

Appel à projets de recherche 2019 du PNR EST

Contenu du document

Ce document contient l'ensemble des résumés des 40 dossiers soumis aux appels à projets 2019 et retenus pour financement par le comité d'orientation à l'issue du processus de sélection

SOMMAIRE

Résumé 5G-SAMU - 2019_2 RF_018.....	4
Résumé AFLAFrance - 2019_1_016	6
Résumé APoPCO - 2019_1_242	8
Résumé AS-CONTROL - 2019_1_095	10
Résumé BiodiTox - 2019_1_031	12
Résumé Cancer-Watch - 2019_1_049	14
Résumé Chimair-Methyl - 2019_1_097	16
Résumé CoExpO - 2019_2 RF_016.....	18
Résumé CoFePMAi - 2019_1_098.....	20
Résumé DECHLORMETH - 2019_1_015	22
Résumé ExPEC-TEEN - 2019_1_233	24
Résumé EXPO-ENFANTS - 2019_2 RF_004.....	26
Résumé EXPOSOMFPI - 2019_1_241	29
Résumé FREEDOM - 2019_1_168	31
Résumé HyPaxE - 2019_1_039	33
Résumé ILEDET - 2019_1_230	35
Résumé ImOTEP - 2019_1_249.....	37
Résumé INDEE - 2019_1_237.....	39
Résumé IRAM - 2019_1_041.....	41
Résumé Lilli - 2019_1_108	43
Résumé LuLi - 2019_1_215	45
Résumé miR-Ex-HAP - 2019_1_010	47
Résumé MISSTICK - 2019_1_113	49
Résumé Molrisk - 2019_1_059	51
Résumé NanOCo - 2019_1_184	53
Résumé NANOWAVE - 2019_2 RF_025	55
Résumé NaPeauLi - 2019_1_087	57
Résumé NIGHTLIGHTSIGHT - 2019_1_054.....	59
Résumé NormThyr3D - 2019_1_111	61
Résumé PE-Lipidom - 2019_1_157	63
Résumé PoDéMos - 2019_1_116.....	65
Résumé SOHO-EpiMetCan - 2019_1_186.....	67
Résumé Stemcellair - 2019_1_200	69
Résumé ThECA - 2019_1_112	71
Résumé TigeRisk2 - 2019_1_055	73
Résumé ToxIALMix - 2019_1_052.....	75
Résumé ToxMining - 2019_1_164	78

Résumé ToxPARK - 2019_1_025	80
Résumé ToxTEM - 2019_1_174	82
Résumé Z-MENACE - 2019_1_128	84

Résumé 5G-SAMU - 2019_2 RF_018

Responsable scientifique : M. Yann Percherancier

Organisme : Université de Bordeaux, IMS CNRS UMR 5218 - Talence

1. Titre

Projet complet

36 mois

Signaux 5G et expositions multiples: Recherche d'effets cellulaires et moléculaires.

2. Questions à la recherche

RFES 1 - Recherche de mécanismes d'action des radiofréquences au niveau cellulaire : Études in vitro, in vivo ou cliniques sur les mécanismes d'action des radiofréquences sur le vivant aux niveaux cellulaire et moléculaire, en tenant compte des évolutions d'utilisation de fréquences liées aux nouveaux usages et nouvelles technologies de communication.

3. Résumé

Objectif détaillé

The objective of the 5G-SAMU project is to investigate whether 5G radiofrequency fields (RF) at 3.5 GHz (at various SAR) are able to:

(i) decrease neuronal electrical activity, as we observed in the case of the 2G 1.8 GHz signal (Moretti 2013, El Khoueiry 2018).

(ii) induce cellular and molecular stress in non-excitabile target cells, such as the Schwann nerve cells that may be sensitive to RF (IARC 2013), and skin fibroblasts and keratinocytes as these cells will become the 5G RF main target tissue as the carrier frequency increases.

As we highlighted a differential effect of CW and GSM-modulated 1.8 GHz exposure on neuronal activity, we will systematically compare the effect of 5G-modulated vs CW signals at 3.5 and 1.8 GHz. Finally, we intent to investigate the effect of combined exposure of 5G at 3.5 GHz with GSM at 1.8 GHz.

Argumentaire de l'originalité et/ou caractère novateur du projet

Within the fast deployment of mobile telephony over the last decades, the fifth generation (5G) will start to be deployed in 2019. The initial frequency chosen for 5G being introduced in Europe will be between 3.4 and 3.8 GHz. This 5G signal will co-exist with the previous 2G, 3G, and 4G protocols. The present project thus aims to investigate the potential impacts of the 5G signals with a carrier frequency at 3.5 GHz on excitable and non-excitabile cells as part of a new worldwide research effort in health-risk assessment related to 5G mobile telephony, that will start soon.

While deleterious effects of RF exposure are known to be caused by tissue heating (ICNIRP 1998), excitable cells such as neurons have been shown to be sensitive to GSM-modulated 2G signals: such signals modify the EEG spectrum in humans (review in SCENIHR 2015) and we have reported a dose-dependent decrease of in vitro neuronal electrical activity under 1.8 GHz RF exposure, the GSM-modulated signal being more efficient than the CW signal (El Khoueiry 2018). Such results call for an assessment of the effects of the 5G modulation at 3.5 GHz and 1.8 GHz on neuron electrical activity.

The rise in frequency of the 5G carrier waves towards the millimetre waves will make it necessary to also consider skin tissues that will maximally absorb the RF energy at such frequencies. Cellular stress responses, such as mitochondrial stress, apoptosis, and the activation of molecular pathways such as the RAS/MAPK have also been suggested in cells or animals exposed to 2G signals and call therefore for evaluation of the effects of 5G exposure in non-excitabile cells.

Argumentation du choix des questions

This project is an in-vitro study directly addressing the mechanism of action of the 5G RF signals on living organism at the cellular and molecular levels. The development of the 5G already raises questions about potential increased health risks related to exposure to these new RF signals and to combined exposures to

multi-frequency signals. Taking advantage of our expertise in assessing neuron network electrical activity and investigating cellular and molecular stress, we will extend our observations using the 5G-modulated 3.5 GHz signal.

Description des méthodes mises en œuvre

The available in vitro RF exposure setups will be adapted at 3.5 GHz for several wireless communication signals (CW, GSM, and 5G) and an incubator will be set up as an innovative in-vitro reverberation chamber, yielding very high homogeneous and efficient exposure conditions, and adapted to the use of multiple sources; i.e. 1.8 and 3.5 GHz.

The electrophysiological approach relies on the well-documented use of an experimental bench where primary rat neurons are cultured on multi-electrode arrays that are placed in an open transverse electromagnetic cell, where an RF signal is propagating. The acquisition system records the electrophysiological activity in the presence of RF.

In a screening approach, several types of stress will be assessed on primary non-excitabile cells (Schwann nerve cells, skin fibroblasts and keratinocytes) at the cellular level (mitochondrial stress, endoplasmic reticulum stress, apoptosis) using flow cytometry and qPCR, and at the molecular level using Bioluminescent Resonant Energy Transfer (BRET) probes monitoring the activation of RAS/MAPK and HSF-1 pathways.

Mitochondrial stress will be assessed in terms of reactive oxygen species production, loss of mitochondrial membrane potential, and mitochondrial permeability-transition pore opening using flow cytometry. Using the same technique, apoptosis will be investigated on the basis of caspase activation and annexin V externalisation. Endoplasmic reticulum stress will be assessed based on the expression of 84 key genes recognizing and responding to misfolded protein accumulation in the endoplasmic reticulum.

BRET is a technique of choice for monitoring in real time and on living cells the dynamics of protein activation. We have shown the effectiveness of BRET probes for the monitoring of TRPV1 activity under RF exposure (Ruigrok et al 2018) and have recently developed BRET probes for the monitoring of HSF-1 and RAS/MAPK pathways.

- Year 1: set up to be built and/or adapted at 3.5 GHz; Dosimetry, Cell models characterization; Neurons electrical activity
- Year 2: Neurons electrical activity; BRET and Flow cytometry experiments; Scientific meetings, mid-term report; 1 paper
- Year 3: Flow cytometry experiments; qPCR experiments; Scientific meetings; final report; 2 papers

4. Membres participants au projet

Equipe 1 : Université de Bordeaux, IMS CNRS UMR 5218 - Talence

Responsable de l'équipe : M. Yann Percherancier

Equipe 2 : Université de Limoges, XLIM CNRS- - Limoges

Responsable de l'équipe : M. Philippe Leveque

5. Budget

Subvention accordée (€ TTC) : 242 299 € TTC

Résumé AFLAFrance - 2019_1_016

Responsable scientifique : M. Jean-Denis Bailly

Organisme : Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, UMR INRA-INP-UPS 1331 Toxalim

1. Titre

Projet complet

36 mois

Emergence des aflatoxines en France dans un contexte de changements climatiques

2. Questions à la recherche

CANC 2 - Identification de facteurs de risques environnementaux ou professionnels des cancers.

CoEm 2 - Problématiques émergentes : risques chimique, physique et biologique induits pour l'homme et l'environnement, caractérisation de l'exposition.

CCLIM 1.2 - Impacts du changement climatique sur la santé : Impacts indirects via la qualité des milieux et de l'alimentation et le développement de maladies émergentes.

3. Résumé

Objectif détaillé

L'aflatoxine B1 (AFB1) est une mycotoxine classée cancérigène pour l'homme par l'IARC. Elle est produite par des espèces appartenant au genre *Aspergillus* et à la section Flavi. Les particularités physiologiques de ces espèces font que l'AFB1 est un problème sanitaire majeur des zones à climat chaud. Cependant, il est établi que les modifications de températures et/ou de précipitations associées aux changements climatiques globaux peuvent entraîner leur apparition dans des zones considérées jusque-là comme indemnes, dont la France.

Ainsi, plusieurs alertes ont signalé la contamination de productions européennes (Espagne, Italie, Roumanie...). En 2015, une enquête menée par les partenaires du projet a démontré que l'AFB1 peut contaminer du maïs produit en France (10% des échantillons analysés). Cette contamination est associée à la présence de différentes espèces aflatoxinogènes, entraînant la présence simultanée d'aflatoxines B et G mais aussi d'autres toxines comme l'acide cyclopiazonique. Ces contaminations ont été associées à des conditions climatiques particulières, caractérisées par une température anormalement élevée à floraison du maïs et un déficit de précipitations. Des conditions climatiques similaires ayant été observées au cours de l'été 2018, il est très important de savoir si cette situation est susceptible d'entraîner une implantation durable d'espèces productrices d'aflatoxines sur le territoire français, ce qui aurait des conséquences à long terme sur l'évaluation du risque d'exposition des consommateurs à ce cancérigène.

Dans ce contexte, les objectifs du projet AFLAFrance sont :

- de suivre l'émergence de l'AFB1 sur maïs grain en France, en lien avec les conditions climatiques
- de caractériser la nature des souches d'*Aspergillus* présentes et celles responsables d'une contamination
- de mettre en lien les caractéristiques métaboliques des souches, la contamination des maïs par les aflatoxines et les pratiques agricoles, du champ au stockage, afin d'identifier des leviers de gestion du risque.

Argumentaire de l'originalité et/ou caractère novateur du projet

L'émergence en France de l'AFB1 est un enjeu majeur de santé publique car ce composé est le plus puissant cancérigène naturel connu (génétoxique et mutagène). Par ailleurs, la présence durable de ce contaminant dans les productions européennes aura des conséquences majeures en termes de gestion du risque et de contrôle.

L'analyse des relations entre conditions climatiques, pratiques agricoles, nature des souches fongiques présentes et contamination mycotoxique permettra de mettre en évidence des pratiques à promouvoir pour limiter le développement des souches toxigènes ou favoriser l'implantation de souches non toxigènes et limiter ainsi le risque de contamination des productions par l'AFB1.

Ce projet repose sur la complémentarité des expertises et savoir faire des partenaires :

- Réseau de parcelles agricoles représentatives de la collecte française de maïs avec données agronomiques et météorologiques et maîtrise de la collecte d'échantillons représentatifs à la récolte

- Maîtrise de la caractérisation morphologique, moléculaire et métabolique des souches d'Aspergillus section Flavi
- Expertise des liens entre pratiques agricoles et qualité sanitaire et technologique des grains

Argumentation du choix des questions

Notre projet vise à étudier les conséquences des changements climatiques sur l'émergence dans les parcelles agricoles et, par voie de conséquence, dans l'alimentation d'un composé cancérigène, l'AFB1 (question CCLIM 1.2). Le suivi pluriannuel de cette évolution permettra d'évaluer l'importance de cette émergence et d'apporter des éléments qualitatifs et quantitatifs clés dans l'évaluation du risque associé pour l'homme (question CoEm 2). Enfin, l'analyse des relations existant entre climat-pratiques agricoles- séchage des grains avant stockage et nature des souches fongiques présentes permettra aussi d'apporter des éléments de compréhension des facteurs de risque environnementaux d'exposition à ces contaminants (question CANC 2)

Description des méthodes mises en œuvre

Ce projet se déroulera sur 3 années et différentes tâches seront menées en simultanée

- Monitoring de l'émergence de l'AFB1 en France (années 1 et 2) : des échantillons de maïs seront collectés sur tout le territoire et analysés pour leur niveau de contamination en aflatoxines. Les échantillons contaminés et ceux issus de zones « à risque » mais non contaminés seront analysés pour caractériser la flore fongique présente. Compte tenu des conditions météorologiques observées en 2018, des échantillons issus des récoltes de cette année, prélevés mais non encore analysés seront inclus dans l'étude.

- Caractérisation morphologique, moléculaire et métabolique des souches d'Aspergillus de la section Flavi présentes dans les échantillons (années 1, 2 et 3).

- Suivi cinétique de l'apparition des aflatoxines en fonction des conditions de pré-stockage avant séchage (années 1 et 2)

- Corrélation entre pratiques agricoles (du champ au stockage), nature des souches présentes et contamination mycotoxique (années 2 et 3) : identification de leviers agronomiques de gestion du risque.

