisatrice pour évaluer l'exposition interne foetale humaine à un contaminant, appliquée au bisphénol A au titre de molécule modèle

**Véronique GAYRARD<sup>1</sup>, Glenn GAUDERAT<sup>1</sup>, Marlène Z. LACROIX<sup>1</sup>, Alain BERREBI<sup>2</sup>, Daniel ZALKO<sup>1</sup>, Laurent DEBRAUWER<sup>1</sup>, Catherine VIGUIÉ<sup>1</sup>, Nicole PICARD-HAGEN<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Toxalim, Université de Toulouse, Institut National de la recherche agronomique (Inra), Institut national polytechnique de Toulouse (INP), École nationale vétérinaire de Toulouse (ENVT), Toulouse ; <sup>2</sup>Service de gynécologie-obstétrique, Hôpital Paule de Viguier, CHU de Toulouse, Toulouse

## Biographie

Véronique GAYRARD, PhD, Professeur de physiologie de la reproduction et d'endocrinologie à l'École nationale vétérinaire de Toulouse. Activité de recherche au sein de l'UMR 1331 Inra, ENVT TOXALIM dans l'équipe « gestation, perturbateurs endocriniens » sur la relation entre l'exposition aux contaminants alimentaires et leurs effets perturbateurs sur le système endocrinien.

## Résumé

L'exposition au bisphénol A (BPA) au cours du développement fœtal est suspectée d'être impliquée dans l'initiation d'effets biologiques. Les études de biosurveillance humaine montrent que le BPA passe la barrière placentaire et que le fœtus humain est exposé au BPA. Le niveau de cette exposition fœtale reste cependant indéterminé. Les valeurs élevées des concentrations plasmatiques en BPA rapportées dans certaines études sont attribuées à des contaminations des échantillons par le BPA, et ne sont pas prises en compte dans l'évaluation du risque. Les études toxicocinétiques réalisées chez le fœtus ovin et le fœtus de singe rhésus montrent que le fœtus est capable de métaboliser le BPA en BPA glucuronide (BPAG) qui s'accumule dans le compartiment fœtal en raison d'un passage transplacentaire limité. Dans ce contexte, les objectifs du projet étaient de développer une approche modélisatrice pour évaluer l'exposition humaine fœtale au BPA et de caractériser des biomarqueurs fœtaux révélateurs de la réactivation du BPAG.

Les mécanismes toxicocinétiques (TK) impliqués dans l'exposition fœtale au BPA ont été caractérisés, dont le passage transplacentaire du BPA et de son principal métabolite, le BPAG à l'aide du modèle de placenta humain perfusé et les activités métaboliques des tissus fœtaux. Une étude toxicocinétique (TK) réalisée sur le modèle du fœtus ovin a montré que le BPA glucuronide (BPAG), métabolite majeur du BPA, piégé dans le compartiment fœtal, est lentement éliminé via sa réactivation en BPA. Le modèle TK développé à partir des données obtenues chez le fœtus ovin a ensuite été transposé à l'homme pour prédire l'exposition fœtale humaine au BPA et au BPAG. Ce modèle TK humanisé a permis de prédire des concentrations plasmatiques fœtales de BPAG maintenues autour de 40ng/L chez le fœtus humain en fin de grossesse, soit environ 1 000 fois supérieures aux concentrations correspondantes en BPA libre.

Dans un deuxième temps, compte tenu de la possible réactivation du BPA conjugué par les activités enzymatiques d'hydrolyse au niveau des tissus fœtaux, les conséquences potentielles d'une surexposition fœtale au BPAG ont été évaluées en comparant les effets d'une exposition fœtale à des doses équimolaires de BPA et de BPAG par une approche sans a priori fondée sur l'analyse des altérations du protéome. Nos résultats montrent que le métabolite glucurono-conjugué du BPA, dans le tissu hépatique, affecte des voies physiologiques similaires à celles altérées par le BPA.

L'ensemble de ces résultats indique que les concentrations de BPAG dans le sang du cordon constituent un marqueur pertinent de l'exposition fœtale au BPA et qu'elles doivent être prises en compte dans l'évaluation du risque.

## Références

- Reproductive Toxicology 2014, 47C:51-58
- Drug Metabolism and Disposition 2015, 43:467-476
- Environ Int. 2016;86:52-9.
- Sci Rep. 2017;7:15330.

**Projet financé par l'ANR dans le cadre de l'appel à projets CESA (contaminants et environnements) 2013.**

# Développement d'une approche intégrative pour évaluer l'exposition interne fœtale humaine au bisphénol S

**Nicole PICARD-HAGEN<sup>1</sup>, Flore C. GRANDIN<sup>1</sup>, Marlène Z. LACROIX<sup>2</sup>, Christophe VAYSSIERE<sup>3</sup>, Mathieu MORIN<sup>3</sup>, Marie-Line MORVANC<sup>4</sup>, Jean-Philippe ANTIGNAC<sup>4</sup>, Catherine VIGUIÉ<sup>1</sup>, Bruno Le BIZEC<sup>4</sup>, Véronique GAYRARD<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Toxalim, Université de Toulouse, Institut national de la recherche agronomique (Inra), Institut national polytechnique de Toulouse (INP), Ecole nationale vétérinaire de Toulouse (ENVT), Toulouse ; <sup>2</sup>INTHERES, Université de Toulouse, INRA, ENVT, Toulouse ; <sup>3</sup>Service de gynécologie-obstétrique, Hôpital Paule de Viguier, CHU de Toulouse, Toulouse ; <sup>4</sup>LABERCA UMR 1329, INRA, Oniris, Nantes

## Biographie

Nicole PICARD-HAGEN, Docteur vétérinaire, PhD, membre du collège européen de reproduction animale Professeur de pathologie de la reproduction à l'École nationale vétérinaire de Toulouse. Activité de recherche au sein de l'UMR 1331 INRA, ENVT TOXALIM, dans l'équipe « gestation, perturbateurs endocriniens » sur la relation entre l'exposition aux contaminants alimentaires et leurs effets perturbateurs sur le système endocrinien.

## Résumé

Suite aux restrictions réglementaires, le bisphénol S (BPS) a progressivement remplacé le bisphénol A (BPA) dans les produits de consommation courante. L'exposition humaine au BPS est maintenant ubiquitaire. Or, le BPS présente un potentiel perturbateur endocrinien similaire à celui du BPA et pourrait notamment altérer la stéroïdogénèse. Les perturbations de l'homéostasie des stéroïdes sexuels pendant la phase de développement pourraient être impliquées dans l'incidence accrue de troubles exprimés chez l'adulte. Les objectifs du projet étaient d'évaluer les mécanismes déterminant l'exposition fœtale au BPS et de caractériser des biomarqueurs phénotypiques de l'exposition fœtale et/ou des effets du BPS à partir d'une signature stéroïdomique.

Une étude toxicocinétique, réalisée sur le modèle intégratif du fœtus ovin, pertinent vis-à-vis de l'homme en terme de physiologie de la gestation, a montré que le transfert materno-fœtal du BPS est faible. Cependant, le BPS et son principal métabolite, le BPS glucuronide, sont lentement éliminés du compartiment fœtal en raison d'un passage placentaire fœto-maternel du BPS limité et de la faible vitesse de réactivation du BPSG en BPS. Il en résulte une exposition fœtale au BPS similaire à celle au BPA lors d'exposition maternelle répétée. L'étude du transfert placentaire du BPS et du BPSG sur le modèle de placenta humain perfusé a conforté les résultats observés chez le mouton, avec des faibles transferts materno-fœtal et fœto-maternel du BPS, respectivement 10 et 3 fois inférieurs à ceux du BPA.

Dans un deuxième temps, l'effet du BPS sur la voie de synthèse et de métabolisation de la testostérone dans l'unité materno-fœtale a été déterminée sur le modèle intégratif ovin. Une trentaine d'hormones stéroïdes ont été mesurées par couplage GC-MS/MS. L'exposition maternelle quotidienne au BPS au cours de la gestation chez la brebis n'a pas eu d'impact sur les voies de biosynthèse des androgènes dans l'unité materno-fœto-placentaire pour les fœtus mâles. Ce résultat signifie soit que le BPS n'a pas eu d'effet sur ces organes exposés, soit que des mécanismes compensatoires ont été mis en place au cours de la gestation pour maintenir l'homéostasie stéroïdienne.

En conclusion, notre étude a montré que le potentiel d'exposition fœtale au BPS était similaire à celui du BPA, même si les mécanismes toxicocinétiques sont différents. Si les deux analogues structuraux ont les mêmes potentiels perturbateurs endocriniens, cela signifie que le remplacement du BPA par le BPS n'est pas une bonne alternative en terme d'exposition fœtale. Ces données toxicocinétiques serviront de base pour construire un modèle permettant de prédire l'exposition fœtale humaine au BPS pour une exposition maternelle environnementale.

## Références

- Journal of Chromatography A 2017;1526:39-46.
- Environment International 2018;120:584-592.
- Chemosphere 2019; 221: 471-478.

**Projet sélectionné dans le cadre de l'APR 2015 du PNR EST Anses.**

# Effets des phtalates sur le développement et les fonctions placentaires : impact du mono-2-éthylhexyl phtalate (MEHP) sur l'expression et l'activité de PPAR $\gamma$

**Hussein SHOAITO<sup>1</sup>, Julia PETIT<sup>2</sup>, Audrey CHISSEY<sup>1</sup>, Nicolas AUZEIL<sup>2</sup>, Jean GUIBOURDENCHE<sup>1,3,4</sup>, Sophie GIL<sup>1,3</sup>, Olivier LAPRÉVOTE<sup>2,5</sup>, Thierry FOURNIER<sup>1,3</sup>, Séverine A. DEGRELLE<sup>1,3,6</sup>**

*<sup>1</sup>Université de Paris, Inserm, UMR-S1139, <sup>3</sup>PHM, Paris ; <sup>2</sup>UMR CNRS 8638, Faculté de Pharmacie de Paris, Paris ; <sup>3</sup>Fondation PremUp, Paris ; <sup>4</sup>Département d'endocrinologie, CHU Cochin, AP-HP, Paris ; <sup>5</sup>Département de biochimie, Hôpital européen Georges Pompidou, AP-HP, Paris ; <sup>6</sup>Inovarian, Paris*

## Biographie

Après un doctorat en génétique cellulaire et moléculaire, Séverine DEGRELLE a réalisé plusieurs stages post-doctoraux (USDA (USA), Inra, Institut Cochin et Inserm) où elle a abordé des thématiques de différenciation cellulaire in vitro (fusion/invasion/migration), de signalisation des récepteurs nucléaires et toxicologie. En 2016, elle obtient son HDR en biologie cellulaire et en 2018, elle rejoint en tant que chercheur confirmé, la start-up Inovarian.