4. Membres participants au projet

Equipe 1 : Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse UMR INRA-INP-UPS 1331 Toxalim

Responsable de l'équipe : M. Jean-Denis Bailly

Equipe 2 : ARVALIS, Institut du végétal - Boigneville

Responsable de l'équipe : Mme Béatrice Orlando

Equipe 3 : Ecole d'Ingénieurs de Purpan, Agro-Physiologie Agro-Molécules, UMR 1010 LCA INRA / INPT - Toulouse

Responsable de l'équipe : Mme Cécile Levasseur-Garcia

5. Budget

Subvention accordée (€ TTC) : 199 193 € TTC

Résumé APoPCO - 2019_1_242

Responsable scientifique : Mme Delphine Praud

Organisme : Centre Léon Bérard, Département Cancer-Environnement - Lyon

1. Titre

Projet complet

24 mois

Evaluation de la pollution atmosphérique globale et risque de cancer du sein dans la cohorte E3N avec prise en compte de l'activité physique liée aux trajets résidence-travail

2. Questions à la recherche

CANC 1 - Etude des risques de cancers liés à des expositions environnementales et/ou professionnelles aux substances potentiellement cancérigènes (entre autres avec une approche « vie entière »).

CANC 2 - Identification de facteurs de risques environnementaux ou professionnels des cancers.

AIRR 1 - Evaluation de l'exposition et des risques afférents aux polluants chimiques dangereux, aux agents pathogènes et aux particules présents dans l'air :

- sur des lieux peu étudiés (commerces, bureaux, moyens de transport),
- sur des zones à proximité de grands axes routiers, de ports, d'aéroports.

3. Résumé

Objectif détaillé

L'objectif principal du projet APoPCo est d'analyser l'association entre l'exposition à la pollution atmosphérique (par l'évaluation de l'exposition aux PM10, PM2,5 et NO2) et le risque de cancer du sein dans une étude cas-témoins nichée dans la cohorte E3N (5455 cas et 5455 témoins appariés) entre 1990 et 2010, en considérant l'exposition à 3 moments de la vie quotidienne : résidence, travail et trajets domicile-travail.

Les objectifs secondaires sont d'évaluer l'impact du choix du mode de transport (MT) sur l'exposition et sur le risque de cancer du sein, et d'évaluer les bénéfices potentiels de l'activité physique sur le risque de cancer du sein induits par le choix d'un MT actif (marche et vélo).

Argumentaire de l'originalité et/ou caractère novateur du projet

Le cancer du sein est le cancer féminin le plus fréquent en France et son incidence a augmenté au cours des dernières décennies. Les facteurs environnementaux sont suspectés de jouer un rôle dans cette augmentation, notamment les polluants de l'air. Leur exposition peut se produire tout au long de la journée ; au domicile, sur le lieu de travail et pendant les trajets domicile-travail. Ces trajets représentent en moyenne 6% du temps d'une journée, et sont responsables de 30% de la dose quotidienne totale inhalée en raison de la proximité des sources et des émissions maximales aux heures de pointe. Cette composante est importante dans un contexte urbain où la circulation est la principale source de pollution. Outre la durée des trajets, le choix du MT peut influencer cette exposition ; il a été montré que les concentrations de PM2,5 dans le métro peuvent être 3 fois supérieures aux concentrations extérieures et que celles de NO2 sont plus élevées dans les voitures qu'en air ambiant. L'inhalation des utilisateurs de MT actifs (marche et vélo) impacte sur la dose absorbée cependant diverses études ont observé que l'activité physique induite produit des bénéfices largement supérieurs aux risques associés à une exposition élevée à la pollution de l'air.

Considérant que les études antérieures limitent souvent l'évaluation de l'exposition à l'adresse résidentielle et que l'activité physique liée aux déplacements a rarement été prise en compte dans les études épidémiologiques sur le cancer, nous visons à étudier ici l'association entre le risque de cancer du sein et la pollution atmosphérique, pour la première fois aux adresses résidentielles et professionnelles ainsi que lors des trajets domicile-travail.

Argumentation du choix des questions

Ce projet vise à analyser l'association entre l'exposition à la pollution atmosphérique et le risque de cancer du sein et s'inscrit donc particulièrement dans l'axe Cancer (CANC 1). De plus la durée de la période d'étude

permettra de considérer une approche vie entière et également «l'identification de facteurs de risques environnementaux ou professionnels des cancers» (CANC 2). La prise en compte de l'exposition liée au MT et au lieu de travail permettra d'améliorer les connaissances sur l'exposition de lieux peu étudiés (AIRR 1).

Description des méthodes mises en œuvre

Afin de compléter les adresses déjà disponibles par l'envoi des questionnaires successifs, un questionnaire supplémentaire a été envoyé à chacune des participantes afin de collecter les adresses résidentielles et professionnelles depuis la naissance ainsi que des données sur le trajet domicile-travail et la durée des déplacements. Le taux de réponse a été de 65,3 % (N~7800). Les femmes ont déclaré en moyenne 8 adresses résidentielles (8549 adresses) et 8 professionnelles (8359 adresses). Les adresses résidentielles ont déjà été géocodées (dont 84 % avec une grande précision : adresse exacte ou segment de rue). Les adresses professionnelles seront géocodées dans ce projet (M1-M6).

Pour chaque année, une concentration annuelle d'exposition sera attribuée aux adresses à l'aide de 3 cartes de concentrations atmosphériques déjà disponibles (projet XENAIR - Fondation ARC (2016-2020)) (M1-M8).

Les sujets auront, sur la période d'étude, un ou plusieurs couples résidence/lieu de travail contenant des informations sur les trajets domicile-travail (point de départ et d'arrivée, MT et durée). Nous calculerons ainsi la concentration moyenne des polluants pour le trajet en fonction du MT. Pour un trajet, l'exposition induite par le MT sera évaluée en fonction de la durée du trajet (plus longue en cas de marche par exemple), de la variation par inhalation (plus élevée pour les MT actif), et du type de MT (concentration plus élevée de NO2 pour les voitures par exemple)(M7-M12).

Une dose totale d'exposition sera calculée en tenant compte de la dose reçue aux adresses résidentielles et professionnelles ainsi que pendant les trajets domicile-travail. Cette dose totale sera estimée annuellement puis cumulée pour toute la durée de l'étude (M13-M15).

L'association entre l'exposition à la pollution de l'air et le risque de cancer du sein sera estimée à l'aide de modèles de régression logistique conditionnelle ajustés sur les facteurs de risque connus du cancer du sein et de confusion potentiels disponibles dans la base de données E3N (dont l'activité physique non liée aux déplacements). Des analyses stratifiées sur l'activité physique induite par le MT afin de tenir compte du bénéfice potentiel de celle-ci sur le risque de cancer du sein (M16-M24).

4. Membres participants au projet

Equipe 1 : Centre Léon Bérard, Département Cancer-Environnement - Lyon

Responsable de l'équipe : Mme Delphine Praud

Equipe 2 : Institut Gustave Roussy, Inserm U1018 "Health across Generations" - Villejuif

Responsable de l'équipe : Mme Francesca Romana Mancini

Equipe 3 : Centre Léon Bérard, Département Cancer-Environnement - Lyon

Responsable de l'équipe : M. Thomas Coudon

5. Budget

Subvention accordée (€ TTC) : 199 815 € TTC

Résumé AS-CONTROL - 2019_1_095

Responsable scientifique : M. Guillaume Minard

Organisme : Université Claude Bernard Lyon 1, Laboratoire d'Ecologie Microbienne, UMR CNRS 5557, UMR INRA 1418 - Villeurbanne

1. Titre

Etude de faisabilité

24 mois

Utilisation du protiste symbiotique *Ascogregarina taiwanensis* dans la lutte antivectorielle contre le moustique tigre (*Aedes albopictus*).

2. Questions à la recherche

LAVE 1 - Vecteurs et santé humaine, animale ou végétale : biologie, écologie, distribution des vecteurs, relation hôte-pathogène, surveillance des vecteurs, détection (relations agent pathogène - pathogénicité ; vecteur sentinelle...), exposition différenciée, résistance.

LAVE 2 - Lutte anti-vectorielle : nouvelles substances actives et produits biocides, développement de technologies innovantes (lutte biologique, lutte génétique...) sans exclure l'optimisation des méthodes de piégeage et large spectre ; efficacité de la lutte anti vectorielle (indicateurs de type coût efficacité ou bénéfices-risques ; prise en compte des facteurs de pratiques culturelles

3. Résumé

Objectif détaillé

Le moustique tigre *Aedes albopictus* est l'une des espèces les plus invasives au monde. Il est par ailleurs capable de transmettre à l'homme et aux animaux plus de 26 pathogènes principalement viraux. Les méthodes de lutte contre l'expansion territoriale de ce moustique et des pathogènes qu'il transmet demeurent relativement restreintes. Il semble donc urgent de développer des approches innovantes de lutte anti-vectorielle. Des travaux récents ont montré qu'*Ae. albopictus* était fréquemment infecté par le protiste symbiotique *Ascogregarina taiwanensis* en conditions naturelles. Ce symbiote est transmis via l'eau des gîtes larvaires et colonise spécifiquement *Ae. albopictus* même s'il peut occasionnellement infecter d'autres espèces de moustiques. Des études préliminaires menées chez celles-ci suggèrent que les femelles seraient préférentiellement attirées par les gîtes de ponte infestés par le symbiote et que celui-ci pourrait moduler la répllication de différents pathogènes transmis in insecta. Partant de ces observations, *As. taiwanensis* pourrait donc s'avérer un candidat intéressant en matière de lutte contre le moustique. Afin d'évaluer l'utilisation du symbiote en lutte anti-vectorielle, nous proposons (i) d'étudier l'attractivité de différents génotypes de symbiotes vis-à-vis de différentes populations d'*Ae. albopictus*, (ii) de caractériser les composés volatiles à l'origine de l'attractivité du symbiote et (iii) d'identifier de potentielles interférences entre le symbiote et des pathogènes transmis par le moustique.

Argumentaire de l'originalité et/ou caractère novateur du projet

Le moustique tigre étend son aire de répartition à l'échelle nationale et internationale. L'utilisation d'insecticides (souvent néfastes pour la biodiversité et la santé humaine) ou la destruction de gîtes larvaires (souvent peu accessibles) n'ont pas apporté de solutions efficaces permettant de freiner cette invasion. Il est donc essentiel de développer des approches alternatives de lutte antivectorielle. Dans ce contexte, l'utilisation de microorganismes symbiotiques pourrait offrir de nouvelles opportunités. Les résultats obtenus permettront de déterminer s'il est possible d'utiliser ce symbiote ou les composés volatiles qu'il produit en tant qu'attractants au sein de pièges pondoirs. Si le symbiote interfère avec les pathogènes transmis, il sera aussi question d'adapter la gestion des populations de moustiques en facilitant ou en limitant la transmission de ces symbiotes en prévention d'une future introduction de pathogènes.

Argumentation du choix des questions

L'étude de l'attractivité du moustique tigre *Ae. albopictus* par *As. taiwanensis* pourrait nous permettre d'aller plus loin dans la compréhension des comportements et des signaux moléculaires impliqués dans la dispersion des symbiotes au sein des populations de moustiques. D'autre part, l'étude des interactions

tripartites moustiques-symbiote-virus constituerait un pas en avant majeur dans la compréhension du pathosystème vectoriel. Ces deux axes de recherche offrent également des perspectives concrètes de lutte antivectorielle. En effet, s'il s'avère que le symbiote attire efficacement les femelles de moustique tigre vers des gîtes de ponte spécifique, ceux-ci pourraient être utilisés afin de concentrer les populations de moustiques dans des pièges pondoirs. De même, l'étude des interférences possibles entre le symbiote et les pathogènes viraux transmis par le moustique pourraient voir émerger de nouvelles stratégies de biocontrôle. En effet, en agissant sur le cycle biologique du symbiote, il serait alors possible d'interférer indirectement avec la probabilité de transmission des pathogènes.

Description des méthodes mises en œuvre

Objectif 1. Durée : 6 mois (équipes impliquées : EID, EAC, DMTV)

Expériences de choix au sein desquelles chaque femelle *Ae. albopictus* devra choisir entre un gîte vierge et un gîte inoculé avec *As. taiwanensis*.

1) L'expérience comprendra 30 réplicats (i.e. femelles moustiques) x 3 populations de moustiques x 3 populations de symbiotes (soit N= 270 essais). Le temps mis par les femelles pour atteindre la cible et le nombre d'œuf pondus seront estimés.

2) Analyse des données par modèles linéaires généralisés.

Objectif 2. Durée : 6 mois (équipes impliquées : CESN, DMTV)

Identification des composés volatils produits par les symbiotes.

1) Analyse d'extraits de génotypes d'*As. taiwanensis* par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

2) Identification des biomarqueurs du caractère attractif de certains symbiotes par analyse multivariée (OPLS-DA).

Objectif 3. Durée : 6 mois (équipe impliquée : DMTV)

Etude des interactions spécifiques entre *As. taiwanensis* et les pathogènes transmis par le moustique tigre *Ae. albopictus*.

1) Sélection de lignées aposymbiotiques (non colonisées par le symbiote), et de lignées symbiotiques (recolonisation d'individus aposymbiotiques après mise en contact avec le symbiote purifié).

2) Infection des lignées aposymbiotiques et symbiotiques par les virus CHIKV (Chikungunya), DENV 2 (Dengue sérotype 2) en laboratoire de niveau 3 (plateforme-ANIRA, SFR Biosciences).

3) Estimation du potentiel de réplication et de transmission des virus par titration des particules virales dans la tête et la salive du moustique.

4. Membres participants au projet

Equipe 1 : Université Claude Bernard Lyon 1, Laboratoire d'Ecologie Microbienne UMR CNRS 5557, UMR INRA 1418 - Villeurbanne

Responsable de l'équipe : M. Guillaume Minard

Equipe 2 : Université Claude Bernard Lyon 1, UMR CNRS 5557 / UMR INRA 1418 - Villeurbanne

Responsable de l'équipe : Mme Anne-Emmanuelle Hay

Equipe 3 : Université Claude Bernard Lyon 1, LBBE - UMR CNRS 5558 - Villeurbanne

Responsable de l'équipe : M. Emmanuel Desouhant

Equipe 4 : Entente Interdépartementale Rhône-Alpes pour la Démoustication - Chindrieux

Responsable de l'équipe : M. Yves Rozier

5. Budget

Subvention accordée (€ TTC) : 42 848 € TTC

Résumé BiodiTox - 2019_1_031

Responsable scientifique : M. François Brischoux

Organisme : Centre d'études biologiques de Chizé, CEBC-CNRS UMR 7372 - Villiers-en-Bois

1. Titre

Projet complet

36 mois

Toxicité sublétales des produits phytosanitaires: Niveaux d'exposition et tests expérimentaux sur la biodiversité ordinaire

2. Questions à la recherche

ACHIM 1 - Exposition aux contaminants et effets sur les écosystèmes et la santé humaine : milieux aquatiques, approche par compartiment (sol, air, eau...) et effets des mélanges.

PE 3 - Étude des effets à faibles doses et/ou des effets cocktails.

PE 4 - Développement de biomarqueurs d'exposition et/ou d'effets à des substances perturbatrices endocriniennes avérées ou suspectées.

3. Résumé

Objectif détaillé

L'évolution des techniques agricoles, et notamment l'utilisation massive de produits phytosanitaires est fréquemment évoquée comme un facteur majeur de la dégradation rapide de la biodiversité. Cependant, la plupart des travaux portant sur les effets des pesticides se sont focalisés sur la toxicité immédiate (effets létaux) à doses relativement hautes et en utilisant des modèles de laboratoire. Pourtant, de faibles doses présentes dans l'environnement peuvent à travers leurs effets sublétaux modifier profondément la physiologie, la reproduction et la survie des organismes non cibles.

Le projet BiodiTox a deux objectifs principaux :

Le premier objectif vise à quantifier les niveaux de contaminants et de leurs métabolites dans les tissus (sang) d'organismes sauvages (oiseaux, amphibiens) échantillonnés in natura (milieux agricoles et viticoles), et d'en mesurer les effets sur des marqueurs physiologiques majeurs (hormones, stress oxydatif et vieillissement cellulaire).

Le deuxième objectif vise à tester ces effets grâce à une approche expérimentale en milieux contrôlés afin de démontrer l'impact de doses sublétales de contaminants (niveaux mesurés dans l'environnement) sur la physiologie (hormones, télomères, stress oxydatif) d'espèces non domestiques en complément à l'approche corrélatrice du premier objectif.

Les molécules visées pour ce projet sont le glyphosate et l'AMPA, les herbicides sulfonyles, les fongicides (triazoles) et les successeurs potentiels des néonicotinoïdes (sulfoxaflor).

Pour mener à bien ces deux objectifs, nous avons sélectionnés 2 espèces, le merle noir (*Turdus merula*) et le Crapaud commun (*Bufo bufo*). Ces deux espèces sont présentes en zones agricoles ou viticoles intensives et leurs taux de contamination reflètent une exposition locale.

Ces deux modèles font l'objet de suivis écologiques et toxicologiques dans le cadre d'un partenariat entre le CEBC et le laboratoire EPOC (Université Bordeaux), ce qui a permis la mise au point des techniques de dosages non destructrices (sang).

Argumentaire de l'originalité et/ou caractère novateur du projet

BiodiTox vise à aborder des molécules peu étudiées ou émergentes afin de permettre une exploration inédite de leur prévalence et effets sublétaux. Les modèles d'étude sont des espèces non conventionnelles de laboratoire (faune sauvage) dont nous maîtrisons au CEBC l'élevage en conditions contrôlées. Ils proviennent d'une grande diversité d'habitats ce qui permettra de généraliser à large échelle (nationale, européenne) nos

résultats. Ces espèces présentent des modes métaboliques (endothermie ou ectothermie) et des modes de vie contrastés susceptibles d'influencer leurs réponses à l'exposition aux contaminants. Enfin, comme le système endocrinien, au cœur de notre projet, est quasi-identique entre les espèces étudiées et l'Homme, nos résultats éclaireront sur le rôle des molécules étudiées sur la faune sauvage et la santé humaine.

De manière ultime, BiodiTox apportera les éléments nécessaires à la révision des normes d'utilisations de produits phytosanitaires (PNEC par exemple).

Argumentation du choix des questions

Notre approche multidisciplinaire vise à mesurer l'impact et à décrire les effets sublétaux de molécules peu étudiées ou émergentes. L'étroite interrelation entre les deux objectifs du projet (1- mesure de contaminants et effets sur des marqueurs physiologiques majeurs in natura, et 2- démonstration de ces effets en conditions contrôlées) dans la perspective plus large des dosages effectués dans l'environnement (dosages Agences de l'Eau déjà obtenus) permettra de répondre aux questions "ACHIM" et notamment à la question "ACHIM 1". Plus important, les deux approches envisagées pour une exposition à des doses faibles, ainsi que les marqueurs physiologiques sélectionnés (hormones, télomères, stress oxydatif) permettront de répondre aux questions "PE" et principalement les questions "PE 3" et "PE 4".

Description des méthodes mises en œuvre

Nous quantifierons les niveaux de contamination des molécules précitées de ces espèces en fonction des habitats échantillonnés (forêts, bocages, zones agricoles ou viticoles). Ces données ne sont pas disponibles à l'heure actuelle. En parallèle, nous relierons ces niveaux de contamination à des marqueurs physiologiques mesurés sur les mêmes individus. L'approche expérimentale permettra de tester de manière très robuste les inférences issues de ces deux premiers jeux de résultats.

Calendrier :

- Année 1-3: Récolte des échantillons sur le terrain, dosages des contaminants et des marqueurs physiologiques
- Année 2-3: approche expérimentale pour démontrer l'impact de doses sublétales de contaminants en conditions contrôlées
- Année 3: Valorisation des résultats.

4. Membres participants au projet

Equipe 1 : Centre d'études biologiques de Chizé, CEBC-CNRS UMR 7372 - Villiers-en-Bois

Responsable de l'équipe : M. François Brischoux

Equipe 2 : Université de Bordeaux, EPOC/LPTC - Talence

Responsable de l'équipe : Mme Hélène Budzinski

5. Budget

Subvention accordée (€ TTC) : 199 784 € TTC

Résumé Cancer-Watch - 2019_1_049

Responsable scientifique : Mme Cristina Villanueva

Organisme : ISGLOBAL – Barcelona, Espagne

1. Titre

Projet complet

36 mois

Association entre exposition aux polluants dans l'eau de boisson et cancers du sein et du colon.

2. Questions à la recherche

CANC 1 - Etude des risques de cancers liés à des expositions environnementales et/ou professionnelles aux substances potentiellement cancérogènes (entre autres avec une approche « vie entière »).

3. Résumé

Objectif détaillé

We will evaluate the association between long-term exposure to prevalent contaminants in drinking water and highly incident cancers in a large cohort study in France (CONSTANCES). Specifically, we will 1) Estimate the average lifetime levels of nitrate and trihalomethanes (THMs) in the residences of study subjects using historic routine monitoring data of drinking water and individual residential history. 2) Evaluate the association with breast and colorectal cancer adjusting for confounders.

Argumentaire de l'originalité et/ou caractère novateur du projet

Breast and colorectal cancer rank first and fourth most incident cancers worldwide, and part of the burden of disease remains unexplained by the known risk factors. Some contaminants, including chemicals in drinking water, have been suggested as risk factors. Nitrate and disinfection by-products (DBPs) are widespread drinking water contaminants. Nitrate originates mainly from the fertilizers used in intensive agriculture and waste from intensive farms. DBPs are a complex mixture formed in the drinking water treatment as unwanted by-products from disinfection. Trihalomethanes (THMs) are prevalent chlorination-DBPs used as a surrogate of DBP exposure in epidemiological studies. Alternative disinfection methods (e.g. ozonation, chlorine dioxide) produce other DBPs (e.g. bromate, chlorite, chorate). All of us are exposed to THMs through ingestion, inhalation or dermal absorption in showers or baths, as THMs are highly volatile and skin permeable. Long-term exposure to nitrate and THMs at levels below the regulatory limits has been linked to colorectal and breast cancer in case-control studies. However, there is limited evidence from cohort studies, most studies focus on North-American populations, and current knowledge is still inconclusive, particularly concerning the co-exposure to nitrate and THMs. We propose the first evaluation based on a large French cohort (CONSTANCES, www.constances.fr), including 200,000 subjects.

Argumentation du choix des questions

Cancer-Watch will contribute to elucidate the role of widespread chemicals present in drinking water, to which all of us are exposed, on the risk of highly frequent CANCERS in the population. The project will provide an exposure-response relationship based on a large study population, contributing thus with relevant evidence for health risk assessment and regulatory purposes with an enormous potential for prevention and reduce the burden of disease.

Description des méthodes mises en œuvre

1) EPIDEMIOLOGICAL STUDY – Until Mid 2019 – Lead: INSERM-UMS 11

Enrolment and follow up of study subjects, with questionnaires to collect personal information: residential history, water consumption, lifestyle and relevant covariables. CONSTANCES started in 2012 recruiting adult

population in France, and follow-up includes annual questionnaires, a health examination every 5 years and linkage to national health databases. Number of breast and colorectal cancer cases expected are 1400 and 1190, respectively, among a total of 200,000 study subjects.

2) COLLECTION OF ROUTINE MONITORING WATER QUALITY DATA – 6 months (M1-M6) – Lead: INSERM

We will develop questionnaires to collect data from routine monitoring on nitrite, nitrate, THM and bromate levels in drinking water supplied in the study areas. Information on relevant determinants (water source, treatment) will be also collected back to year 1950. Levels will be validated through measurements in 200 drinking samples in selected study areas, and a range of DBPs (haloacetic acids, chlorate, chorite, haloacetonitriles, haloketones) will be measured to understand the composition of DBPs beyond THMs.

3) MODELLING OF HISTORICAL LEVELS IN THE STUDY AREAS – 12 months (M7-M18) – Lead: ISGLOBAL

We will estimate annual average levels of nitrate and THMs (chloroform, bromodichloromethane, dibromochloromethane, bromoform) in the study areas. For years when data is not available, levels will be estimated using water source and treatment as predictors, following a similar procedure as in previous cancer studies (Villanueva 2017, Espejo-Herrera 2016, Font-Ribera 2018).

4) ESTIMATION OF RISKS – 12 months (M19-M30) – Lead: INSERM/ISGLOBAL

Residential exposure will be estimated by linkage of residential address with the annual concentrations in drinking water. Lifetime average concentration of nitrate and THMs will be estimated, and personal water consumption habits (tap, bottled) will be considered to estimate exposure through ingestion.

Risk of colorectal and breast cancer associated with different indices of long-term exposure to nitrate, THMs and both will be estimated using appropriate multivariate models (e.g. Cox regression) adjusting for relevant covariables.

5) DISSEMINATION – 6 months (M31-36) – Lead: INSERM/ISGLOBAL

Scientific publications (1 on breast, 1 on colorectal cancer).

Presentation in conferences (year 2, 3).

4. Membres participants au projet

Equipe 1 : ISGLOBAL – Barcelona, Espagne

Responsable de l'équipe : Mme Cristina Villanueva

Equipe 2 : Inserm, IRSET UMRS1085 - Rennes

Responsable de l'équipe : Mme Benedicte Jacquemin

Equipe 3 : Inserm, UMS 11 - Villejuif

Responsable de l'équipe : M. Marcel Goldberg

5. Budget

Subvention accordée (€ TTC) : 199 996 € TTC

Résumé Chimair-Methyl - 2019_1_097

Responsable scientifique : Mme Valérie Siroux

Organisme : Université Grenoble Alpes, Institut Albert Bonniot, Centre de Recherche Inserm/UJF U823
Département Oncogène et Biotechnologie

1. Titre	Projet complet	36 mois
-----------------	-----------------------	----------------

Impact de l'exposition à la pollution chimique de l'air dans des crèches sur la méthylation de l'ADN chez de jeunes enfants

2. Questions à la recherche

ACHIM 3 - Quantification des niveaux d'exposition en population générale et pour les populations vulnérables ou sensibles. Développement de méthodes de mesurage de l'imprégnation biologique des populations exposées aux produits chimiques et en particulier aux CMR.

AIRR 1 - Evaluation de l'exposition et des risques afférents aux polluants chimiques dangereux, aux agents pathogènes et aux particules présents dans l'air :

- sur des lieux peu étudiés (commerces, bureaux, moyens de transport),
- sur des zones à proximité de grands axes routiers, de ports, d'aéroports.

AIRR 4 - Indicateurs pertinents pour l'évaluation des expositions chroniques et/ou cumulées à la pollution de l'air (intérieur / extérieur).

3. Résumé

Objectif détaillé

L'objectif général du projet Chimair-Methyl est de caractériser le rôle de la méthylation de l'ADN dans la relation entre l'exposition par inhalation aux polluants chimiques liée à l'utilisation de produits de nettoyage et de désinfection (PND) et la santé respiratoire, chez de jeunes enfants en crèche.

Les objectifs spécifiques sont :

- 1- Identifier des altérations de méthylation associées aux expositions aux PND par une approche « epigenome-wide association study » (EWAS), afin d'identifier des biomarqueurs d'effet des PND;
- 2- Étudier l'association entre la méthylation des gènes et pathways biologiques identifiés à l'étape 1 et la santé respiratoire des enfants, afin de caractériser les mécanismes par lesquels l'exposition aux substances présentes dans les PND impacte la santé respiratoire des enfants.

Argumentaire de l'originalité et/ou caractère novateur du projet

L'exposition par inhalation aux substances présentes dans les PND est un facteur de risque émergent dans plusieurs pathologies, notamment respiratoires (Le Moual N, La lettre du pneumologue 2016). Initialement démontré dans le contexte des expositions professionnelles, l'effet délétère des expositions aux PND concerne une population plus large compte tenu du caractère ubiquitaire de ces expositions. Des études suggèrent que l'utilisation à domicile des sprays et d'eau de javel impacte la santé respiratoire des jeunes enfants. Par mesure d'hygiène, les activités de nettoyage et de désinfection sont fréquentes dans les crèches (Wei W, Indoor Air 2016;26:517-25). Pourtant, très peu d'études ont ciblé les expositions des très jeunes enfants dans les crèches.