## Résumé

Les phtalates sont des contaminants environnementaux couramment utilisés comme plastifiants dans les produits à base de chlorure de polyvinyle (PVC). Récemment, l'exposition aux phtalates a été associée à des naissances prématurées, à un faible poids à la naissance et à des fausses couches qui pourraient être les conséquences d'un défaut de placentation. On ne dispose que de peu d'informations sur les mécanismes possibles reliant l'exposition maternelle aux phtalates et le développement placentaire, mais l'une des hypothèses serait l'implication du récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma). En effet, PPAR $\gamma$  joue un rôle essentiel dans le développement placentaire, en particulier dans la différenciation trophoblastique, et peut être activé par les phtalates. PPAR $\gamma$  appartient à la superfamille des récepteurs nucléaires qui régule, de manière ligand-dépendante, la transcription de gènes cibles. Des études menées chez des souris KO (déficientes en PPAR $\gamma$ ) ont démontré son rôle essentiel dans le métabolisme lipidique et le développement placentaire. Dans le placenta humain, PPAR $\gamma$  est exprimé dans le cytotrophoblaste villositaire (CTV) et est activé pendant sa différenciation en syncytiotrophoblaste. Le but de cette étude était d'étudier l'action du mono-2-éthylhexyl-phthalate (MEHP) sur l'activité de PPAR $\gamma$  pendant la différenciation in vitro des CTV en syncytiotrophoblaste, tissu essentiel du placenta humain assurant les fonctions hormonales et d'échanges entre le sang maternel et le sang fœtal.

## Matériels et méthodes

Différentes techniques d'immunofluorescence, de tests d'activité de PPAR $\gamma$ , de production d'hCG, de western blot et d'analyses lipidomiques, ont été combinées pour caractériser l'impact du MEHP à des concentrations physiologiquement pertinentes (0,1, 1 et 10  $\mu$ M) sur des cultures de CTV isolés à partir de placentas à terme humains.

## Résultats

Les doses de 0,1  $\mu$ M et de 1  $\mu$ M de MEHP ont montré une activité significativement plus faible de PPAR $\gamma$  et une différenciation moindre des CTV par rapport aux témoins, alors qu'étonnamment, une dose de 10  $\mu$ M a eu un effet opposé. L'exposition au MEHP a inhibé la production d'hCG et modifié de façon significative la composition lipidique des trophoblastes.

## Conclusion

Cette étude suggère, pour la première fois, que le MEHP : (i) perturbe la différenciation des trophoblastes selon une courbe dose-réponse en forme de U, (ii) modifie la production de l'hormone essentielle de la grossesse (hCG) et (iii) que ces effets sont en partie médiés par le récepteur nucléaire PPAR $\gamma$ . En conclusion les phtalates agissent donc comme des perturbateurs endocriniens dans le placenta humain.

## Références

- H. Shoaito, J. Petit, A. Chissey, J. Guibourdenche, S. Gil, O. Laprévote, T. Fournier, SA. Degrelle. The Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma (PPAR $\gamma$ ) in Mono(2-ethylhexyl) Phthalate (MEHP)-Mediated Cytotrophoblast Differentiation. *Environ Health Perspect.* Feb;127(2):27003 (2019)
- SA. Degrelle, T. Fournier. Fetal-Sex determination of human placental tissues. *Placenta*, 61:103-105 (2018)
- SA. Degrelle, H. Shoaito, T. Fournier. New transcriptional reporters to quantify and monitor PPAR $\gamma$  activity. *PPAR Res.*; 2017: 6139107 (2017)
- SA. Degrelle, T. Fournier. Use of GATA $_3$  and TWIST immunofluorescence staining to assess *in vitro* syncytial fusion index. *Methods Mol Biol.*1710:165-171 (2018)

**Projet sélectionné dans le cadre de l'APR 2014 du PNR EST Anses.**



## Devenir et effets de polluants organiques persistants (PCB, PBDE) sur la reproduction des poissons, le développement et la survie de la descendance

**Marie-Laure BÉGOUT<sup>1</sup>, Sébastien ALFONSO<sup>1</sup>, Khaled HORRI<sup>1</sup>, Farida AKCHA<sup>1</sup>, Salima AROUA<sup>2</sup>, Laurence BESSEAU<sup>3</sup>, Julien BOBE<sup>2</sup>, Gilbert DUTTO<sup>1</sup>, Bruno ERNANDE<sup>1</sup>, Eric GASSET<sup>1</sup>, Thibaut LARCHER<sup>4</sup>, Jean-Jacques LAREYRE<sup>5</sup>, Véronique LOIZEAU<sup>1</sup>, Elodie MAGNANOU<sup>3</sup>, David MAZURAS<sup>1</sup>, Catherine MUNSCHY<sup>1</sup>, Ariana SERVILI<sup>1</sup>, José ZAMBONINO<sup>1</sup>, Xavier COUSIN<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Ifremer L'Houmeau/Boulogne/Brest/Nantes/Palavas-les-flots ; <sup>2</sup>UMR-I 02 SEBIO INERIS-URCA-ULH, Le Havre ; <sup>3</sup>UMR BIOM CNRS-UPMC, Banyuls ; <sup>4</sup>INRA, ONIRIS APEX, Nantes ; <sup>5</sup>INRA LPGP, Rennes

## Biographie

Chercheuse à l'Ifremer depuis 2002, Marie-Laure BÉGOUT développe des recherches sur les capacités adaptatives des téléostéens face aux perturbations environnementales. Dans le cadre de ce projet qu'elle a coordonné, elle a plus particulièrement étudié les conséquences d'une exposition à des polluants organiques persistants en termes d'altérations comportementales et moléculaires multi- et transgénérationnelles.

## Résumé

Parmi les polluants organiques persistants (POP), les PCB (polychlorobiphényles) bien qu'interdits depuis plusieurs décennies, et les PBDE (polybromodiphényléthers) d'usage plus récent et considérés comme émergents, sont présents de façon ubiquiste dans l'environnement sous forme de mélanges de différents congénères dont les proportions relatives dépendent de leurs sources et de leur devenir, incluant leur dégradation. Le projet Fish'N'POPs avait deux objectifs : 1) mesurer les effets à long terme chez les poissons d'une exposition par voie alimentaire à ces polluants en mélanges pertinents sur le plan environnemental en étudiant i) les fonctions impactant le recrutement (reproduction et survie de la descendance) ; ii) le devenir de ces polluants et les mécanismes gouvernant la distribution des polluants dans l'organisme; iii) le transfert vers les œufs et les effets sur plusieurs générations et iv) en utilisant la modélisation énergétique, de dynamique des populations et de l'évolution des traits biologiques ; 2) comprendre les mécanismes d'action moléculaires sous-jacents.

## Matériels et méthodes

Fish'N'POPs a mené une approche expérimentale chez la sole (*Solea solea*) pour laquelle nous disposons de géniteurs exposés à ces POP depuis 2008 qui ont permis d'évaluer les effets sur la reproduction d'une espèce longévive, et le poisson zèbre (*Danio rerio*), espèce modèle à cycle de vie court, qui a permis d'évaluer les effets sur l'ensemble du cycle de vie et sur plusieurs générations tout en permettant de préciser les mécanismes sous-jacents aux altérations physiologiques observées. La distribution des polluants dans l'organisme a été déterminée ainsi que leurs transferts aux œufs. Enfin, nous avons évalué, par des expériences dédiées et de la modélisation, comment ces effets pourraient induire des changements dans la structure et la dynamique des populations.

## Résultats et conclusions

Chez les deux espèces étudiées, nous avons mis en évidence :

- des perturbations endocriniennes et de la reproduction chez les poissons exposés ;
- un transfert maternel vers les œufs suivi d'une dilution forte par la croissance ;
- des altérations significatives de la survie et des capacités d'adaptation physiologiques et comportementales chez les F1 (première génération de géniteurs).

Nous avons utilisé le poisson zèbre pour évaluer la persistance de ces altérations chez les générations suivantes. Nous avons montré des modifications significatives des réponses comportementales à des challenges chez les larves sur quatre générations issues de parents exposés (F1 à F4) et chez les adultes (F1 et F2). L'analyse de l'expression de gènes impliqués dans la régulation de la méthylation de l'ADN suggère l'implication de mécanismes épigénétiques. Fish'N'POPs a montré des effets démographiques de l'exposition directe (réallocation d'énergie vers la croissance au détriment de la reproduction) qui se surajoutent aux performances altérées de la descendance et permettront d'évaluer la perte de productivité potentielle des populations exposées aux POP.