Le rôle des substances chimiques dans l'environnement sur les mécanismes épigénétiques, notamment la méthylation de l'ADN, est un domaine de recherche émergent. Si des signatures épigénétiques associées à l'exposition au tabagisme ont été identifiées (Reese SE, Environ Health Perspect 2017), peu d'études ont ciblé d'autres substances chimiques (van der Plaats DA, Occup Environ Med 2018), et il n'existe à notre connaissance aucune étude sur l'impact des expositions aux PND sur la méthylation de l'ADN.

Les recherches sur l'impact sanitaire de l'exposition aux PND nécessitent d'être conduites dans des cohortes de très jeunes enfants, une population particulièrement vulnérable, permettant à la fois :

- une estimation précise de l'exposition à différents PND dans des lieux encore peu explorés, comme les crèches ;

- un recueil biologique afin de rechercher des biomarqueurs associés à l'exposition aux PND ; la méthylation de l'ADN apparaît particulièrement pertinente ;
- une bonne caractérisation de la santé respiratoire.

Argumentation du choix des questions

Chimair-Methyl s'inscrit directement dans les axes « ACHIM3 » en ciblant une population vulnérable de très jeunes enfants et « AIRR1 » en ciblant la qualité de l'air dans les crèches, un lieu d'exposition peu étudié. Il répond aussi à l'axe « AIRR4 » car il pourrait permettre d'identifier des biomarqueurs épigénétiques d'exposition aux PND.

Description des méthodes mises en œuvre

Le projet s'appuie sur la cohorte CRESPI (Santé Respiratoire des enfants en Crèche, PI : N Le Moual), dont le recrutement démarrera début 2019 (100 crèches franciliennes, ~2000 enfants < 3 ans), qui a pour objectif principal d'étudier l'impact de l'exposition aux PND sur la santé respiratoire des jeunes enfants.

- Expositions aux substances émises par les PND en crèche (financé) via une approche novatrice qui combine des mesures de la qualité de l'environnement intérieur dans l'air (COV et aldéhydes) et les poussières au sol (triclosan, les muscs de synthèse (galaxolide, tonalide) et alkylphénols (4-tertbutylphénol, 4-tert-octylphénol et 4-n-nonylphénol)) et l'utilisation d'une application smartphone associée à une base de données sur la composition des PND.

- Evaluation répétée de la santé respiratoire des enfants (financé pour 3 ans de suivi) par une approche combinant un questionnaire standardisé complété par les parents, une application smartphone, et la collecte des informations des carnets de santé des enfants.

- Mesure de la méthylation de l'ADN dans les cellules buccales (recueil non invasif avec une cytobrosse) par la puce Illumina de dernière génération permettant de couvrir 850 000 sites CpGs pour 350 échantillons. L'utilisation de cellules buccales, une source facilement accessible et fiable d'ADN, est pertinente dans le contexte de la recherche sur l'impact des polluants de l'air (de Nys S, Environ Int 2018) et sur la santé respiratoire (Brugha, Acta Paediatrica 2017).

- Analyses statistiques d'association, par des approches agnostiques (EWAS au niveau des sites CpGs ou en considérant des régions génomiques couvrant plusieurs sites CpGs) suivies d'études d'enrichissement sur des pathways biologiques. La cohorte SEPAGES (471 enfants suivis de la naissance à 3 ans) pourra être utilisée pour réplication. Les sites de méthylation ainsi identifiés seront étudiés en lien avec la santé respiratoire des enfants (phénotypes de sifflements) et des analyses de médiation seront réalisées.

4. Membres participants au projet

Equipe 1 : Université Grenoble Alpes, Institut Albert Bonniot, Centre de Recherche Inserm/UJF U823, Département Oncogène et Biotechnologie

Responsable de l'équipe : Mme Valérie Siroux

Equipe 2 : Inserm U1168 - Villejuif

Responsable de l'équipe : Mme Oriane Dumas

Equipe 3 : CEA de Saclay, Institut de Biologie Francois Jacob, Centre National de Recherche en Genomique Humaine, Laboratoire Epigénétique et Environnement

Responsable de l'équipe : M. Jorg Tost

Equipe 4 : CSTB, Département Energie, Santé, Environnement, Division santé - Marne-la-Vallée

Responsable de l'équipe : Mme Corinne Mandin

Equipe 5 : EPICONCEPT - Paris

Responsable de l'équipe : M. Etienne Sévin

5. Budget

Subvention accordée (€ TTC) : 246 276 € TTC

Résumé CoExpO - 2019_2 RF_016

Responsable scientifique : M. Rémy Pedeux

Organisme : Inserm U1242-COSS/Université Rennes1 - Rennes

1. Titre

Etude de faisabilité

12 mois

Analyse de la voie de réponse aux dommages à l'ADN en réponse à une co-exposition comprenant les ondes millimétriques

2. Questions à la recherche

RFES 1 - Recherche de mécanismes d'action des radiofréquences au niveau cellulaire : Études in vitro, in vivo ou cliniques sur les mécanismes d'action des radiofréquences sur le vivant aux niveaux cellulaire et moléculaire, en tenant compte des évolutions d'utilisation de fréquences liées aux nouveaux usages et nouvelles technologies de communication.

3. Résumé

Objectif détaillé

L'objectif est de réaliser une étude pilote afin de vérifier s'il est nécessaire d'étudier plus en détail l'impact des ondes millimétriques (OMM) sur la réponse aux dommages à l'ADN nucléaire lorsqu'il y a co-exposition avec un stress génotoxique. Les travaux se concentreront sur 1) les dommages induits par l'irradiation X ou un radio-mimétique (cassures double brins) car ce sont les plus délétères (cancérogènes) et 2) les dommages produits par un stress oxydatif car ils sont très fréquents et affectent aussi la réplication de l'ADN.

Nous évaluerons si 1) la co-exposition modifie la réponse aux dommages à l'ADN ; 2) il peut y avoir un phénomène d'adaptation à un stress génotoxique lorsqu'il y a eu une exposition préalable à des OMM.

Argumentaire de l'originalité et/ou caractère novateur du projet

L'originalité de ce projet réside dans l'approche consistant à étudier l'effet aux OMM appliquées en même temps ou séquentiellement à un stress génotoxique. A ce jour, il est assez bien établi que les radiofréquences seules n'ont que peu d'impact sur l'ADN nucléaire. Les connaissances en ce qui concerne leur impact sur les voies de réponse aux dommages de l'ADN lorsqu'elles sont en co-exposition sont moins bien caractérisées. En ce qui concerne les OMM, l'évaluation expérimentale du risque génotoxique n'a pas encore été réalisée. Pourtant ces ondes seront bientôt massivement déployées dans le cadre des communications sans fil très haut débit (5G par exemple).

Argumentation du choix des questions

Les opérateurs se tournent vers l'utilisation des bandes millimétriques qui permettront de très hauts débits de connexion. L'analyse du risque au niveau de ces fréquences est encore sous-documentée. Notre consortium se propose d'analyser le stress génotoxique dans un contexte de co-exposition avec les OMM (60 GHz). En général, pour acquérir des connaissances détaillées et claires, l'effet d'un seul stress « à la fois » est étudié. En réalité, les cellules sont souvent soumises à l'action de plusieurs stress auxquelles elles doivent répondre/s'adapter. Les compétences du consortium permettent d'identifier des modifications de la voie de réponse aux dommages à l'ADN (DDR), même peu importantes, ou sur une sous-population de cellules avec une grande robustesse (ref1). De plus, nous avons mis en place des méthodes basées sur l'utilisation de plasmides permettant d'évaluer l'efficacité dans les cellules de la réparation par Recombinaison Homologue (HR) et Non-Homologue (NHEJ) (ref5). Ces méthodes sont adaptées à une acquisition rapide et à l'analyse d'une masse importante d'informations. Enfin, au laboratoire, avec des inhibiteurs spécifiques (e.g. ciblant PARP, ATM, ATR etc.) ou des siARN (e.g. ciblant le complexe NBS1, ATM, 53BP1 BRCA1 etc.), nous utilisons

des modèles déficients pour des voies de signalisation/réparation (ref5). Dans le cas du traitement des cancers, l'objectif est de rechercher les conditions permettant l'optimisation de la mort cellulaire en réponse à un agent de chimiothérapie conduisant ainsi à la létalité synthétique. Dans le cas de l'étude proposée, ces méthodes nous permettront de focaliser nos travaux sur une voie de signalisation/réparation pour déterminer si les OMM en co-exposition peuvent avoir, ou non, un impact sur une voie bien ciblée en évitant les phénomènes de robustesse et de redondance qui sont présents dans les cellules.

Description des méthodes mises en œuvre

Nous étudierons les effets des OMM en co-exposition les dommages induits par 1) l'irradiation X ou un radio-mimétique (Néocarzinostatin) (cassures double brins) et 2) un stress oxydatif (Glucose Oxydase). Par analyse (par immunofluorescence, ref5) de l'accumulation des protéines de la DDR au niveau des dommages (γH2AX, pATM etc.) à différents temps, nous caractériserons la dynamique de la mise en jeu des voies de signalisation en réponse aux expositions simples ou des co-expositions. L'étude de faisabilité consistera donc à obtenir des résultats préliminaires en vue d'une étude plus extensive. Dans un premier temps, nous étudierons les effets sur des cellules cancéreuses dont la DDR est bien caractérisée les cellules U2OS et A549. Les résultats intéressants obtenus seront validés dans des cellules humaines normales, les fibroblastes MRC5 et des cellules épithéliales humaines normales de la peau.

Calendrier:

- 3 mois: mises au point des conditions expérimentales
- 6 mois: réalisation des expériences
- 3 mois: fin des expériences, analyse et mise en forme des résultats

4. Membres participants au projet

Equipe 1 : Inserm U1242-COSS/Université Rennes1 - Rennes

Responsable de l'équipe : M. Rémy Pedoux

Equipe 2 : Université de Rennes 1, IRSET Inserm U1085, Equipe TrEC - Rennes

Responsable de l'équipe : M. Yves Le Dréan

Equipe 3 : Université de Rennes 1, IETR - UMR CNRS 6164 - Rennes

Responsable de l'équipe : M. Maxim Zhadobov

5. Budget

Subvention accordée (€ TTC) : 49 853 € TTC

Résumé CoFePMAi - 2019_1_098

Responsable scientifique : M. Maxime Misseri

Organisme : Université de technologie de Compiègne, Département GPI/ TIMR - Compiègne

1. Titre

Etude de faisabilité

24 mois

Identification des Particules Minérales Allongées (fibres asbestiformes et fragments de clivage) dans des corps ferrugineux chez des travailleurs exposés aux poussières minérales

2. Questions à la recherche

FMIN 1 - Protocoles de mesurage, évaluation des expositions et effets sanitaires de particules minérales allongées d'intérêt (PMAi au sens de l'ANSES).

CANC 5 - Identification et/ou validation de biomarqueurs pour évaluer les risques dans des situations d'exposition environnementales ou professionnelles.

3. Résumé

Objectif détaillé

Les travailleurs des mines et carrières, du bâtiment et des travaux publics (BTP) ou intervenant sur voies ferrées peuvent être exposés à des particules minérales allongées d'intérêt (PMAi ; Anses, 2015 et 2017), à savoir des fibres d'amiante asbestiformes, des fragments de clivage des minéraux non asbestiformes homologues des amiantes ou d'autres minéraux d'intérêt.

L'objectif de ce projet est de mettre en place un protocole d'analyse qui permette, à partir des particules et corps ferrugineux (CF) observés dans les prélèvements de parenchyme pulmonaire (PP) et de liquide de lavage broncho-alvéolaire (LLBA) de travailleurs souffrant de pathologies respiratoires, la discrimination entre des fibres classées amiante issues de minéraux asbestiformes et celles issues de fragments de clivage, avec une identification précise de la nature des PMAi.

Argumentaire de l'originalité et/ou caractère novateur du projet

Les PMAi une fois inhalées sont phagocytées par les macrophages alvéolaires et peuvent former des CF. Ceux-ci se forment mieux sur des fibres d'amphiboles que sur des fibres de chrysotile.

Les techniques d'analyse minéralogique en microscopie des fibres classées amiante dans les échantillons de PP et de LLBA sont utilisées classiquement, pour l'aide au diagnostic étiologique de diverses maladies respiratoires (pneumoconioses, cancers respiratoires) et pour des besoins médico-légaux, pour rechercher la présence de marqueurs d'exposition.

L'identification des particules non-asbestiformes dans les échantillons de PP et LLBA est déjà possible mais rarement réalisée dans le contexte des PMAi.

Plusieurs auteurs proposent également des protocoles d'analyse pour différencier les fragments de clivage des particules issues de minéraux asbestiformes dans les prélèvements atmosphériques et dans les matériaux, et des protocoles sont en cours d'élaboration pour l'identification des PMAi dans les matériaux et dans l'air.

Dans les échantillons pulmonaires, le nombre de particules est plus réduit et le gainage ferro-protidique peut masquer certaines de leurs caractéristiques.

Un protocole particulier est nécessaire s'attachant à décrypter la nature de ces PMAi du point de vue morphologique, dimensionnel, chimique et minéralogique.

Argumentation du choix des questions

Le consortium possède l'expertise dans le domaine de la biométrie et des relations marqueurs-effets sur la santé-caractéristiques de l'exposition professionnelle. Il maîtrise les techniques d'analyse en

microscopie optique et électronique à transmission analytique (META) des fibres dans des prélèvements de PP et LLBA.

De même, il a l'expertise pour la détection des PMAi, fibres issues de minéraux asbestiformes ou de fragments de clivage dans les matériaux et l'air.

Il dispose d'une échantillothèque constituée d'environ 10 000 échantillons de PP et LLBA, unique en France et d'une base de données de près de 50000 dossiers.