## Publications issues de ce programme

-Alfonso S., Blanc M., Joassard L., Keiter S. H., Munschy C., Loizeau V., Bégout M.L., Cousin X. (2019). Examining multi- and transgenerational behavioral and molecular alterations resulting from parental exposure to an environmental PCB and PBDE mixture. *Aquatic Toxicology*, 208, 29-38. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.12.021>

-Horri K., Alfonso S., Cousin X., Munschy C., Loizeau V., Aroua S., Bégout M.L., Ernande B. (2018). Fish life-history traits are affected after chronic dietary exposure to an environmentally realistic marine mixture of PCBs and PBDEs. *Science of the Total Environment*, 610-611, 531-545. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.083>

-Munschy C., Bely N., Heas Moisan K., Olivier N., Loizeau V. (2017). Tissue-specific distribution and maternal transfer of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and their metabolites in adult common sole (*Solea solea* L.) over an entire reproduction cycle. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 145, 457-465. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.07.062>

**Projet financé par l'ANR dans le cadre de l'appel à projets CESA (contaminants et environnements) 2013.**

# Effets d'un substitut potentiel du bisphénol A, le BADGE, sur le développement des cellules germinales fœtales chez la souris et l'homme

**Delphine MOISON<sup>1</sup>, Sonia ABDALLAH<sup>1</sup>, Juliette BORDERIES<sup>1</sup>, Nolan TUAL<sup>1</sup>, Sébastien MESSIAEN<sup>1</sup>, Stéphanie POZZI-GAUDIN<sup>2</sup>, Alexandra BENACHI<sup>2</sup>, René HABERT<sup>1</sup>, Gabriel LIVERA<sup>1</sup>, Virginie ROUILLER-FABRE<sup>1</sup>, Marie Justine GUERQUIN<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratoire de développement des Gonades/UMR Stabilité génétique cellules souches et radiations Université de Paris, CEA, Fontenay-aux-Roses ; <sup>2</sup>Service de gynécologie-obstétrique et médecine de la reproduction, Hôpital A. Bécclère, Université Paris Sud

## Biographie

Virginie ROUILLER-FABRE est professeur à l'Université Paris Diderot. Elle exerce son activité de recherche au sein du Laboratoire de développement des Gonades où elle étudie les effets des polluants environnementaux sur la différenciation des gonades. Depuis 2003, elle a développé une collaboration avec le service de gynéco- obstétrique de l'hôpital A. Bécclère afin d'étudier les fonctions gonadiques chez le fœtus humain. Elle s'est intéressée, notamment, aux perturbations induites par des perturbateurs endocriniens (phtalates, BPA et substituts du BPA).

## Résumé

De nombreux travaux ont montré que les cellules germinales (CG) fœtales sont impactées par l'exposition au bisphénol A (BPA). En 2015 le BPA a été interdit en France dans tous les contenants alimentaires. Le BADGE est un analogue structural du BPA proposé comme un substitut, pourtant son innocuité n'a pas été testée. L'objectif de notre projet est 1- d'étudier les effets du BADGE sur les cellules germinales (CG) mâles et femelles murines et humaines et 2- de déterminer les mécanismes d'action impliqués.

## Matériels et méthodes

Notre projet s'articule autour de deux grands axes. Le premier axe repose sur l'exposition *in vivo* au BADGE de souris gestantes. Le BADGE est dilué dans l'eau de boisson afin d'atteindre une concentration sérique moyenne de 10-8M. Le deuxième axe concerne les gonades fœtales humaines. Les fœtus sont issus d'interruptions volontaires de grossesse et sont obtenus grâce à la collaboration avec le service de gynécologie obstétrique de l'hôpital Antoine Bécclère. Leurs gonades sont greffées dans le muscle du dos de souris immunodéficientes exposées au BADGE par l'eau de boisson.

## Résultats

Chez la souris, nous avons observé qu'une exposition fœtale au BADGE induisait des altérations germinales à l'âge adulte. Nous observons notamment une diminution significative du nombre de follicules ainsi qu'une augmentation du nombre d'ovocytes aneuploïdes chez la femelle et une diminution du nombre de spermatogonies et une tendance à la diminution du nombre de spermatozoïdes chez le mâle. Il semblerait que ces altérations adultes mâles et femelles aient la même origine et découlent d'une altération de la différenciation fœtale des CG. Cette différenciation caractérisée par l'entrée en méiose (femelle) et l'entrée en quiescence mitotique (mâle) est retardée au profit d'un maintien des CG à l'état pluripotent et prolifératif. Par analyses transcriptomiques, nous observons une altération de gènes communs aux deux sexes associée à la différenciation germinale, une augmentation du stress oxydatif et une modification épigénétique des CG.

Enfin, de façon importante, dans les ovaires humains xéno greffés exposés au BADGE, nous observons des altérations similaires à celles décrites ci-dessus puisque nous visualisons une diminution du nombre de CG et un retard d'entrée en méiose.

## Conclusion

D'ores et déjà, nous avons montré que le BADGE affecte les CG femelles et mâles murines de manière similaire au BPA. Cette étude montre notamment que des altérations chez l'adulte découlent d'altération de différenciation germinale très précoce.

## Références

-Lambrot R\*, Muczynski V\*, Lécureuil C, Angenard G, Coffigny H, Pairault C, Moison D, Frydman R, Habert R & Rouiller-Fabre V (2009) Phthalates impair germ cell development in the human fetal testis *in vitro* without change in testosterone production. *Environ Health Perspect.* 117 : 32-37

-N'tumba-byn T, Moison D, Lacroix M, Lecureuil C, Lesage L, Prud'homme SM, Pozzi-Gaudin S, Frydman R, Benachi A, Livera G, Rouiller-fabre V\*, Habert R\*. (2012). Differential effects of bisphenol A and diethylstilbestrol on human, rat and mouse fetal leydig cell function. *PLoS One.*;7(12):e51579. doi: 10.1371

-Eladak S, Grisin T, Moison D, Guerquin MJ, N'tumba-Byn T, Pozzi-Gaudin S, Benachi A, Livera G, Rouiller-Fabre V\*, Habert R\* (2015) A new chapter in the bisphenol A story: bisphenol S and bisphenol F are not safe alternatives to this compound. *Fertil Steril.* Jan; 103(1):11-21.

-Frydman N, Poulain M, Arkoun B, Duquenne C, Tourpin S, Messiaen S, Habert R, Rouiller-Fabre V, Benachi A, Livera G.(2017) Human fetal ovary shares meiotic preventing factors with the developing testis. *Hum Reprod.* Jan 9. doi: 10.1093/humrep/dew343

-Eladak\* S., Moison\* D., Guerquin M.-J., Matilionyte G., Kilcoyne K., N'tumba-Byn T., Messiaen S., Deceuninck Y., Pozzi-Gaudin S., Benachi A., Livera G., Antignac J.-P., Mitchell R., Rouiller-Fabre\* V., Habert\* R. (2018). Effects of environmental Bisphenol A exposures on germ cell development and Leydig cell function in the human fetal testis. *PLoS One.* 2018 Jan 31;13(1)

Projet sélectionné dans le cadre de l'APR 2015 du PNR EST Anses.



## Contribution à l'évaluation de l'exposition de l'Homme aux substituts et dérivés du bisphénol A et à la caractérisation du danger associé

**Jean-Philippe ANTIGNAC<sup>1</sup>, Yoann DECEUNINCK<sup>1</sup>, Alain BERREBI<sup>2</sup>, Ronan CARIOU<sup>1</sup>, Emmanuelle BICHON<sup>1</sup>, Daniel ZALKO<sup>3</sup>, Bruno LE BIZEC<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>LABERCA, UMR 1329 Oniris-INRA, Nantes ; <sup>2</sup>Service de gynécologie-obstétrique, CHU Paule-de-Viguier, Toulouse, France ; <sup>3</sup>INRA, UMR1331, Toxalim, Research Centre in Food Toxicology, Toulouse, France

## Biographie

Ingénieur de recherche INRA et responsable scientifique du Laboratoire d'étude des résidus et contaminants dans les aliments (LABERCA), Jean-Philippe ANTIGNAC a pour domaine de compétence la chimie analytique appliquée à la sécurité chimique des aliments et à la santé environnementale. Il intervient dans plusieurs projets de recherche visant à caractériser les niveaux d'exposition interne des populations aux contaminants chimiques, en particulier de type perturbateurs endocriniens, et à étudier le lien entre cette exposition et certains troubles de santé. Il est membre de comités d'expert pour l'Anses (perturbateurs endocriniens, indicateurs biologiques d'exposition) et coordonne la composante « Emerging Chemicals » du projet Européen HBM4EU.

## Résumé

Le bisphénol A (BPA) suscite toujours un débat relatif à ses propriétés de perturbateur endocrinien et *in fine* au risque associé pour l'Homme. L'étude d'autres substances employées comme substituts / alternatives du BPA apparaît toutefois comme une priorité considérant le manque de données nécessaires pour l'évaluation du risque associée. Les composés ciblés prioritairement dans ce projet ont été deux principaux substituts/dérivés du BPA : le bisphénol S et le bisphénol A diglycidyl ether (BADGE). Son ambition était de générer de nouvelles connaissances relatives à (i) leur biotransformation et leur impact biologique au niveau de la fonction hépatique chez l'Homme (ii) leur biotransformation et leur impact sur la fonction de reproduction chez l'Homme, (iii) leur mode d'action au niveau moléculaire via des mécanismes de liaison/transactivation aux principaux récepteurs nucléaires, (iv) la caractérisation de l'exposition de l'Homme à ces substances. Un ensemble secondaire de composés (analogues du BPA incluant bisphénol B, C, E, F, M, AP et AF) a également été considéré pour les volets concernant l'exposition de l'Homme et l'étude des modes d'action.

## Matériels et méthodes

La détermination quantitative des niveaux d'exposition de la sous-population étudiée a été basée sur des technologies analytiques de type chromatographie couplée à la spectrométrie de masse en tandem. Les études de métabolisme ont été basées sur le suivi du devenir du BPS et du BADGE radio-marqués (<sup>14</sup>C) dans plusieurs systèmes cellulaires hépatiques à la fois humains et de rat. Une approche de profilage métabolomique non ciblé a été conduite pour explorer les voies métaboliques perturbées par l'exposition à ces contaminants, à la fois par résonance magnétique nucléaire et spectrométrie de masse haute résolution, associée à une modélisation des réseaux métaboliques impliqués dans ces perturbations. Des tests de liaison / transactivation impliquant un large ensemble de récepteurs nucléaires a enfin été effectué.