Description des méthodes mises en œuvre

Recherche bibliographique

Recherche et sélection des échantillons de PP et LLBA répondant à l'objectif (travailleurs des mines, carrières, chantiers BTP dont tunnels, construction, maintenance de voies ferrées (ballast)) dans l'échantillothèque du Laboratoire Amiante Fibres et Particules (LAFP)

Etude des interrogatoires professionnels et environnementaux des cas sélectionnés

Constitution d'une série d'au moins 30 cas à analyser

Recherche des critères minéralogiques utilisables malgré le gainage et la taille réduite des échantillons et des particules pour l'identification des fibres issues de minéraux asbestiformes (exemple : angle d'extinction au Microscope Optique à Lumière Polarisée (MOLP), macling au META)

Identification de toutes les PMAi et des PMA ayant une chimie proche

Analyses en Microscopie électronique à transmission analytique (META), Microscopie Electronique à Balayage Analytique (MEBA) et Microscope Optique à Lumière Polarisée (MOLP)

Rédaction d'un protocole.

4. Membres participants au projet

Equipe 1 : Université de technologie de Compiègne, Département GPI/ TIMR - Compiègne

Responsable de l'équipe : M. Maxime Misseri

Equipe 2 : AD-LAB Environnement - Ostrava – Pustkovec, République Tchèque

Responsable de l'équipe : M. Tomas Danek

Equipe 3 : Ville de Paris, LAFP- SPSE - Paris

Responsable de l'équipe : M. Laurent Martinon

Equipe 4 : Centre Hospitalier Intercommunal de Créteil, Service de Pathologies professionnelles - Créteil

Responsable de l'équipe : M. Jean-Claude Pairon

Equipe 5 : CHU de Bordeaux, Hôpital Pellegrin PQR2, Service santé Travail - Bordeaux

Responsable de l'équipe : Mme Catherine Verdun-Esquer

5. Budget

Subvention accordée (€ TTC) : 49 939 € TTC

Résumé DECHLORMETH - 2019_1_015

Responsable scientifique : M. Cyril Feidt

Organisme : Université de Lorraine, ENSAIA, Unité de recherche AFPA - Vandoeuvre-lès-Nancy

1. Titre

Etude de faisabilité

18 mois

Dégradation de la chlordécone dans les effluents d'élevage par voie méthanogène

2. Questions à la recherche

PHYTO 2.2 - Approche par compartiment (sol, eau, air, consommation...) pour approfondir les effets de la rémanence des substances et de leurs produits de dégradation et les risques pour la santé et pour les écosystèmes.

PHYTO 3 - Développer et évaluer des mesures de prévention visant à réduire les effets de santé : recherches évaluatives sur des mesures de prévention, perception des risques liés aux pesticides et comportement des utilisateurs (professionnels et amateurs), techniques de production permettant de réduire la présence de résidus dans les denrées agricoles ou les usages de produits phytopharmaceutiques.

ACHIM 7 - Evaluation de l'efficacité des mesures de gestion relatives aux contaminants présentant un risque pour la santé humaine : maîtrise du transfert vers les milieux (en particulier aquatiques), réduction des expositions et des risques

3. Résumé

Objectif détaillé

La crise de la chlordécone (CLD) aux Antilles s'est accentuée et les citoyens comme certaines organisations réclament une voie vers le "zéro chlordécone", ce à quoi s'est d'ailleurs engagé le gouvernement fin septembre 2018. Cet enjeu nécessite la maîtrise de la contamination des denrées consommées, dans cette optique, un projet est en cours pour assurer la décontamination des bovins. L'enjeu zéro CLD impose de limiter la diffusion de la molécule via les flux de matières agricoles. Il est donc important en cas de déplacement d'animaux hors des zones chlordéconées de maîtriser le flux potentiel de CLD via les effluents d'élevage. L'objectif du projet est de tester la capacité d'une dégradation de la CLD par voie biologique anaérobie, en conditions méthanogènes.

Si la preuve de concept et d'applicabilité est faite en pilote, cela permettra en changeant d'échelle, de conjuguer un enjeu de production d'énergie par méthanisation (plan EMAA) et un enjeu de sécurité sanitaire.

Il sera ainsi possible de retirer les animaux de leur zone d'élevage contaminée, de les placer en lots sur un site collectif permettant de récupérer les effluents avant de décontaminer ces derniers par méthanisation.

Argumentaire de l'originalité et/ou caractère novateur du projet

L'originalité du projet repose sur le traitement de la chlordécone dans une matrice qui n'a jamais été investiguée jusqu'à présent : les effluents d'élevage. Des résultats récents ont montré que :

- l'animal exposé, excrétaït principalement la molécule sous forme de CLD (2/3) et de chlordécol ou CLD-OH (1/3) dans les fèces
- la CLD pouvait être dégradée par voie microbienne en conditions anaérobies en générant plusieurs familles de métabolites identifiés, dont certaines issues d'une cassure de la molécule mère.

Les conditions d'un méthaniseur correspondent au potentiel redox compatible avec les conditions de dégradation testées, d'où l'idée d'utiliser cette voie pour les effluents d'élevage.

Argumentation du choix des questions

Il y a une question appliquée : pourra-t-on dégrader avec une efficacité suffisante la CLD et son métabolite le CLD-OH en introduisant les effluents dans un méthaniseur ?

Au delà de l'obtention ou non d'une réponse positive à la question précédente, il y a deux verrous scientifiques :

- capacité à mettre en évidence la dégradation de la CLD et du CLDOH dans ce milieu complexe notamment via l'apparition de métabolites ?

- l'ajustement des paramètres de fermentation ?

Ce sont ces deux verrous que le projet tentera de lever.

Description des méthodes mises en œuvre

Les étapes consisteront à suivre la dégradation de la chlordécone en complexifiant le milieu progressivement. En effet un des clés est la capacité à extraire puis quantifier la chlordécone dans une matrice complexe qu'est le digestat. Une première approche se basera sur des milieux simples (énergie fermentescible de type céréales) proches de ceux déjà utilisés par l'équipe du genoscope, avec la CLD apportée "pure". Ces milieux seront inoculés avec un aliquot de digestat du méthaniseur de la ferme expérimentale de l'ENSAIA. L'objectif est de limiter dans un premier temps les phénomènes de sorption.

Le milieu sera ensuite complexifié avec des fèces.

Cette première étape devrait être franchie au bout de 10 mois.

La CLD sera ensuite introduite via des fèces dont le niveau de contamination est connu, issus d'expérimentation menées à l'UR-AFPA.

Cette dernière étape sera franchie au bout de 14 mois.

Ces approches seront réalisées en cinétique. Des prélèvements seront réalisés régulièrement, à la fois pour la recherche de marqueurs de dégradation (CLD et produits de biotransformation) et pour caractérisation de la diversité microbienne (ADNr 16S).

La valorisation scientifique sera développée lors des 4 derniers mois du projet, ainsi que la dissémination vers les acteurs gestionnaires de la chlordécone.

4. Membres participants au projet

Equipe 1 : Université de Lorraine, ENSAIA, Unité de recherche AFPA - Vandoeuvre-lès-Nancy

Responsable de l'équipe : M. Cyril Feidt

Equipe 2 : Université de Lorraine, ENSAIA - Vandoeuvre-lès-Nancy

Responsable de l'équipe : M. Stéphane Pacaud

Equipe 3 : CEA/DRF/IBFJ/Genoscope/UMR8030 - Evry

Responsable de l'équipe : M. Pierre-Loïc Saaidi

5. Budget

Subvention accordée (€ TTC) : 43 264 € TTC

Résumé ExPEC-TEEN - 2019_1_233

Responsable scientifique : Mme Cecile Chevrier

Organisme : Institut de recherche en santé, environnement et travail, Irset - Inserm UMR 1085 - Rennes

1. Titre

Projet complet

36 mois

Exposition prénatale aux contaminants environnementaux et santé cardiovasculaire et métabolique de l'adolescent

2. Questions à la recherche

PHYTO 2.1 - Dans les conditions réelles d'utilisation des substances : renforcer les connaissances sur les liens avec certaines pathologies, insuffisamment investiguées, notamment les pathologies neuro-développementales telles que l'autisme, les pathologies hormonales en lien avec l'effet perturbateur endocrinien, les effets sur la reproduction de manière générale, les maladies métaboliques, les troubles respiratoires et certains cancers.

ACHIM 5 - Effets sur l'homme et l'environnement de faibles doses d'agents CMR (catégories 1A et 1B du règlement CLP) ou perturbateurs endocriniens et/ou cumuls d'exposition.

PE 3 - Étude des effets à faibles doses et/ou des effets cocktails.

3. Résumé

Objectif détaillé

Our objective is to study the effect of prenatal exposure to a large number of chemicals - including known and suspected endocrine disruptors measured by biomarkers - on the cardiovascular and metabolic health of the teenager using data newly collected from two existing mother-child cohorts (PELAGIE and INMA) in Europe.

Argumentaire de l'originalité et/ou caractère novateur du projet

To date, there are few opportunities for studying teenagers' cardiovascular and metabolic health in association with prenatal exposure to chemicals with prospective study design and objective measures of prenatal exposure to chemicals - two major criteria for a highly robust study quality. The main strengths of the present project are: 1) the feasibility of a new follow-up of the families during the teenage years within two high-quality mother-child cohorts, 2) the use of subclinical innovative measurements of cardiovascular and metabolic health (pulse wave velocity as a marker of arterial stiffness, diameter of retinal blood vessels as a marker of the microcirculation) and bioimpedance and skinfolds to better clinically assess adiposity, 3) the collection of fasting blood for measurements of biological markers of metabolic health (e.g., insulin, glucose, and lipids), and 4) the consideration of prenatal exposure to multiple pollutants including appropriate statistical tools.

Argumentation du choix des questions

The research question fits with the following 3 areas: ACHIM5, PE3 and PHYTO2.1. While there is growing evidence on the adverse effects of some endocrine disrupting chemicals on cardiovascular and metabolic health (eg, obesogenic properties of bisphenol-A) from experimental studies, little is known in humans, especially exposure during early-life. Birth cohort studies are valuable sources of data collected from pregnancy onward from which results provide high level of evidence. Both the French and the Spanish cohorts, respectively PELAGIE and INMA, have well-characterised prenatal exposures on various chemicals (pesticides and endocrine disruptors) objectively measured by biomarkers: polychlorinated biphenyls (PCB), organochlorine and organophosphate pesticides, per- and polyfluorinated compounds (PFAS), phthalates, and

phenols (bisphenol-A, parabens). The health effects of exposure to a cocktail of low dose chemicals can therefore be investigated. Understanding the mechanisms involved in the chemicals toxicity during fetal life on later health is of particular relevance since early prevention should be effective to reduce the total burden of cardiovascular and metabolic diseases.

Description des méthodes mises en œuvre

A follow-up including measurements of adiposity, blood pressure, and a blood sample to measure biological markers of the metabolism is already planned (covered by another grant) in 2020 for 500 children from the INMA cohort at 14-15 years old.

Within the present project, a new follow-up of the PELAGIE children in 2020-2021 will be conducted at 15-17 years old, following similar clinical protocol as in INMA, together with 2 new measurements of cardiovascular health that we will implement in both cohorts: pulse wave velocity and diameter of retinal blood vessels. These tools being reliable and reproducible in teenager population and predictors of later cardiovascular events.

The final aim is to pool the data from both cohorts to study the research question in a bigger sample size to increase the statistical power. Specific statistical methods will be used to deal with the multiplicity of pollutants (eg, deletion-substitution-addition algorithm) and potential confounders (eg, diet) will be taken into account. PELAGIE and INMA parents and their teen will be invited to participate by email and letter, and by phone. If the family agrees, a mobile unit managed by the UIC (Unité d'Investigation Clinique) of the University Hospital of Rennes will visit the PELAGIE teen at home (expected sample size: 200 teens) to perform a clinical examination. In INMA, children will be visited at the secondary schools.

4. Membres participants au projet

Equipe 1 : Institut de recherche en santé, environnement et travail, Irset - Inserm UMR 1085 - Rennes

Responsable de l'équipe : Mme Cecile Chevrier

Equipe 2 : CHU Rennes, Service Pharmacologie clinique et biologique - Rennes

Responsable de l'équipe : M. Fabrice Laine

Equipe 3 : ISGlobal – Barcelona, Espagne

Responsable de l'équipe : Mme Charline Warembourg

5. Budget

Subvention accordée (€ TTC) : 199 864 € TTC

Résumé EXPO-ENFANTS - 2019_2 RF_004

Responsable scientifique : Mme Elisabeth Cardis

Organisme : ISGlobal – Barcelone, Espagne

1. Titre

Projet complet

36 mois

Caractérisation des usages et de l'exposition réelle ponctuelle et cumulée aux radiofréquences de dispositifs mobile communicants – y compris nouvelles technologies – chez les enfants à différents âges

2. Questions à la recherche

RFES 4.1 - Recherche sur la caractérisation des usages des différents dispositifs radioélectriques par les enfants (types de dispositifs, fréquence et durée d'usage, en fonction de l'âge, etc.).

RFES 4.2 - Recherche sur l'exposition réelle des enfants aux radiofréquences en situation d'usage des dispositifs radioélectriques (tablettes, téléphones, etc.).

RFES 4.3 - Recherche sur la caractérisation de l'exposition des personnes dans le cadre du cumul d'expositions : CPL, nouvelles technologies de communication, objets connectés, transports autonomes et connectés...).

3. Résumé

Objectif détaillé

The overall objective of EXPO-ENFANTS is to characterise the use, sociological determinants and radiofrequency (RF) electromagnetic fields exposure from RF emitting devices in children at different ages. This will be achieved through three specific aims:

1) Collection of information on use of different communicating and connected devices and technologies, including type of device, use and position, in prospective cohorts of children of different ages (pre-school, school, adolescence) in three countries;

2) Investigate the sociological determinants of device use in children through media and literature reviews, comparisons of network operator offers, and a sociological questionnaire in the prospective cohorts;

3) Estimate resulting RF-EMF exposure in children (RF power absorbed in different organs) by age, device, type of use, technology and sociological factors, as well as cumulated and integrative exposure over time and devices.

Argumentaire de l'originalité et/ou caractère novateur du projet

The project is innovative in that it focuses on:

- children, for whom little information is available concerning uses of communicating/connected devices and exposures;

- sociological determinants of use (including socio-economic status, awareness of parents and network provider offers) which could be important in terms of exposure reduction; and

- on integrating exposures from existing and new devices and technologies (including 5G), not previously included in similar projects.

It is feasible in as much as it builds upon:

- the existence of important and complementary prospective cohorts of children (ages 3-17);

- sociological expertise in the field of health/EMF controversies;

- previous work and expertise aimed at characterising exposures from different technologies and devices in adults (CREST project 2013-2017).

Childhood exposure is increasingly being studied, but no study has linked children's exposure to usage patterns. Even phone use is not the same in children and adults. Adults still use phones close to the ear; children tend to talk using mobile APPS and use many more features of the devices. Voice calls systems depend on country, provider, and price and can be made with Wi-Fi or cellular networks, depending also on parent perceptions and values. Younger children, who do not use phones much, start using tablets, consoles, and communicating devices very early. Thus, exposure in children can vary widely and may differ substantially from that of adults.

Argumentation du choix des questions

The current proposal directly addresses the Question “Caractérisation des expositions” and specifically its three subquestions. The project aims to produce new knowledge, usable for future epidemiologic studies of possible health effects of RF and for the elaboration of public health management policies in the field of RF and health. By including a sociological component, the project will allow the identification of factors (including availability of Wi-Fi, network contracts, awareness) which could lead to exposure reduction in young people.

Description des méthodes mises en œuvre

WP1 – Survey of use of communicating and connected devices among children at different ages (Months 0-24) (ISGlobal, IRAS, INSERM, TPT)

This involves 3 tasks:

- i) review of information on uses and perceived impacts (in the media and sociological literature) and of types of contracts offered (and subscribed for children) by network operators;
- ii) design of a meaningful epidemiological and sociological questionnaire to identify important sources of exposure for children at different ages, as well as to assess uses, technologies and sociological factors based on i) and the findings of CREST; and
- iii) administer the questionnaire in children from the existing French, Spanish, and Dutch prospective cohorts in 3 different ages: pre-school (3-4 years; n=1,000), school-age (9-12 years; n=2,000), and adolescence (14-17 years; n=7,000) and collect anonymised mobile phone operator bills in a subsample.

WP2 – Estimation of childhood RF-EMF power absorption (M0-24) (IMEC, TPT)

The main focus will be on dose from phones, tablets, laptops, and communication/connected devices. Building upon the work conducted in CREST, this involves evaluating: i) actual output power and duty cycles for Wi-Fi usage vs. cellular networks 5G of these devices by children; ii) modifying transfer functions to obtain actual dose and SAR in children received from the use of these devices and technologies by 3D finite-difference time-domain (FDTD) simulations, focusing on the brain, genital organs (concern from public and ANSES about fertility), and whole body.

WP3 – Estimation of cumulative and integrated RF-EMF exposure to children from different devices, uses, and communication technologies at different ages and of the influence of social determinants on exposure (M24-36) (ISGlobal, IRAS, IMEC, TPT)

Information on use from WP1 will be combined with the transfer functions developed in WP2 to

- i) estimate current patterns of cumulative SAR from mobile communication devices in the brain, genital organs and the whole body in children at different ages (assessing whether there are differences between countries, age groups and sexes);
- ii) adapt available source/dose matrices available for adults to children to estimate exposure for different uses; and
- iii) investigate how the sociological determinants of use identified in WP1 may affect exposure levels.

4. Membres participants au projet

Equipe 1 : ISGlobal – Barcelone, Espagne

Responsable de l'équipe : Mme Elisabeth Cardis

Equipe 2 : Universiteit Utrecht, Division Environmental Epidemiology – Utrecht, The Netherlands

Responsable de l'équipe : M. Roel Vermeulen

Equipe 3 : Université de Rennes 1, Institut de recherche en santé, environnement et travail, Irset - Inserm UMR 1085 - Rennes

Responsable de l'équipe : Mme Cecile Chevrier

Equipe 4 : - Inserm, UMR1153 CRESS, Equipe 6 EAROH - Villejuif

Responsable de l'équipe : Mme Barbara Heude

Equipe 5 : Telecom ParisTech, Chaire C2M - Paris

Responsable de l'équipe : M. Joe Wiart

Equipe 6 : IMEC, WAVES research group – Gent, Belgique

Responsable de l'équipe : M. Wout Joseph

5. Budget

Subvention accordée (€ TTC) : 399 983 € TTC

Résumé EXPOSOMFPI - 2019_1_241

Responsable scientifique : M. Hilario Nunes

Organisme : Hôpital Avicenne, AP-HP, Service de pneumologie - Bobigny

1. Titre

Projet complet

36 mois

Influence des facteurs socioéconomiques et environnementaux sur l'histoire naturelle de la fibrose pulmonaire idiopathique

2. Questions à la recherche

SHS 4 - Facteurs d'inégalités d'expositions aux risques environnementaux et sanitaires.

AIRR 1 - Evaluation de l'exposition et des risques afférents aux polluants chimiques dangereux, aux agents pathogènes et aux particules présents dans l'air :

- sur des lieux peu étudiés (commerces, bureaux, moyens de transport),
- sur des zones à proximité de grands axes routiers, de ports, d'aéroports.

AIRR 4 - Indicateurs pertinents pour l'évaluation des expositions chroniques et/ou cumulées à la pollution de l'air (intérieur / extérieur).

3. Résumé

Objectif détaillé

Démontrer que les expositions aux polluants aériens, environnementaux et professionnels et un niveau socioéconomique défavorisé ont un impact sur la sévérité au diagnostic et le pronostic de la fibrose pulmonaire idiopathique (FPI).

Décrire l'environnement extérieur général et spécifique des patients ayant une FPI.

Déterminer si l'effet délétère de ces polluants dépend d'une susceptibilité individuelle (longueur des télomères).

Argumentaire de l'originalité et/ou caractère novateur du projet

La FPI, en incidence croissante, est la plus fréquente et la plus grave des pneumopathies interstitielles idiopathiques. Son histoire naturelle et sa physiopathologie restent mal comprises. Son pronostic est sombre, avec une dégradation progressive de la fonction respiratoire, une médiane de survie d'environ 36 mois, et peu d'options thérapeutiques. La FPI est liée à des agressions alvéolaires répétées sur un poumon sénescant, notamment environnementales, induisant un stress oxydatif suivi d'une réparation aberrante

Bien que de cause inconnue, certaines expositions sont associées à un risque accru de FPI: tabac, expositions professionnelles (poussière de bois, métaux, silice, milieu agricole) et pollution atmosphérique. De plus, plusieurs travaux ont suggéré le rôle de certains polluants sur la survenue d'exacerbations aiguës (ozone), sur le déclin de la fonction respiratoire (PM10) et sur la mortalité (PM2,5, PM10). Néanmoins, ces études ont des limitations méthodologiques (biais d'exposition, en rapport avec les déplacements) et ne se sont pas intéressées à l'ensemble des polluants aériens (pollution domestique).

Les niveaux et types d'exposition aux polluants aériens sont fortement liés au niveau socioéconomique. Or, les données disponibles sur les facteurs socioéconomiques dans la FPI sont rares alors que ce sont des déterminants identifiés de la sévérité d'autres maladies respiratoires chroniques.

Ce projet intégratif, associant plusieurs équipes partenaires expertes, représente la première étude des poly-expositions dans la FPI avec une approche de type «exposome» incluant une dimension socioéconomique. De nouveaux outils seront utilisés comme des capteurs de pollution portables connectés pour mesurer l'exposition réelle en continu, notamment aux polluants domestiques, en parallèle de la fonction respiratoire et la création d'un questionnaire socioéconomique.

Le volet biologique est original et permettra de mieux comprendre les mécanismes d'agression des polluants aériens dans la FPI.

Argumentation du choix des questions

L'utilisation de capteurs de pollution portables (objets connectés avec localisation GPS) permettra d'estimer les expositions chroniques et cumulées à la pollution atmosphérique (question AIR n°4), sur des lieux peu étudiés, notamment la pollution domestique, et dans des zones à proximité de grands axes routiers (question AIR n°1)

L'étude approfondie du milieu socioéconomique en lien avec les expositions des patients permettra d'évaluer les facteurs d'inégalités aux risques environnementaux et sanitaires (question SHS n°4)

Description des méthodes mises en œuvre

Etude de cohorte multicentrique incluant 200 patients ayant une FPI datant de moins de 3 ans, impliquant les centres de référence et compétence des maladies pulmonaires rares (filière RESPIFIL, coordonnateur : V COTTIN)

Période d'inclusion: 1 an ; suivi prospectif: 2 ans ; durée totale: 3 ans

Evaluations:

1) Expositions à la pollution de l'air extérieur et intérieur (I ANNESI-MAESANO).

- Concentration des polluants obtenue à partir des stations de surveillance de la qualité de l'air (O3, NO2, PM10, PM2,5, SO2, CO, COV)

- Capteurs de pollution portables pour un sous-groupe de 30 patients (PM2,5, PM10, COV, T°, humidité, GPS)

- Questionnaire standardisé de l'observatoire de la qualité de l'air intérieur et questionnaire de Vasakova et al. des pneumopathies d'hypersensibilité

2) Expositions professionnelles (C PARIS): questionnaire avec « cursus laboris » détaillé et analyse par matrices emploi-exposition.

3) Indicateurs socioéconomiques (PA ROSENTAL, C CAVALIN): questionnaire dédié, classement selon la nomenclature des professions, catégories socio-professionnelles et niveau d'études et formation selon l'INSEE, revenus individuels et du ménage, couverture sociale, réseau de soin emprunté, habitat et données démographiques.

Ces paramètres seront corrélés aux principaux critères de jugement:

- Sévérité de l'altération de la fonction respiratoire à l'inclusion (CVF et DLCO)

- Déclin CVF (mesurée par exploration fonctionnelle respiratoire / 3 mois et spirométrie hebdomadaire pour les patients appareillés)

- Survenue d'exacerbations aiguës

- Mortalité

Volet biologique: longueur des télomères leucocytaires, biomarqueurs du stress oxydatif...

4. Membres participants au projet

Equipe 1 : Hôpital Avicenne, AP-HP, Service de pneumologie - Bobigny

Responsable de l'équipe : M. Hilario Nunes

Equipe 2 : Inserm, UMRS 1136 EPAR - Paris

Responsable de l'équipe : Mme Isabella Annesi Maesano

Equipe 3 : CHU Rennes, Centre de Consultations de Pathologie Professionnelle et Environnementales - Rennes

Responsable de l'équipe : M. Christophe Paris

Equipe 4 : Université Paris-Dauphine, IRISSE (UNR CNRS-INRA 7170-1427) - Paris

Responsable de l'équipe : Mme Catherine Cavalin

5. Budget

Subvention accordée (€ TTC) : 199 181 € TTC

Résumé FREEDOM - 2019_1_168

Responsable scientifique : Mme Hélène Moche

Organisme : Institut Pasteur de Lille, Laboratoire de Toxicologie - Lille

1. Titre

Projet complet

36 mois

Effets in vitro de mélanges représentatifs de l'exposition alimentaire à des perturbateurs endocriniens

2. Questions à la recherche

PE 3 - Étude des effets à faibles doses et/ou des effets cocktails.

PE 5 - Études sur les niveaux d'exposition et évaluation des risques pour les travailleurs (expositions directes) et pour la population générale (expositions directes et indirectes par exemple via l'alimentation), et en particulier pour les populations vulnérables ou sensibles (enfants, femmes enceintes, personnes atteintes de pathologies...).

3. Résumé

Objectif détaillé

L'objectif du projet est d'étudier les effets de mélanges représentatifs de l'exposition alimentaire à des substances potentiellement perturbatrices endocriniennes (PE). Les principaux mélanges de substances potentiellement PE auxquels les français sont exposés seront identifiés selon les différentes typologies de régimes alimentaires chez les populations infantile et adulte. La composition qualitative et quantitative de mélanges représentatifs sera déterminée par une modélisation des expositions. Les effets des mélanges sélectionnés sur l'action et la synthèse des œstrogènes, des androgènes et des hormones thyroïdiennes seront ensuite étudiés dans des modèles in vitro.

Argumentaire de l'originalité et/ou caractère novateur du projet

La population générale, et notamment les enfants et femmes enceintes particulièrement sensibles aux PE, est exposée via l'alimentation à de multiples substances ayant une activité hormonale et potentiellement PE (phytoestrogènes, Polluants Organiques Persistants, métaux lourds, résidus de certains produits phytopharmaceutiques, substances issues de matériaux au contact des denrées alimentaires, stéroïdes d'origine animale...). Cette exposition est susceptible de varier en fonction des régimes alimentaires, et une modélisation des expositions est nécessaire afin de caractériser des mélanges représentatifs.

Dans ce projet, nous nous proposons d'étudier des mélanges correspondant à des expositions alimentaires réelles. Le profil PE in vitro obtenu pour chaque mélange et substance isolée permettra l'étude des effets à faibles doses ainsi que la détermination des éventuelles interactions entre les substances dans les mélanges (additivité, synergie, antagonisme, potentialisation). Nos résultats permettront de déterminer les mélanges d'intérêt.

Argumentation du choix des questions

Le projet permettra de caractériser des mélanges de substances potentiellement PE auxquelles la population générale (notamment les enfants et les femmes enceintes) est exposée via l'alimentation.

Les effets PE in vitro de ces substances seront étudiés à des doses réalistes, isolément et en mélanges. Cela nous permettra de répondre à la question des faibles doses et des effets mélanges pour les expositions alimentaires aux PE, tels qu'on peut les définir d'après les typologies de consommation.

Description des méthodes mises en œuvre

1ère année : La composition qualitative et quantitative des mélanges modèles sera déterminée par une modélisation des expositions à différentes substances potentiellement PE dans l'alimentation (infantile et adulte), notamment d'après les résultats des études de l'alimentation totale et infantile (EAT2, EATi, Anses) et de l'étude individuelle nationale des consommations alimentaires (INCA3, Anses). La sélection des substances sera effectuée en croisant les paramètres chimiques suivis dans les études EAT2 et EATi avec des listes de substances potentiellement PE telles que celles publiées par l'ECHA (dans le cadre du plan d'action continu communautaire (CoRAP) ou de REACH (ECHA's endocrine disruptor assessment list)), la Commission européenne, The Endocrine Disruption Exchange (TEDX List of potential endocrine disruptors) ou ChemSec (SIN list), ou avec les données de la base EDSP21 (US EPA). A partir de typologies de régimes alimentaires, plusieurs compositions de mélanges de substances chimiques seront arrêtées et serviront de modèles aux études visant à identifier/caractériser le danger associé à ces cocktails.