## Résultats et conclusion

Les concentrations de 18 bisphénols ont été déterminées dans une centaine de prélèvements de sérum maternel, sérum du cordon, et lait maternel collectés chez des couples mères-enfant volontaires de la région Toulousaine. L'exposition et le transfert (composé dépendant) de la mère au fœtus et à l'enfant allaité ont été confirmés. Le BPF, le BPA et le BPS sont apparus comme les principaux contributeurs de cette exposition, dans un rapport d'environ 10/1/0.1 respectivement. Des métabolites hydroxylés et glucuronides ont été identifiés pour le BPS. Des perturbations du métabolome et du lipidome consécutive à cette exposition aux bisphénols ont été révélées, qui doivent être confirmées et approfondies au plan mécanistique.

## Références

- Le Fol V, Aït-Aïssa S, Cabaton N, Dolo L, Grimaldi M, Balaguer P, Perdu E, Debrauwer L, Brion F, Zalko D. Cell-specific biotransformation of benzophenone-2 and bisphenol-s in zebrafish and human *in vitro* models used for toxicity and estrogenicity screening. *Environ Sci Technol.* 17;49(6):3860-3868, 2015.
- Khoury L, Zalko D, Audebert M. Evaluation of four human cell lines with distinct biotransformation properties for genotoxic screening. *Mutagenesis.* 31(1):83-96, 2016.
- Ben Maamar M\*, Lesné L\*, Desdoits-Lethimonier C, Coiffec I, Lassurguère J, Lavoué V, Deceuninck Y, Antignac JP, Le Bizec B, Perdu E, Zalco D, Pineau C, Chevrier C, Dejuq-Rainsford N, Mazaud-Guittot S and Jégou B. (2015) An investigation of the endocrine-disruptive effects of Bisphenol A in human and rat fetal testes. *PLoS One*; 10(2):e0117226. (\* co-autorats).
- Desdoits-Lethimonier C, Lesné L, Gaudriault P, Mazaud-Guittot S, Zalco D, Antignac JP, Platel C, Dejuq-Rainsford N, Jégou B. Parallel assessment of the effects of bisphenol A and several of its analogs on the adult human testis. *Human Reproduction*, 2017;32(7):1465-1473. <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/dex093>.
- Antignac JP, Deceuninck Y, Berrebi A, Cariou R, Zalko D, Bichon E, Le Bizec B. Levels of bisphenol A and substitutes BPS and BPF in breast milk, maternal and cord serum of French women and their newborns. *Environment International*, manuscript in preparation.

**Projet financé par l'ANR dans le cadre de l'appel à projets CESA (contaminants et environnements) 2013.**

# Session 2 – Mécanismes d'action : faibles doses et mélanges

**Modérateurs : Patrick BALAGUER, Institut de recherche en cancérologie de Montpellier (IRCM), INSERM U1194 & Claude EMOND, Université de Montréal**

## Les récepteurs alternatifs du bisphénol A et des xénoestrogènes : pertinence sur la perturbation endocrinienne

***Jean-Marc VANACKER<sup>1</sup>, Vincent LAUDET<sup>2</sup>, Frédéric FLAMANT<sup>1</sup>***

*<sup>1</sup>Institut de génomique fonctionnelle, Lyon ; <sup>2</sup>Observatoire océanologique, Banyuls-sur-Mer*

### **Biographie**

Jean-Marc VANACKER, Directeur de recherche CNRS, Institut de génomique fonctionnelle de Lyon CNRS UMR5242 ; Ecole normale supérieure de Lyon, Responsable de l'équipe « Physiopathologie des récepteurs nucléaires orphelins ».

### **Résumé**

Les xénoestrogènes sont des perturbateurs endocriniens qui compromettent de nombreuses fonctions biologiques, y compris le développement des organes sexuels mais aussi le métabolisme et le développement embryonnaire. Il existe de nombreux types de xénoestrogènes, présents dans les pesticides, les substances végétales naturelles, les plastifiants... et leur toxicité est plus ou moins bien caractérisée. L'un des plus connus est le bisphénol A (BPA) utilisé pour la fabrication industrielle de plastiques. Il est généralement admis que les xénoestrogènes agissent comme agonistes des récepteurs nucléaires aux œstrogènes, ER $\alpha$  et ER $\beta$ . Cependant, plusieurs données récentes ont suggéré qu'il pourrait y avoir d'autres modes d'action de ces molécules. En particulier, deux voies de signalisation alternatives ont été considérées : (i) un récepteur membranaire, GPER/GPR30, qui active la voie des kinases ERK. Le BPA est ainsi capable d'interagir avec ce récepteur membranaire et de l'activer à des concentrations de 100nM ; (ii) le récepteur nucléaire orphelin ERR $\gamma$  pour lequel une affinité forte a été montrée pour le BPA (5,5 nM). L'existence de voies alternatives a rarement été envisagée pour l'étude du mode d'action des xénoestrogènes bien que ces modes d'action alternatifs pourraient expliquer certains effets à faible dose ainsi que l'existence de courbes doses/réponses non monotones parfois observées. Pour une évaluation correcte des risques des xénoestrogènes, il est donc essentiel de clarifier la pertinence de ces cibles alternatives.

Dans ce projet nous avons combiné des tests simples pour établir le mode d'action d'une série de xénoestrogènes sur ces deux voies médiées par ERR $\gamma$  et GPER. Nous avons ainsi mis en place un crible simple permettant de tester si les xénoestrogènes agissent via ERR $\gamma$  chez le poisson zèbre : en exposant des embryons pendant 48 heures avec un xénoestrogène et en observant au microscope les otolithes présents dans la vésicule otique, nous pouvons conclure si le composé active ou non ERR $\gamma$ . En ce qui concerne GPER, nous avons mis en évidence un effet médié par ce récepteur sur la forme de fibroblastes de peau humaine en primoculture. Ainsi, l'analyse de la forme de ces cellules, après exposition à un xénoestrogène, peut être quantifiée de manière précise, et constitue la base d'un crible efficace. Cette partie de sélection a été complétée par l'analyse du transcriptome contrôlé par chaque voie de façon à mieux comprendre les réseaux de régulation contrôlés par chacune d'entre elle. Cette approche permet, en effet, de découvrir de nouveaux biomarqueurs et de détecter les effets indépendants des trois voies de signalisation.

Ces analyses couplées permettent de détecter rapidement le potentiel toxique de molécules et de caractériser de nouveaux biomarqueurs d'exposition spécifiques de chacune de ces voies.

## Références

-Tohmé M, Prud'homme SM, Boulahtouf A, Samarut E, Brunet F, Bernard L, Bourguet W, Gibert Y, Balaguer P, Laudet V. Estrogen Related Receptor gamma is an *in vivo* receptor of Bisphenol A. *FASEB J.* 2014, 28: 3124-33.

-Laudet V. and Livera G. BPA signaling through non-canonical receptors in "Bisphenol A: Sources, Risks of Environmental Exposure and Human Health Effects" edited by Yann Gibert / Nova Science publisher (NY, USA) 2014

-Carnesecchi J, Malbouyres M, de Mets R, Balland M, Beauchef G, Vié K, Chamot C, Lionnet C, Ruggiero F, Vanacker JM. Estrogens induce rapid cytoskeleton re-organization in human dermal fibroblasts *via* the non-classical receptor GPR30. *PLoS One.* 2015, 10(3):e0120672.

**Projet sélectionné dans le cadre de l'APR 2015 du PNR EST Anses.**



## Approches intégrées pour évaluer les effets des progestatifs chez les poissons et leurs occurrences environnementales

**François BRION ; Sélim AÏT-AÏSSA<sup>1</sup> ; Patrick BALAGUER<sup>2</sup>, Hélène BUDZINSKI<sup>3</sup>, Joel CANO-NICOLAU<sup>4</sup>, Nicolas CREUSOT<sup>1-2</sup>, Caroline GARDIA-PARÈGE<sup>3</sup>, Clémentine GAROCHE<sup>1</sup>, Nathalie HINFRAY<sup>1</sup>, Olivier KAH<sup>4</sup>, Elisabeth PELLEGRINI<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>INERIS, Unité ECOT, UMR-I 02, Verneuil-en-Halatte ; <sup>2</sup>Inserm, U1194, Montpellier ; <sup>3</sup>UMR CNRS 5805 EPOC-LPTC, Bordeaux ; <sup>4</sup>Irset, Inserm UMRS 1085, Rennes

### Biographie

François BRION, chercheur au sein de l'unité d'écotoxicologie *in vitro* et *in vivo* de l'Ineris, développe depuis 20 ans des activités pour évaluer les effets des perturbateurs endocriniens sur le développement et la reproduction des poissons. Il a coordonné et participé à plusieurs programmes de recherche nationaux (PNRPE, ANR, Anses) et européens (FP7, H2020) ainsi qu'au développement d'une nouvelle ligne directrice à l'OCDE. Il est (co)-auteur de 73 publications de rang A et a encadré 9 thèses.

### Résumé

Les progestatifs de synthèse représentent un ensemble de substances utilisées en médecine humaine et vétérinaire dont certains sont quantifiés dans les milieux aquatiques à des concentrations faibles. Cependant, il existe peu d'information sur les mécanismes, les effets et l'exposition des organismes aux progestatifs qu'il est nécessaire d'acquérir pour en évaluer les dangers et les risques pour les espèces aquatiques. Dans ce contexte, le projet PROOFS visait à acquérir des informations nouvelles sur les modes d'actions et les effets potentiels de progestatifs sur le neuro-développement et la reproduction des poissons mais également à renseigner l'occurrence des activités progestatives et identifier les composés responsables de ces activités biologiques dans le milieu.

## Matériels et méthodes

Des bio-essais *in vitro* et *in vivo* basés sur les mécanismes d'action des substances a été utilisé pour évaluer la capacité de 26 progestatifs à interagir avec des récepteurs nucléaires stéroïdiens et à déréguler l'expression de gènes chez l'embryon de poisson zèbre (*cyp19a1b*-GFP et *cyp11c1*-GFP). La mesure de marqueurs de prolifération et de survie cellulaire visait à investiguer les effets d'une exposition à des ligands du récepteur PR sur le cerveau. Une approche EDA (Effect Directed Analysis) couplant outils biologiques et analyses chimiques visait à quantifier les activités progestagéniques d'échantillons environnementaux et identifier les substances responsables de ces activités.