2ème et 3ème années : Les différentes substances sélectionnées seront étudiées seules et en mélanges dans des modèles in vitro permettant de mettre en évidence des interactions avec les récepteurs des œstrogènes et des androgènes, la stéroïdogénèse ainsi que l'axe thyroïdien. Il s'agit pour l'axe œstrogénique / androgénique / stéroïdogénèse de tests appartenant au niveau 2 du Cadre Conceptuel de l'OCDE (révisé, 2018) : Ligne Directrice de l'OCDE n°455 (réalisé dans la lignée VM7Luc4E2), OCDE 458 (lignée AR-EcoScreen), et OCDE 456 (test de stéroïdogénèse H295R). Pour l'axe thyroïdien, les tests réalisés permettront d'étudier plusieurs mécanismes de perturbation thyroïdienne, tels que l'interférence à l'échelle cellulaire avec les hormones thyroïdiennes, notamment le potentiel à perturber l'hormone thyroïdienne spécifique T3 (test T-Screen) ou une interaction avec l'activité de la thyroperoxydase (TPO) ou du symporteur Sodium Iodure (NIS).

4. Membres participants au projet

Equipe 1 : Institut Pasteur de Lille, Laboratoire de Toxicologie - Lille

Responsable de l'équipe : Mme Hélène Moche

Equipe 2 : Université de Bourgogne Inserm U1231 - Dijon

Responsable de l'équipe : Mme Marie-Christine Chagnon

Equipe 3 : ONIRIS, Laboratoire d'Etude des Résidus et des Contaminants dans les aliments - Nantes

Responsable de l'équipe : M. Bruno Le Bizec

5. Budget

Subvention accordée (€ TTC) : 199 998 € TTC

Résumé HyPAXE - 2019_1_039

Responsable scientifique : Mme Claire Philippat

Organisme : Inserm U1209 - La Tronche

1. Titre

Projet complet

36 mois

Exposition prénatale à des perturbateurs endocriniens à courte demi-vie, axe hypothalamo-hypophysaire et neurodéveloppement de l'enfant.

2. Questions à la recherche

PE 2 - Étude des modes d'action en vue d'identifier une éventuelle perturbation endocrinienne en rapport avec le développement de certaines pathologies, y compris sous l'angle des effets trans/intergénérationnels.

PE 3 - Étude des effets à faibles doses et/ou des effets cocktails.

PE 5 - Études sur les niveaux d'exposition et évaluation des risques pour les travailleurs (expositions directes) et pour la population générale (expositions directes et indirectes par exemple via l'alimentation), et en particulier pour les populations vulnérables ou sensibles (enfants, femmes enceintes, personnes atteintes de pathologies...).

3. Résumé

Objectif détaillé

The HyPAXE project aims to:

1) test whether prenatal exposure to a family of endocrine disruptors (phenols) is associated with child neurodevelopment (including cognition, motricity and dysregulated behaviour);

2) explore the associations between exposure to phenols and dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis functioning;

3) characterize the contribution of dysregulation of the HPA axis functioning in the associations of phenols and child neurodevelopment.

Argumentaire de l'originalité et/ou caractère novateur du projet

Previous epidemiological studies investigating neurodevelopmental effects of phenols measured their biomarkers in a small number (< 4) of maternal urine samples. Given the variability in phenol urinary concentrations, their results are affected (biased) by exposure measurement error. Most of these studies focused on bisphenol A and data regarding the effects of bisphenol A substitutes and other phenols (triclosan, parabens), also known to be endocrine disruptors, are sparse. We will go beyond these limitations thanks to two recent longitudinal mother-child cohorts with collection of repeated urine samples (up to 42 urine samples per women during pregnancy) allowing to precisely assess exposure to up to 12 phenols (including bisphenol A substitutes) during critical time points for brain development. Other strengths lie in the large sample size (N = 500 for SEPAGES and 1200 for the BISC cohort), the objective assessments of child neurodevelopment at early age (thought clinical exams performed by clinicians and eye tracking measurements) and the exploration of biological pathways (disruption of the HPA axis) by which phenols could affect child neurodevelopment.

Argumentation du choix des questions

In line with the axis "Perturbateurs Endocriniens", this project will provide information on exposure levels to phenols (including bisphenol A substitutes) among pregnant women from France and Spain, and study their effects on child neurodevelopment (question 5). Given the high number of phenols assessed (N = 12), cocktail effects (question 3) will be explored (e.g., by studying interactions between compounds). Biological pathways (question 2) by which phenols are hypothesized to affect child neurodevelopment will be investigated (disruption of the HPA axis).

Description des méthodes mises en œuvre

Study populations: We will rely on the French SEPAGES (recruitment: 2014-2017) and the Spanish BISC (recruitment 2018-2020) cohorts, that respectively enrolled 500 and 1200 pregnant women during their first trimester of pregnancy in the cities of Grenoble and Barcelona. The cohorts received the appropriate ethical authorizations and participants signed an informed consent.

Exposure assessment: At the first and third trimesters of pregnancy, women collected three spot urine samples per day over a week. This protocol has been validated in the SEPAGES cohort and a good compliance has been observed (less than 3% of drop out). Biomarkers of exposure to 12 phenols (4 parabens, 5 bisphenols (A, AF, S, B, F), triclosan, triclocarban, benzophenone-3) along with specific gravity, a marker of urine dilution, will be measured in urine.

Health outcome: Child neurodevelopment is assessed at 6 months in the BISC cohort and 3 years in the SEPAGES cohort using clinical exams performed by trained clinicians (Bayley Scales of Infant Development, Wechsler Preschool and Primary Scale of Intelligence), validated questionnaires and eye tracking tasks. Eye tracking allows to evaluate visual attention and cognition in a more precise manner and at an earlier age than done before. We will use the BISC cohort to study effects at early age. SEPAGES will allow us to explore the remanence of these effects at older ages.

Biological pathways explored: Cortisol, the steroid end-product of the HPA axis, will be assessed in maternal hair collected during the third trimester in both cohorts. Hair cortisol reflects longer periods of secretion (typically 3 months) and is less affected by time-specific confounders (e.g., circadian rhythmicity) than saliva cortisol used in the previous study exploring the association between bisphenol A and cortisol levels during pregnancy.

Statistical analysis: In both cohort, extensive information regarding potential confounders (e.g., socio-economic status, maternal IQ) is collected. We will rely on variable selection methods such as Elastic Net and DSA (Deletion Substitution Addition) to study the associations between phenols and child neurodevelopmental scores and between phenols and cortisol levels. These models allow interaction terms between exposures, accommodate non-linear relationships and lead to less false positive than the classical EWAS approach. Interactions with child sex will be explored. Finally, mediation analysis will be performed to examine whether any association observed between phenols and child neurodevelopment could be explained by change in cortisol levels.

The project will last 3 years.

4. Membres participants au projet

Equipe 1 : Inserm U1209 - La Tronche

Responsable de l'équipe : Mme Claire Philippiat

Equipe 2 : ISGlobal – Barcelona, Espagne

Responsable de l'équipe : M. Jordi Sunyer

5. Budget

Subvention accordée (€ TTC) : 199 998 € TTC

Résumé ILEDET - 2019_1_230

Responsable scientifique : Mme Sylvie Babajko

Organisme : Centre de Recherche des Cordeliers, Laboratoire de Physiologie Orale Moléculaire UMRS 1138 - Paris

1. Titre

Projet complet

36 mois

Impact des expositions aux mélanges de perturbateurs endocriniens à faibles doses sur l'œil et la dent : mise en place de marqueurs précoces et d'outils de diagnostic

2. Questions à la recherche

PE 1 - Développement et test de méthodes permettant d'investiguer des mécanismes d'action, en vue de caractériser des modes d'action « perturbateurs endocriniens ».

PE 3 - Étude des effets à faibles doses et/ou des effets cocktails.

PE 4 - Développement de biomarqueurs d'exposition et/ou d'effets à des substances perturbatrices endocriniennes avérées ou suspectées.

3. Résumé

Objectif détaillé

Le but du projet est d'étudier les effets d'un mélange de 15 perturbateurs endocriniens (PE) à faibles doses, seuls ou en combinaison avec le fluor sur deux organes facilement accessibles, l'œil et la dent. Les objectifs sont :

1/ de caractériser les impacts des PE in vivo sur le développement de l'œil et la dent

2/ d'identifier les voies de signalisation impliquées dans les altérations observées sur des modèles cellulaires spécifiques de ces tissus

3/ d'évaluer le lien entre une exposition à faible dose au début de la vie et le développement de pathologies chez l'adulte.

Les atteintes de ces deux organes pourront être des biomarqueurs cliniques précoces d'exposition aux PE.

Argumentaire de l'originalité et/ou caractère novateur du projet

Originalité : Etude de deux organes facilement accessibles à l'examen clinique, l'œil (fenêtre sur le système nerveux central) et la dent dont les défauts sont irréversibles (fenêtre sur l'historique des expositions). La synthèse de l'émail est régulée par les hormones stéroïdes et altérée par certains PE suspectés contribuer au MIH, pathologie de l'émail émergente (1, 2). Ces hormones interviennent aussi dans une pathologie rétinienne du sujet jeune, la chorioretinite séreuse centrale (3). Les modèles de l'incisive à croissance continue et la rétine de rongeur, permettent d'identifier les effets des PE tout au long de la vie.

Caractère novateur : Le choix des mélanges de 15 PE retrouvés dans le liquide amniotique, en combinaison avec le fluor (omniprésent et listé comme PE sur TEDX), sélectionnés sur la base de nos données préliminaires ou récemment publiées (2) (Fini et al., Sci Rep, 2017). L'impact et les mécanismes d'action des mélanges de PE à faibles doses (environnementales) demeurent obscurs tout comme ceux du fluor dont les effets doivent être revisités à la lumière des résultats récents (Bashash et al., EHP, 2017). Le BPA est quant à lui utilisé comme PE paradigme de référence. Nos résultats préliminaires montrent des altérations des tissus dentaires et rétiens chez les animaux exposés au BPA, DEHP et fluor, plus importantes chez les animaux exposés aux mélanges.

Notre approche systématique permettant de comparer les voies d'action dans deux organes est un atout. Une attention particulière sera portée aux effets non-génomiques encore mal caractérisés pouvant expliquer les effets contradictoires apparents entre les impacts biologiques des PE et leurs effets génomiques

marginiaux. Nos résultats préliminaires montrent que ces agents peuvent emprunter des voies communes aux différents types cellulaires.

La complémentarité d'expertise des chercheurs du consortium (œil, dent, cellules et signalisations) permettra d'obtenir des données intégrées sur les PE en limitant les coûts et le nombre d'animaux. Les corrélations entre défauts amélaire et oculaires engendrés précocement par ces PE et les pathologies observables chez l'adulte permettront de proposer un outil de diagnostic d'exposition aux PE.

Argumentation du choix des questions

ILEDET vise à répondre aux questions sur les PE : caractérisation des impacts de mélanges de PE (et fluor) à faibles doses sur deux organes facilement accessibles, mise en évidence de voies de signalisation contribuant aux effets potentialisés ou « cocktails » en lien avec des pathologies étudiées par le consortium, identification de marqueurs cliniques d'exposition non invasifs facilement transposables techniquement et financièrement à l'homme.

Description des méthodes mises en œuvre

Les expériences seront coordonnées par S. Babajko aguerrie aux études sur les PE. Les autorisations d'expérimentations étant en cours de dépôt, le projet démarrera immédiatement.

Six groupes de souris gestantes exposées via l'eau de boisson seront constitués: G1 : mix 1X (15 PE aux doses environnementales moyennes), G2 : 1 mM fluor (dose d'exposition courante), G5 : mix 1X/ 1mM fluor, G1 : 5 µg/kg/j BPA (dose environnementale = groupe référence), G4 : 5 µg/kg/j BPA / 1 mM NaF (réplique données préliminaires), G6 : aucun traitement. Le traitement sera poursuivi après le sevrage, jusqu'à la première collecte de tissus à 30 jours après la naissance (équivalent à la première incisive formée) et permettra d'évaluer les effets résultant des échanges mère-enfant. La seconde collecte est prévue chez les animaux âgés de 8 mois pour les effets à long terme. La fonction rétinienne sera suivie en continu grâce à des outils d'exploration in vivo. Les gènes cibles seront identifiés par transcriptome. Nous analyserons l'architecture générale (propre à chaque tissu), l'architecture des différents types cellulaires (polarité et jonctions), la balance prolifération/apoptose/autophagie déterminante pour l'adaptation des tissus aux expositions toxiques.

Des modèles cellulaires spécifiques des 2 organes permettront d'identifier in vitro les voies de signalisation empruntées par les PE en fonction des doses et mélanges d'exposition (caractérisation des effets « cocktails »): épithélium pigmenté de la rétine (lignées et cellules humaines dérivées de iPS, lignées humaines de cellules dentaires (améloblastes, odontoblastes, ostéoblastes). Les cibles communes aux PE serviront de biomarqueurs pour caractériser les effets à court-terme non-génomiques des PE. Les protéines de la famille Atg (cruciales dans l'autophagie) et une protéine kinase spécifiquement activée par le BPA (publication en cours) sont déjà envisagées.

4. Membres participants au projet

Equipe 1 : Centre de Recherche des Cordeliers, Laboratoire de Physiologie Orale Moléculaire UMRS 1138 - Paris

Responsable de l'équipe : Mme Sylvie Babajko

Equipe 2 : Centre de Recherche des Cordeliers, Laboratoire de Physiologie Orale Moléculaire UMRS 1138 - Paris

Responsable de l'équipe : Mme Emilie Picard

Equipe 3 : Centre de Recherche des Cordeliers, Apoptose, cancer, immunité - Paris

Responsable de l'équipe : Mme Maria Chiara Maiuri

5. Budget

Subvention accordée (€ TTC) : 199 888 € TTC

Résumé ImOTEP - 2019_1_249

Responsable scientifique : Mme Coralie Biache

Organisme : Université de Lorraine, Faculté des Sciences et Technologies, LIEC - UMR 7360 - Vandœuvre-lès-Nancy

1. Titre

Projet complet

36 mois

Impact de traitements par Oxydations chimiques de sols contaminés aux composés aromatiques polycycliques sur la chimie, le Transfert et l'Ecotoxicité de la Pollution

2. Questions à la recherche

ACHIM 1 - Exposition aux contaminants et effets sur les écosystèmes et la santé humaine : milieux aquatiques, approche par compartiment (sol, air, eau...) et effets des mélanges.