## Résultats

L'étude de l'interaction d'un ensemble de 26 progestatifs sur différents récepteurs nucléaires humain et de poisson zèbre a permis de mettre en évidence la multiplicité d'action de ces composés ainsi que des différences inter-espèces majeures. Ces mécanismes moléculaires se traduisent chez l'embryon par des dérégulations précoces de l'expression de gènes hormono-régulés. Ces altérations s'accompagnent de modifications de la survie et/ou la prolifération neuronale ainsi que de la capacité des embryons à synthétiser du cortisol. La bioanalyse de matrices environnementales couplée à de la chimie non ciblée a permis de mettre en évidence des activités progestagéniques dans les eaux usées urbaines et hospitalières en révélant des activités spécifiques pour le récepteur PR de poisson zèbre et d'identifier des pharmaceutiques potentiellement impliquées dans ces réponses.

## Conclusion

PROOFS a permis l'acquisition d'un ensemble de données et de connaissances originales sur les dangers des progestatifs de synthèse sur le système endocrinien des poissons ainsi que sur l'occurrence environnementale d'activités biologiques associées à des ligands du récepteur PR (récepteur de la progestérone). À la lumière de ces travaux, il est nécessaire de poursuivre des actions de recherche sur ces polluants aquatiques émergents pour en évaluer les risques.

## Références

- Cano-Nicolau J, Garoche C, Hinfray N, Pellegrini E, Boujrad N, Pakdel F, Kah O, Brion F. (2016) Several synthetic progestins disrupt the glial cell specific-brain aromatase expression in developing zebra fish. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 15; 305:12-21.
- Hinfray N, Tebby C, Garoche C, Piccini B, Bourguin G, Aït-Aïssa S, Kah O, Pakdel F, Brion F. (2016). Additive effects of levonorgestrel and ethinylestradiol on brain aromatase (*cyp19a1b*) in zebrafish specific *in vitro* and *in vivo* bioassays. *Toxicology and Applied Pharmacology* 15; 307:108-14.
- Garoche C, Aït-Aïssa S, Creusot N, Boulahtouf A, Balaguer P, Brion F. Human and zebrafish nuclear progesterone receptors are differently activated by progestins (submitted)
- C.Vaillant, T.Charlier, M.M.Gueguen, O.Kah, F.Brion, E.Pellegrini. Neurodevelopmental effects of natural and synthetic ligands of estrogen and progesterone receptor in zebrafish eleutheroembryos (submitted).

**Projet financé par l'ANR dans le cadre de l'appel à projets CESA (contaminants et environnements) 2013.**

# Rôle du récepteur Ah et effets de ses ligands sur le système nerveux

**Mathieu BERANECK<sup>1,3</sup>, Charbel MASSAAD<sup>2,3</sup>, Xavier COUMOUL<sup>2,3</sup>**

<sup>1</sup>CNRS UMR 8002 INCC, Paris ; <sup>2</sup>Inserm UMR-S 1124 T3S, Paris ; <sup>3</sup>UFR Sciences fondamentales et biomédicales, Centre universitaire des St-Pères, Université de Paris

## Biographie

Mathieu BERANECK est chercheur en neurosciences, spécialiste des systèmes sensorimoteurs et oculomoteurs, et responsable de l'équipe CNRS "Orientation spatiale". Il travaille sur le sens de l'équilibre et sur les processus d'intégration multi sensorielle. Ses travaux ont contribué à la description de voies fréquentielles de traitement de l'information vestibulaire. Ses recherches actuelles portent sur l'intégration visuo-vestibulaire et sur l'étude de pathologies de l'oreille interne.

## Résumé

### AhR, un récepteur de polluants, clé du développement du système nerveux

**Des liens entre pollutions et perturbations du développement du système nerveux de plus en plus évidents** : la base de ce projet repose sur des expériences réalisées sur la souris montrant que l'inactivation d'un gène unique, le récepteur Ah (ou AhR), provoque l'apparition d'une instabilité oculaire. Notre consortium a caractérisé le rôle du AhR dans le développement du système nerveux périphérique et central à l'aide d'approches cellulaires, moléculaires et comportementales sur des modèles cellulaires et animaux. Nous avons réalisé une comparaison des données obtenues avec celles récoltées sur un modèle équivalent mais exposé pendant la période de gestation / lactation à la dioxine de Seveso qui active normalement AhR, car une de nos hypothèses étaient que cette dioxine agit comme un suppresseur de fonctions endogènes du récepteur, comme ce qui est observé lors de perturbations endocriniennes).

### Un modèle idéal d'étude : la souris « knock-out »

Cette souris ne présente qu'une différence avec une souris normale : elle n'exprime plus le récepteur aux polluants ce qui permet d'évaluer son rôle endogène, et ce à l'aide de nombreuses approches expérimentales couvrant tous les niveaux d'études : comportement, physiologie, biologie cellulaire, moléculaire, génétique. Nous avons ainsi réalisé des tests comportementaux, de la vidéo-oculographie, des marquages anatomiques de nerfs optiques (NO) associés à de la microscopie électronique (révélant notamment les structures fines des nerfs), mesure de la transmission de l'information électrique de la rétine jusqu'au cortex visuel, caractérisation de marqueurs à large échelle de ces mêmes nerfs, analyses moléculaires. Nous avons également isolé les cellules qui forment la gaine entourant les neurones clés du nerf optique et étudié leur différenciation, ainsi que plusieurs marqueurs.

## Résultats

La souris AhR KO est un modèle d'instabilité oculaire associé à une anomalie de la gaine de myéline des nerfs optiques et à une inflammation dérégulant un élément de cette gaine, la protéine MAG. Ce déficit s'observe dans le SN central et périphérique. En parallèle, nous avons montré une altération des capacités motrices & un déficit d'intégration sensorimotrice sur une tâche de réflexes auditif des souris KO. De plus, les résultats obtenus sur le SN périphérique nous ont conduit à étudier des cancers, les neurofibromes plexiformes, dans lesquels nous avons montré que le AhR est surexprimé.

Les perspectives sur le plan sociétal sont importantes car peu d'études sont actuellement réalisées dans ce domaine (pollution et neuro-développement) qui constitue pourtant une question clé de santé publique. Une conséquence directe de nos travaux est l'identification récente chez l'homme d'une mutation du AhR comme cause directe d'une hypoplasie fovéale et d'un nystagmus congénital.

## Références

- The Aryl Hydrocarbon Receptor and the Nervous System. Juricek L, & Coumoul X. Int J Mol Sci. 2018
- The involvement of Aryl hydrocarbon receptor in myelination and in human nerve sheath tumorigenesis. Shackelford GG *et al.* PNAS 2018.
- AhR-deficiency as a cause of demyelinating disease and inflammation. .Juricek L, *et al.* Scientific Reports 2017
- Oculomotor deficits in aryl hydrocarbon receptor null mouse. Chevallier, A. *et al.* PLoS ONE 2013.

Projet financé par l'ANR dans le cadre de l'appel à projets CESA (contaminants et environnements) 2013.



## Effets d'une exposition au bisphénol S et au bisphénol F par voie transcutanée versus orale, sur le développement des réponses immunitaires : comparaison avec le bisphénol A

**Laurence GUZYLACK-PIRIOU<sup>1</sup>, Yann MALAISE<sup>1</sup>, Sandrine MENARD<sup>1</sup>, Lydie SPARFEL-BERLIVET<sup>2</sup>, Sylvie BORTOLI<sup>3</sup>, Xavier COUMOUL<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>NGN, INRA Toxalim Toulouse ; <sup>2</sup>IRSET, Université de Rennes 1 ; <sup>3</sup>Inserm UMRS 1124, Université Paris Descartes

### Biographie

Laurence GUZYLACK-PIRIOU est titulaire d'un doctorat en immunologie obtenu en 2002 à l'université de Rennes 1 sous la direction scientifique de E. Albina. Après 7 années d'expérience post-doctorale en Suisse à l'IVI dirigé par A. Summerfield, elle a rejoint l'équipe d'I. Oswald dans l'unité de l'INRA de Toulouse en 2009 pour se concentrer sur l'impact des contaminants environnementaux sur la réponse immunitaire. Elle possède une expertise sur le système immunitaire local (intestin) et systémique, dans des conditions normales et pathologiques. Elle étudie l'impact sur le système immunitaire de diverses classes de xénobiotiques, contaminant les aliments. Elle étudie différents âges d'exposition et accorde une attention particulière à la période périnatale. Elle a démontré l'impact délétère d'une exposition périnatale à faible dose au bisphénol A (BPA), sur la barrière épithéliale intestinale, l'inflammation et la tolérance orale de la descendance. Ses travaux de recherche ont fait l'objet de nombreux rapports dans des conférences nationales et internationales et de publications dans des revues scientifiques à comité de lecture (> 35 articles).

### Résumé

Outre leurs utilisations dans des conditionnements alimentaires, les bisphénols (BP) sont des perturbateurs endocriniens (PE) aussi utilisés dans les papiers à impression thermique. L'effet de l'exposition périnatale au bisphénol A sur le système immunitaire est un problème relativement nouveau. Des études effectuées sur des animaux ont suscité des inquiétudes particulières concernant le risque d'intolérance alimentaire et l'augmentation de la vulnérabilité aux infections. Nous avons suggéré que les bisphénols A, S et F après exposition périnatale, administrés par voie orale ou cutanée, pouvaient interférer avec le système immunitaire en cours de maturation.

## Matériels et méthodes

Les souris gestantes ont été gavées ou exposées par voie cutanée avec 5 ou 50 µg BPA/BPS ou BPF/kg de poids corporel (PC)/jour à partir du quinzième jour de gestation jusqu'au sevrage des nouveau-nés. Les paramètres immunologiques systémiques et intestinaux, les défenses intestinales et la survenue de troubles métaboliques à l'âge adulte et au vieillissement ont été évalués chez la descendance.

## Résultats

Suite à une exposition périnatale orale au bisphénol A, la descendance femelle adulte (J45) montre un affaiblissement marqué de la fonction « barrière » de l'intestin avec une augmentation de sa perméabilité épithéliale. Au niveau de la lamina propria (LP), une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires IFN-γ et IL-17 dans l'intestin, accompagnée d'un profil type Th17 dans la rate est observée. Chez la descendance mâle, l'exposition périnatale orale au BPA induit des déséquilibres immunitaires intestinaux et systémiques à J45. Ces effets précoces sont associés à une perte de tolérance au glucose. Avec le vieillissement, l'exposition périnatale au bisphénol A entraîne une infiltration de macrophages pro-inflammatoires dans le tissu adipeux, une diminution de la sensibilité à l'insuline et une augmentation de la prise de poids. Toutes ces perturbations sont spécifiques de l'obésité et du diabète de type 2 et confortent les études identifiant le BPA comme facteur contribuant à l'épidémiologie des troubles métaboliques. En comparaison, l'exposition périnatale au bisphénol S ou bisphénol F administré à 5 ou 50 µg/kg pc/jour que ce soit par voie orale ou cutanée, induit chez la descendance femelle, un profil inflammatoire Th1/Th17 dans la LP ainsi qu'au niveau systémique, avec une diminution des cellules T régulatrices dans les deux compartiments.

## Conclusion

En conclusion, l'exposition périnatale orale ou cutanée aux bisphénols affaiblit les fonctions immunitaires protectrices et régulatrices intestinales et systémiques de la progéniture adulte femelle et mâle. La perturbation de l'homéostasie immunitaire vers un profil inflammatoire est une piste intéressante qui soutient les conséquences néfastes des bisphénols sur l'apparition de différentes pathologies immunitaires mais aussi métaboliques.

## Références

- Ménard S, Guzylack-Piriou L, Leveque M, Braniste V, Lencina C, Naturel M, Moussa L, Sekkal S, Harkat C, Gaultier E, Theodorou V, Houdeau E. Food intolerance at adulthood after perinatal exposure to the endocrine disruptor bisphenol A. *FASEB J.* 2014 Nov;28(11)
- Ménard S, Guzylack-Piriou L, Lencina C, Leveque M, Naturel M, Sekkal S, Harkat C, Gaultier E, Olier M, Garcia-Villar R, Théodorou V, Houdeau E. (2014). Perinatal exposure to a low dose of bisphenol A impaired systemic cellular immune response and predisposes young rats to intestinal parasitic infection. *PLoS One.* 21;9(11)
- Malaisé Y, Menard S, Cartier C, Gaultier E, Lasserre F, Lencina C, Harkat C, Geoffre N, Lakhal L, Castan I, Olier M, Houdeau E, Guzylack-Piriou L. Gut dysbiosis and impairment of immune system homeostasis in perinatally-exposed mice to Bisphenol A precede obese phenotype development. *Sci Rep.* 2017
- Malaisé Y, Ménard S, Cartier C, Lencina C, Sommer C, Gaultier E, Houdeau E, Guzylack-Piriou L. Consequences of bisphenol a perinatal exposure on immune responses and gut barrier function in mice. *Arch Toxicol.* 2018

**Projet sélectionné dans le cadre de l'APR 2015 du PNR-EST Anses.**

# Perturbateurs endocriniens : gérer les risques dans un contexte de manque d'information

**Jean-Marc BRIGNON<sup>1</sup>, Laura MAXIM<sup>2</sup>, Enrico MOMBELLI<sup>1</sup>, Doris TAN<sup>2</sup>, Jean-Christophe VERGNAUD<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Ineris, Verneuil-en-Hallate ; <sup>2</sup>ISC-CNRS, Paris ; <sup>3</sup>CES, Université de Paris 1

## Biographie

Jean-Marc BRIGNON est chef de l'unité « Économie et aide à la décision pour l'environnement » de l'Institut national de l'environnement industriel et des risques (Ineris). Il travaille sur la gestion des risques liés aux produits chimiques, à la pollution aquatique et atmosphérique, et sur les risques et bénéfices des nouvelles technologies (nouvelles énergies, nouveaux matériaux,...). Il est expert auprès de l'Agence européenne des produits chimiques, et de l'OCDE et membre du Haut conseil de la santé publique.

## Résumé

Le projet porte sur l'étude des méthodes économiques réglementaires d'aide à la décision, pour les risques liés aux perturbateurs endocriniens donc en situation de forte incertitude et de complexité dans l'évaluation des risques. Nous évaluons la faisabilité de l'analyse coûts bénéfice (ACB)<sup>1</sup> d'une décision de substitution d'un PE. L'enjeu est de voir si cette méthode est capable de guider les décideurs de façon fiable vers une substitution qui ne soit pas « regrettable », et de proposer, le cas échéant, des approches décisionnelles différentes. Nous travaillons sur ce volet à travers le cas d'étude de la substitution du bisphénol A (BPA) dans les papiers thermiques.

Malgré le recours à différentes méthodes (de type « Benchmark dose » exploitant les informations toxicologiques, ou fraction de population attribuable, ou modèles QSAR,...), il n'est possible de proposer des estimations des fractions de population présentant des effets sanitaires que pour le BPA et une seule de ses alternatives, le bisphénol S (BPS). Pour le BPS, seuls des effets sanitaires probablement peu significatifs de l'ensemble des effets potentiels sont modélisables. La représentativité du quantifiable, par rapport à l'ensemble des effets potentiels des alternatives est donc très faible. Les résultats de l'ACB ne nous paraissent donc pas robustes et exploitables pour l'aide à la décision. Plus que les incertitudes et difficultés méthodologiques de la valorisation économique des impacts, c'est le manque d'information sur les dangers et de relations doses / réponses des alternatives au BPA, par contre lui très étudié, qu'il n'a pas été possible de compenser par le recours aux méthodes alternatives (Benchmark Dose, PAF, QSAR). L'étude de l'accessibilité économique de la substitution, montre que le coût de substitution est faible pour le consommateur final, mais en situation d'incertitude sur le bilan sanitaire de la substitution, elle n'aide pas non plus le décideur.

Nous proposons donc de remplacer l'ACB par une évaluation qualitative simplifiée des niveaux de danger et d'exposition (basée notamment sur les modèles QSAR), éventuellement couplée à une analyse de l'accessibilité économique, permettant dans certains cas de parvenir à une conclusion robuste. Cette méthode ne peut prétendre régler tous les cas de substitution : si l'impact économique du coût de substitution ne peut être établi comme étant intrinsèquement acceptable, ou si (comme cela est le cas pour la substitution du BPA) le bilan sanitaire et environnemental des alternatives demeure incertain.

Il importe de poursuivre des travaux dans une optique de développer des méthodes plus simples et plus rapides de mise en œuvre des décisions concernant les produits chimiques PE, alors que la complexité de leur gestion (due à leur nombre, à l'augmentation des données disponibles et des connaissances sur leurs dangers) risque de ralentir les prises de décision.

<sup>1</sup>Règlementaire dans le cadre du règlement européen REACH

**Projet sélectionné dans le cadre de l'APR 2015 du PNR EST Anses.**

# Perturbateurs endocriniens : évaluations réglementaires au niveau européen et national

**Christophe ROUSSELLE, Léa RIFFAUT**

*Anses, Maisons-Alfort*

## Biographies

**Christophe ROUSSELLE**, vétérinaire toxicologue, est responsable de l'Unité d'évaluation des substances à la Direction de l'évaluation des risques (DER) de l'Anses, et également expert, depuis plusieurs années, au Comité scientifique pour la sécurité des consommateurs (SCCS) auprès de la Commission européenne.

**Léa RIFFAUT** est docteur en écologie, chef d'unité adjoint de l'Unité de coordination des intrants du végétal à la Direction de l'évaluation des produits réglementés (DEPR) de l'Anses.

## Résumé

L'Anses se mobilise depuis près de 10 ans sur toutes les questions relatives aux dangers et risques associés aux perturbateurs endocriniens (PE), dans le domaine de la recherche mais aussi de l'expertise dans un cadre réglementaire. Après plusieurs années de réflexions et d'échanges, la Commission européenne a défini récemment une stratégie sur la manière de considérer les PE et d'en évaluer les risques dans différents contextes réglementaires sectoriels (produits phytopharmaceutiques, biocides, chimiques, cosmétiques, etc.). Au travers de plusieurs avis, notes d'appuis scientifiques, l'agence a largement contribué à la prise de conscience de l'importance de ce sujet, et mis en pratique des évaluations de propriétés PE pour une variété de substances relevant de différents champs réglementaires (phytopharmaceutique, biocide, REACH, ...).

La France a pris les devants en adoptant dès 2014 une stratégie nationale sur les perturbateurs endocriniens (SNPE) qui a permis de structurer les activités de recherche, d'expertise et de gestion relatives à ces substances, et ce en toute transparence avec les parties prenantes. Le bilan établi par différentes inspections générales a salué les résultats de cette première SNPE, acquis pour une bonne part grâce au travail de l'Anses, qui permettent à la France d'être identifiée comme acteur de pointe sur le sujet au niveau communautaire.

Dans la continuité de la première SNPE, la nouvelle stratégie comportera à nouveau un volet dédié à l'expertise des PE potentiels. Mais, compte tenu des préoccupations des parties prenantes d'une part, et du grand nombre de substances d'intérêt d'autre part, ce volet sera précédé d'un travail de recensement des substances aux propriétés de perturbation endocrinienne en fonction des niveaux de preuve scientifique : leur priorisation est en effet indispensable pour permettre une instruction efficace et organisée des dossiers d'évaluation et de gestion réglementaire. Ce travail permettra également d'améliorer l'information et la communication autour des PE au niveau national et offrira des outils de gestion aux autorités publiques et parties prenantes concernées.

L'objet de cette intervention sera de faire le point sur toutes ces avancées et de présenter comment l'Agence, dans le cadre de la SNPE 2 et du contexte réglementaire, se prépare à poursuivre ses activités d'évaluation sur les PE, au niveau national et en interaction avec les processus communautaires.

# Session 3 – Autres effets des perturbateurs endocriniens

**Modérateurs : Luc BELZUNCES, UR 406 INRA, Avignon & Olivier KAH, Irset, Inserm UMR 1085, Rennes**

## Impact de la chlordécone sur le développement du cancer de la prostate chez un modèle animal, le rat TRAP

**François LAURENT<sup>1,2</sup>, Cécile CANLET<sup>2</sup>, Marie TREMBLAY-FRANCO<sup>2</sup>, Béatrice ROQUES<sup>2</sup>, Alain BOUSQUET-MELOU<sup>2</sup>, Mélanie LAGARRIGUE<sup>3</sup>, Charles PINEAU<sup>3</sup>, Patrick VERRANDO<sup>2</sup>, Roger RAHMANI<sup>2</sup>, Patrick BALAGUER<sup>4</sup>, Vincent CAVAILLES<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>ECOLAB UMR 5245, UPS, CNRS, ENPT ; <sup>2</sup>Toxalim, UMR 1331 INRA, UPS, ENVT, INPT ; <sup>3</sup>IRSET (PCFB) U1085, Inserm ; <sup>4</sup>IRCM (HSC), U896, Inserm

### Biographie

François LAURENT, UMR Toxalim, Toulouse. Domaine de recherche : phyto-pharmacologie des composés organiques (pesticides, polluants environnementaux). Anime depuis 2001 la cellule de xénobiochimie végétale dont la thématique est le transfert des composés organiques dans les végétaux et la vectorisation par les plantes de leurs résidus métaboliques dans les chaînes alimentaires humaine ou animale. A participé à l'ANR Chlordexco (2008-2012), WP Plant et a coordonné l'ANR Chlorprost (2012-2016), projet en lien avec la chlordécone. Coordonne actuellement le volet scientifique du projet Preamisse (FUI).

### Résumé

La pollution des sols agricoles à la chlordécone (CLD) expose la population antillaise à une contamination alimentaire par les denrées végétales, les produits animaux ou de la pêche. Des études épidémiologiques lient cette contamination à un risque accru de carcinome prostatique chez certains hommes d'origine afro-caribéenne. L'objectif de cette étude était d'étayer ce lien.

Dans un premier temps, le devenir de la [14C]-CLD chez le rat sain a été étudié dans une étude de pharmacocinétique (absorption, distribution, métabolisme et excrétion) après administration orale, puis l'impact d'une administration chronique (durant 14 semaines) de CLD sur le développement d'un carcinome prostatique a été étudié chez des rats SD porteurs d'un cancer de la prostate (rat TRAP). Les prostates ont été analysées (i) par imagerie MALDI-MS (spectrométrie de masse avec une source de désorption/ionisation par laser assistée par la matrice) pour déterminer la distribution tissulaire de la CLD ; (ii) en transcriptomique pour déterminer la modulation, par la CLD, de l'expression de gènes ; (iii) en métabolomique par RMN (résonance magnétique nucléaire) pour déterminer les modifications métaboliques du tissu prostatique. Enfin, des études cellulaires ont caractérisé les perturbations endocriniennes produites par la CLD.

La prostate élimine la CLD plus lentement que la plupart des autres organes (foie excepté) conduisant à son accumulation dans le tissu prostatique sain et mais aussi, plus spécifiquement dans les nodules tumoraux comme a pu le montrer les analyses en SM-MALDI. Ces travaux ont confirmé l'effet agoniste de la CLD sur le récepteur aux œstrogènes ER $\alpha$  et antagoniste partiel sur Er $\beta$ , ce qui favoriserait l'angiogenèse prostatique et la sur-accumulation de la CLD dans ce tissu. La CLD n'a qu'un faible impact sur l'expression des gènes, mais le faisceau des perturbations géniques va dans le sens d'une promotion tumorale. Par contre, les études métabolomiques par RMN montrent une perturbation par la CLD de la biosynthèse du NAD par l'augmentation de la dégradation de la nicotinamide dans le tissu prostatique. Cet effet, *a priori* paradoxal (réduction de la survie cellulaire), devra être explicité par des études ultérieures prenant en considération le polymorphisme spécifique des gènes prostatiques de la population afro-caribéennes.

## Références

- L Multigner L, Ndong JR, Guisti A, Romana M, Dealcroix-Maillard H, Cordier S, Jegou B, Thome J-P and Banchat P (2010). J Clin Oncol, 28, 3457-3462.
- N Clere, E Lauret, Y Malthiery, R Andriantsitohaina, S Faure (2010). Angiogenesis, 15, 745-760.

Projet financé par l'ANR dans le cadre de l'appel à projets CESA (contaminants et environnements) 2013.



## Exploration de l'exposition chronique et faible dose de molécules environnementales dans un modèle de progression tumorale du cancer du sein

**Caterina F. DONINI<sup>1,2,3,§</sup>, Myriam EL HELOU<sup>1,2,4,§</sup>, Aurélie ESCANDE<sup>5</sup>, Joël LACHUER<sup>1,2</sup>, Anne WIERINCKX<sup>1,2</sup>, Sandra GHAYAD<sup>4</sup>, Béatrice FERVERS<sup>1,2,3,\*</sup>, Vincent CAVAILLÈS<sup>6,\*</sup>, Véronique MAGUER-SATTA<sup>2,\*</sup>, Pascale A. COHEN<sup>1,2,3</sup>**

<sup>1</sup>Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France ; <sup>2</sup>CRCL-Inserm U1052-CNRS U5286, Lyon, France ; <sup>3</sup>Département Cancer et Environnement, Centre Léon Bérard, Lyon, France ; <sup>4</sup>Lebanese University, Beirut, Lebanon ; <sup>5</sup>UMR5569 (UMI UMII IRD CNRS), Montpellier, France ; <sup>6</sup>Inserm U896, Montpellier, France ; <sup>\*,§</sup> contributeurs équivalents

## Biographie

Pascale COHEN est professeure à l'université Claude Bernard Lyon 1. Elle exerce son activité de recherche au sein du Centre de recherche en cancérologie de Lyon et s'intéresse depuis 1998 aux événements moléculaires impliqués dans la plasticité cellulaire et la progression tumorale du cancer du sein. Elle a développé et coordonné le programme CLARENCE dans le cadre de son activité au sein du Département cancer et environnement du Centre de lutte contre le Cancer Léon Bérard (Lyon). Elle s'est intéressée, notamment, à l'impact de l'exposition environnementale sur la progression tumorale dans le cancer du sein.

## Résumé

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent et la principale cause de décès par cancer chez la femme. Comprendre le rôle que peut jouer l'exposition chronique à des facteurs environnementaux dans la carcinogenèse mammaire est donc de grande importance. Le projet CLARENCE a pour objectif d'explorer l'impact biologique sur la progression du cancer du sein d'une exposition faible dose et chronique d'un perturbateur endocrinien, le bisphénol A ou d'un carcinogène environnemental possédant un mécanisme d'action distinct (génotoxicité), le Benzo[a]Pyrene ou B[a]P.

## Matériels et méthodes

Le projet CLARENCE tente de répondre à cette question fondamentale : est-ce que l'exposition environnementale favorise le passage à un phénotype plus agressif qui pourrait contribuer à la progression de l'état bénin à pré-malin, de l'état pré-malin à cancéreux dans le cancer du sein ? Pour ce faire, le projet CLARENCE propose d'utiliser différents modèles cellulaires mimant les différents stades de la progression tumorale du cancer du sein : l'état bénin, l'état pré-malin et l'état cancéreux. CLARENCE propose une étude alliant des explorations cellulaires, moléculaires et génomiques afin de décrypter l'impact de l'exposition chronique et faible dose du BPA ou du B[a]P sur la progression tumorale du cancer du sein.

## Résultats

CLARENCE a permis d'établir que l'exposition chronique et faible dose aux deux facteurs environnementaux B[a]P ou BPA impacte les phases précoces d'initiation du cancer du sein via l'altération de la voie de signalisation BMP. L'exposition chronique aux polluants testés stimule également l'agressivité cellulaire des cellules précancéreuses. L'exploration génomique a permis de mettre en évidence une signature génique de l'exposition environnementale identifiant des biomarqueurs candidats.

## Conclusion

CLARENCE démontre in vitro que l'exposition environnementale chronique et à faible dose de molécules environnementales présente un impact délétère sur les phases précoces (initiales ou précancéreuses) du cancer du sein. La compréhension de ces événements pourrait avoir de nombreuses conséquences sociales et environnementales, notamment en permettant d'identifier des biomarqueurs humains de l'exposition au BPA ou au B[a]P.

Projet financé par l'ANR dans le cadre de l'appel à projets CESA (contaminants et environnements) 2011.



## Evaluation des effets de pesticides sur la signalisation thyroïdienne et la neurogénèse

**Petra SPIRHZANOVA<sup>1</sup>, Stephan COUDERQ<sup>1</sup>, Sébastien LE MÉVEL<sup>1</sup>, Michelle LEEMANS<sup>1</sup>,  
David DUPASQUIER<sup>2</sup>, Barbara DEMENEIX<sup>1</sup>, Jean-Baptiste FINI<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>UMR 7221, CNRS/MNHN, Laboratoire physiologie moléculaire de l'adaptation, Département adaptation du vivant, Paris ; <sup>2</sup>Laboratoire Watchfrog, Evry

### Biographie

Au sein du département « Adaptations du vivant », Jean-Baptiste FINI étudie l'impact à court et long termes de l'exposition aux perturbateurs de l'axe thyroïdien. Au cours des quinze dernières années, il a participé à la mise au point d'un test, utilisé dans ce projet, permettant d'identifier les perturbateurs de la thyroïde au sein de l'équipe du Pr DEMENEIX qui a été récompensée par la médaille de l'innovation par le CNRS en 2014. Il est également membre du groupe de travail sur les perturbateurs endocriniens à l'Anses.

### Résumé

Les hormones thyroïdiennes sont fondamentales pour le bon développement du système nerveux pendant la vie embryon-fœtale. Chez les vertébrés, des fenêtres critiques du développement neuronal ont lieu avant la mise en place de la thyroïde. Le bon déroulement de la neurogénèse à ces stades est dépendant de l'apport en hormones thyroïdiennes, provenant soit du sang maternel chez le mammifère, soit des stocks dans l'œuf et le vitellus chez les ovipares. La question de l'exposition à de faibles doses de pesticides pendant ces phases critiques de développement et l'études des conséquences est une question cruciale mais peu étudiée.

## Matériels et méthodes

L'équipe du Pr DEMENEIX et du Dr FINI, ainsi que le laboratoire WatchFrog ont étudié les effets thyroïdiens des pesticides Amitrole et Chlorpyrifos. Nous avons exposé des embryons de xénope pendant 3 jours, à de faibles doses (0.1nM et 10nM) de chlorpyrifos et d'amitrole et avons évalué les conséquences : (i) à court terme sur l'expression cérébrale des gènes (3 jours d'exposition), (ii) à moyen terme sur la mobilité des têtards (2 semaines après l'exposition), (iii) à long terme sur le diamètre des neurones (2 mois après l'exposition).

## Résultats

Nous avons montré que les deux pesticides perturbent le bon fonctionnement des hormones thyroïdiennes et que l'exposition embryonnaire à de faibles concentrations modifie l'expression de gènes dépendants des hormones thyroïdiennes. Les deux pesticides, à leur plus forte concentration testée (10nM), diminuent l'expression d'un marqueur de neurones matures. L'exposition embryonnaire aux deux pesticides a montré une perte de mobilité des têtards à moyen terme. Enfin, une étude à plus long terme a montré que tous les animaux exposés pendant la mise en place de la neurogénèse pouvaient passer la métamorphose, mais que les cerveaux des animaux exposés au chlorpyrifos montraient une morphologie différente, les animaux exposés pendant la période embryonnaire ont des diamètres axonaux plus petits.

## Conclusion

Pris ensemble, ces résultats montrent que les deux pesticides perturbent la physiologie des amphibiens. Les cibles identifiées, les conséquences sur le comportement et particulièrement la perturbation de l'homéostasie thyroïdienne sont transposables à d'autres vertébrés dont l'Homme du fait de la conservation évolutive des acteurs moléculaires. Ceci nous a permis de conclure que la législation concernant ces deux pesticides devrait être modifiée.

Au cours du projet THYPEST, la réglementation européenne a évolué quant à ces deux pesticides. Depuis août 2015, l'amitrole a été interdit pour son usage sur les fruits et légumes. La législation quant à l'organochloré chlorpyrifos a également été modifiée. Les limites maximales de résidus (LMR) sur fruits et légumes ont été abaissées. Néanmoins, son usage est toujours actuel et sa réévaluation retardée de près de deux ans par l'UE.

## Références

- Spirhanzlova P., Couderq S, Le Mével S, Leemans M, Mughal BM., Lemkine G, Demeneix B, Fini JB. Pesticides amitrole and chlorpyrifos alter thyroid hormone and normal brain development\_ under review
- Petra Spirhanzlova, Sébastien Le Mével, Karn Wejaphikul, Bilal Mughal, Jean-David Gothié, Anthony Sébillot, Lucille Butruille, Michelle Leemans, Theo Visser, Sylvie Remaud, Jean-Baptiste Fini, Barbara Demeneix The pyriproxyfen metabolite 4'OH- pyriproxyfen disrupts thyroid hormone signaling and enhances Musashi-1 levels in neuroprogenitors bioRxiv 352088; doi: <https://doi.org/10.1101/352088>
- Petra Spirhanzlova, Michelle Leemans, Barbara A Demeneix, Jean-Baptiste Fini "Following endocrine disrupting effects on gene expression in *Xenopus laevis*", "Chapter 25 "Chemical Screening and Toxicity Testing" in CSHP *Xenopus* Laboratory Manual. Cold Spring Harb Protoc. 2018 Jul 24. doi: 10.1101/pdb.prot098301
- Mughal BB, Leemans M, Lima de Souza EC, le Mevel S, Spirhanzlova P, Visser TJ, Fini JB, Demeneix BA. Co last author. Functional Characterization of *Xenopus* Thyroid Hormone Transporters mct8 and oatp1c1. ENDOCRINOLOGY. 2017 Aug 1;158(8):2694-2705. doi: 10.1210/en.2017-00108. PubMed PMID: 28591769.
- Fini J.B., Mughal B.B., Le Mével S., Leemans M., Lettmann M., Spirhanzlova P., Affaticati P., Jenett A., Demeneix B.A. (2017) Human amniotic fluid contaminants alter thyroid hormone signaling and early brain development in *Xenopus* embryos. Scientific Reports, 7, 43786. doi: 10.1038/srep43786.

**Projet sélectionné dans le cadre de l'APR 2014 du PNR EST Anses.**

# Le centre ARTEMIS, plateforme de prévention en santé environnementale dédiée à la reproduction

**Fleur DELVA<sup>1,2</sup>, Raphaëlle TEYSSEIRE<sup>1</sup>, Loïc SENTILHES<sup>1</sup>, Guyguy MANANGAMA<sup>1,2</sup>, Patrick BROCHARD<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Centre ARTEMIS, CHU de Bordeaux, Bordeaux ; <sup>2</sup>Equipe Epicene, INSERM U1219, Université de Bordeaux, Bordeaux

## Biographie

Patrick BROCHARD, professeur émérite de médecine et santé au travail de l'Université de Bordeaux, praticien hospitalier au CHU de Bordeaux, membre de l'équipe EPICENE du centre INSERM U 1219 de Bordeaux, expert et membre du conseil scientifique de l'Anses.

## Résumé

En 2016, le Centre Artémis (Aquitaine Reproduction Enfant Maternité et Impact en Santé environnement), plateforme de prévention de la santé environnementale dans le domaine de la reproduction, s'est mis en place au CHU de Bordeaux, en partenariat avec l'Agence régionale de santé Nouvelle-Aquitaine, l'Agence Nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail et Santé publique France. Les objectifs du Centre Artemis sont d'évaluer les expositions environnementales et professionnelles chez des patients présentant des troubles de la reproduction et de proposer des mesures de prévention permettant de réduire l'exposition à ces facteurs de risque.

## Matériels et méthodes

La prise en charge consiste en une consultation médicale suivie par un entretien protocolisé et une réunion multidisciplinaire de synthèse permettant une évaluation des expositions environnementales (professionnelles et extra-professionnelles). Sont présentées ici les expositions au jour de la consultation.

## Résultats

Du 16 février 2016 au 02 mai 2019, nous avons reçu en entretien, 779 patients et 765 conjoints pour des pathologies de la grossesse (PG) (n=456, 58,5%), des troubles de la fertilité (TF) (n=303, 38,9%) et hors critères de prise en charge (HC) (n=20, 2,6%).

Concernant les couples vus pour TF (n=303), 32% d'hommes et 16% des femmes étaient fumeurs actifs. Concernant l'alcool, 76% des femmes et 88% des hommes consomment occasionnellement ou fréquemment. Concernant les expositions professionnelles, 86% des patients étaient actifs et 56% étaient exposés à au moins un facteur de risque. Les principaux facteurs de risque sont : solvants (9%), pesticides (8%), médicaments (5%), métaux (3%) et agents physiques (rayonnements ionisants, chaleur) (3%). Au niveau extraprofessionnel, les principales circonstances d'exposition sont : exposition aux pesticides (87%), parfum d'ambiance (86%), ménage-entretien (78%), les travaux (53%), proximité des zones agricoles (31%). Concernant les patientes vues pour pathologies de la grossesse (n=456), 16% étaient fumeuses et 59% consommaient de l'alcool. Environ 73% des femmes étaient actives. Les expositions professionnelles étaient présentes chez 78% de ces femmes. Les principaux facteurs de risque sont : contraintes physiques et organisationnelles (26%), médicaments (3,3%), solvants (2,6%) et pesticides (2,4%). Au niveau extraprofessionnel, les principales circonstances d'exposition sont : l'exposition aux pesticides (75%), ménage-entretien (73%), parfum-ambiance (69%), proximité des zones agricoles (38%), les travaux (34%), le bricolage (12,5%) et le chauffage (10%).

## Conclusion

Les investigations ont permis d'identifier dans la majorité des couples des expositions professionnelles et/ou environnementales à des facteurs de risque pour la reproduction avérés ou présumés, qui ont fait l'objet d'une prescription de prévention personnalisée.

## Références

-F Delva, S Coquet, G Manangama, R Teysseire, P Brochard, L Sentilhes. Le centre Artémis : plateforme d'évaluation et de prévention de la santé environnementale dédiée à la reproduction, Bordeaux, France. BEH 2018 22-23:486-492.

-Teyseire R, Brochard P, Sentilhes L, Delva F. Identification and Prioritization of Environmental Reproductive Hazards: A First Step in Establishing Environmental Perinatal Care. Int J Environ Res Public Health. 2019 Jan 28;16(3)

-G. Manangama, L. Migault S. Audignon, G. Bouvier, C. Gramond, C. Zaros, P. Brochard, L. Sentilhes, A. Lacourt, F. Delva. Maternal occupational exposure to unintentional nanoparticles and small for gestational age: Elfe cohort study. Environ Int. 2019 Jan;122:322-329.

**Projet financé par l'ARS Nouvelle Aquitaine et l'Anses.**

## FINANCEURS DES APPELS À PROJETS DE RECHERCHE DE L'ANR ET DU PNR EST



## COMITÉ SCIENTIFIQUE

Charly BLANC (Anses) ; Armelle DEGEORGES (Anses) ; Laetitia DUBOIS (Anses) ; Gérard LASFARGUES (Anses) ; Frédéric MONOT (ANR) ; Catherine MOUNEYRAC (ANR) ; Christophe ROUSSELLE (Anses).

## COMITÉ D'ORGANISATION

Fabrice COUTUREAU-VICAIRE (Anses) ; Corinne LE NY-GIGON (ANR) ; Vincent POISSON (ANR) ; Sabine PUISEUX (Anses).