ACHIM 6 - Modèles in vitro et in vivo chez l'animal et développement d'indicateurs globaux « d'effets cocktail » pour l'évaluation de la toxicité des mélanges de micropolluants en vue de l'évaluation d'une exposition chronique.

ACHIM 7 - Evaluation de l'efficacité des mesures de gestion relatives aux contaminants présentant un risque pour la santé humaine : maîtrise du transfert vers les milieux (en particulier aquatiques), réduction des expositions et des risques

3. Résumé

Objectif détaillé

Contaminated site management represents major environmental, economic and societal concerns. In Europe, c.a. 200,000 sites are impacted by polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) contaminations mainly by former industrial activities linked to coal exploitation and transformation (coking, gas manufacturing). According to contamination level and future land use, remediation treatments can be required. Diagnosis and post-treatment monitoring are based on regulatory compounds (e.g. 16 USEPA PAHs). However, the contamination on those sites is not limited to these compounds but is rather a complex mixture of molecules presenting a wide range of size and polarity. The ecodynamic of these compounds, their interaction and fate during and after remediation treatments, their toxic mechanisms and their effects on the ecosystems remain unknown. Non-regulatory polar polycyclic aromatic compounds (PACs), especially oxygenated PACs (O-PACs; e.g. ketones, quinones) are known to be toxic towards multiple organisms such as zebra fish, oligochaete, algae, collembola and plants. These compounds can contribute to the initial contamination and can be produced during remediation treatments, especially in the case chemical oxidation. The macromolecular fraction (i.e. compounds of size > 500 Da) is particularly reactive, can interact with different organic and mineral soil constituents and affect the behavior and the impact of the pollutants on the environment. Currently, the macromolecular fraction is poorly characterized and its potential role on soil toxicity is not clear. Therefore, it is crucial to get more information on such complex mixture to assess its effects on biota and consider it for risk evaluation of contaminated sites.

The main objective of the ImOTEP project is to determine the impact of remediation treatments on the characteristics and chemistry of different molecular fractions (especially O-PACs and macromolecules), their soil-water transfer and their toxicity.

Argumentaire de l'originalité et/ou caractère novateur du projet

In the ImOTEP project, the range of traditionally monitored compounds (i.e. 16 USEPA PAHs) will be broadened by including analysis of reactive (macromolecules) and toxic compounds (O-PACs) and taking into account the toxic effects of such complex mixture on biota.

Unlike classical studies based on simplified systems (i.e. spiked matrices), this project will better represent a real system by studying real contaminated soils sampled in field. This project gathers scientists from different disciplines (ecotoxicology, environmental organic geochemistry) and allows combining biological and chemical

approaches to identify the impact of exposure to contaminants on aquatic and soil organisms, characterize the contamination fractions and determine the contamination transfer to the organisms from different media (soil and water).

The ImOTEP project will allow identifying the risks associated with (i) the occurrence of compounds initially present in the contaminated soils and potentially produced during oxidation treatments, (ii) their mobilization in aqueous phase and (iii) their uptake and effects on organisms.

Argumentation du choix des questions

The ImOTEP project is connected to the research question “Chemical agents”.

It will integrate the soil and water compartment and will particularly address the questions of

(i) organic contamination transfer from soil to aqueous media as well as global toxicity induced by different families of compounds (Q1)

(ii) the effect of complex mixtures by combining in vitro and in vivo animal models (Q6)

(iii) the impact of remediation treatments on contamination chemistry, mobility and ecotoxicity (Q7).

Description des méthodes mises en œuvre

To address these questions the project will combine fine chemical characterization and in vitro and in vivo ecotoxicity testing.

Real PAC contaminated soils will be treated by different chemical oxidations applied at two concentrations. The different fractions of the contamination (polar, aromatic and macromolecular) will be characterized with molecular analysis (GC-MS, HPLC-SEC) before and after treatments. Further identification of polar and macromolecular fractions will be made with high-resolution mass spectrometry (APPI/ESI Q-TOFF) analyses. Additionally, spectroscopic analysis (IRTF) will provide information on the structure and functional group of the fractions.

Ecotoxicity testing will be carried out on soil, soil leachate and isolated organic fractions. It will allow to (i) identify the fraction responsible for toxic effect on the organisms and (ii) discriminate potential effects of contamination mixture (“cocktail effect”).

In vivo tests on selected terrestrial (plant, earthworm) and aquatic organisms (algae, daphnia, rotifers, hydra) will provide an integrative ecotoxic response of the initial and treated soils, soil fractions and associated leachates. Additionally, combining in vivo tests with in vitro testing using cellular models enables identification of specific modes of action (mutagenicity, endocrine disruption, oxidative stress, membrane damaging, enzymatic responses) and the adverse outcome on the organisms.

Microscopy and imaging techniques will be applied to (i) determine the contaminant location and accumulation pattern within the cells and selected organisms (confocal microscopy) and (ii) evidence cell structure and sub-structure possible modifications induced by the presence of contaminant (holotomography).

The ImOTEP project will start in fall 2019 and will last three years.

4. Membres participants au projet

Equipe 1 : Université de Lorraine, Faculté des Sciences et Technologies, LIEC - UMR 7360 - Vandœuvre-lès-Nancy

Responsable de l'équipe : Mme Coralie Biache

Equipe 2 : Université de Lorraine, LIEC - UMR 7360 - Metz

Responsable de l'équipe : Mme Carole Leguille

Equipe 3 : Université de Lorraine, Laboratoire GeoRessources - FST - Vandœuvre-lès-Nancy

Responsable de l'équipe : Mme Catherine Lorgeoux

Equipe 4 : Örebro universitet Fakultetsgatan 1 – Örebro, Suède

Responsable de l'équipe : Mme Maria Larsson

5. Budget

Subvention accordée (€ TTC) : 199 492 € TTC

Résumé INDEE - 2019_1_237

Responsable scientifique : M. Selim Ait-Aissa

Organisme : Ineris, Unité Ecotoxicologie in vitro et in vivo / UMR-I 02 SEBIO - Verneuil-en-Halatte

1. Titre Projet complet 36 mois

Caractérisation et identification de perturbateurs endocriniens environnementaux dans les milieux aquatiques : une approche inter-espèces

2. Questions à la recherche

ACHIM 1 - Exposition aux contaminants et effets sur les écosystèmes et la santé humaine : milieux aquatiques, approche par compartiment (sol, air, eau...) et effets des mélanges.

ACHIM 6 - Modèles in vitro et in vivo chez l'animal et développement d'indicateurs globaux « d'effets cocktail » pour l'évaluation de la toxicité des mélanges de micropolluants en vue de l'évaluation d'une exposition chronique.

PE 6 - Construction d'outils pour relier biosurveillance et évaluation des expositions ; détermination d'éventuelles fenêtres d'exposition critique.

3. Résumé

Objectif détaillé

Les milieux aquatiques sont contaminés par une multitude de micropolluants, présents sous forme de mélanges complexes, dont beaucoup sont des perturbateurs endocriniens (PE) capables d'interférer avec des récepteurs nucléaires (RN) stéroïdiens impliqués dans les régulations du système hormonal. L'utilisation de bioessais in vitro basés sur le mécanisme d'action des PE est pertinente pour caractériser ces contaminations car elle intègre les composés connus (ciblés a priori par les analyses chimiques) et inconnus, tout en prenant en compte de possibles interactions entre polluants au sein des mélanges.

Cependant, la majorité des études menées en biosurveillance environnementale ciblent un nombre restreint de RN (i.e. ER, AR) humains sans tenir compte d'autres activités endocriniennes potentielles, ni de possibles différences inter-espèces. En effet, à travers le criblage de substances individuelles sur un panel de lignées cellulaires humaines exprimant de façon stable différents RN humains et de poisson zèbre (ER, AR, GR, PR, MR, ERR?, PXR, CAR, PPAR α , PPAR?, LXR et FXR) nous avons montré qu'il existe des différences inter-espèces significatives pour certains RN, dont PPAR?, PXR, PR, GR et MR. De plus, nous avons montré que l'utilisation de bioessais spécifiques du poisson zèbre pouvait révéler des profils d'activité oestrogénique spécifiques sur certaines rivières impactées par des effluents industriels et urbains (Sonavane et al 2016, 2018). Aussi, l'utilisation de modèles spécifiques d'espèces aquatiques semble indispensable pour une bonne évaluation du risque pour l'environnement.

L'objectif du projet INDEE vise à caractériser et identifier des PE ayant une activité endocrinienne spécifique selon l'espèce cible (i.e. humain vs poisson zèbre) dans des effluents urbains et des eaux de rivières. Pour cela, une démarche bio-analytique utilisant une batterie de bioessais in vitro humains et de poisson permettra d'établir des profils d'activités multi-RN et, en combinaison avec des méthodes analytiques (i.e. approche EDA ou effect-directed analysis), d'identifier, au sein des mélanges, les molécules responsables d'effets inter-espèces.

Argumentaire de l'originalité et/ou caractère novateur du projet

Le projet INDEE est novateur sous plusieurs aspects :

- Développement d'une démarche intégrée originale combinant de nouveaux bioessais (établissement de profils d'activité spécifiques d'espèce) et des méthodes innovantes de prélèvement et d'analyses pour la caractérisation de la toxicité des mélanges environnementaux complexes.
- Acquisition de données sur l'occurrence d'activités endocriniennes peu ou pas renseignées dans les milieux (e.g. PXR, PPAR α , MR, GR).

- Identification de nouveaux PE environnementaux.

Au final, les données fournies par ce projet aideront à l'élaboration de stratégies d'évaluation des risques pour les écosystèmes et la santé humaine.

Argumentation du choix des questions

Le projet INDEE contribuera au développement de nouveaux outils de biosurveillance des perturbateurs endocriniens dans les milieux aquatiques (Axe PE/questions 1 et 6 ; Axe Milieu et contaminations, question 2). Il permettra de relier les effets biologiques à des expositions à des substances chimiques en mélanges (Axe : agents chimiques, Questions 1 et 6). L'établissement de profils d'activités spécifiques d'espèce aidera à mieux évaluer le risque pour l'Homme et pour l'environnement (Axe milieux et contaminations, question 2).

Description des méthodes mises en œuvre

Le projet implique différentes méthodologies et étapes :

1) échantillonnage (année 1) : une sélection d'une dizaine de sites représentatifs de différentes pressions anthropiques (effluents urbains, industriels, domestiques, sites rivières de référence et impactés) s'appuiera sur des études terrains actuellement menées par l'INERIS en collaboration avec l'agence française pour la biodiversité. Sur chaque site, des préleveurs passifs de type POCIS et SPMD ou membranes silicone, ciblant des composés polaires et apolaires dissouts, seront mis en œuvre en parallèle d'échantillons plus classiques d'eaux de surface et d'eaux usées. Les échantillons seront extraits par un solvant organique et soumis aux bioessais.

2) établissement des profils d'activités PE dans des extraits organiques d'eaux de surface et eaux usées ainsi que d'échantillonneurs passifs à l'aide d'une batterie de modèles cellulaires exprimant le gène de la luciférase sous contrôle de différents RN développés par l'INSERM (années 1 et 2)

3) pour les échantillons les plus pertinents identifiés en étape 2, les extraits seront fractionnés par HPLC (96 fractions par extrait) et chacune des fractions testées sur les bioessais in vitro. Les fractions actives présentant un profil spécifique d'espèce seront ensuite analysées par spectrométrie de masse haute résolution (HRMS) suivant une stratégie d'identification structurale mise en place au laboratoire LPTC-EPOC (années 2 et 3).

4. Membres participants au projet

Equipe 1 : Ineris, Unité Ecotoxicologie in vitro et in vivo / UMR-I 02 SEBIO - Verneuil-en-Halatte
Responsable de l'équipe : M. Selim Ait-Aissa

Equipe 2 : Inserm, IRCM-INSERM U1194-ICM - Montpellier
Responsable de l'équipe : M. Patrick Balaguer

Equipe 3 : Université de Bordeaux, EPOC/LPTC - Talence
Responsable de l'équipe : Mme Hélène Budzinski

5. Budget

Subvention accordée (€ TTC) : 199 091 € TTC

Résumé IRAM - 2019_1_041

Responsable scientifique : M. James Devillers

Organisme : CTIS - Rillieux La Pape

1. Titre

Projet complet

36 mois

Identification in silico et in vivo de répulsifs anti-moustiques faiblement (éco)toxiques

2. Questions à la recherche

LAVE 2 - Lutte anti-vectorielle : nouvelles substances actives et produits biocides, développement de technologies innovantes (lutte biologique, lutte génétique...) sans exclure l'optimisation des méthodes de piégeage et large spectre ; efficacité de la lutte anti vectorielle (indicateurs de type coût efficacité ou bénéfices-risques ; prise en compte des facteurs de pratiques culturelles

3. Résumé

Objectif détaillé

Les répulsifs occupent une place prépondérante dans les stratégies de lutte contre les moustiques nuisants et vecteurs de maladies. Ainsi, le marché mondial des répulsifs anti- moustiques devrait atteindre 4,8 milliards de dollars d'ici 2022, avec un accroissement prévisionnel de 7,7 % par an. Il est très largement dominé par le DEET (N,N-diethyl-m-toluamide), breveté en 1946 pour un usage militaire et dont l'utilisation civile date de 1957. On estime que 200 millions de personnes utilisent du DEET chaque année. Pourtant, le DEET pose de nombreux problèmes. Son efficacité est limitée contre *Anopheles albimanus* et des phénomènes de résistance se rencontrent avec *Aedes aegypti*. C'est un irritant cutané potentiel et des effets neurotoxiques ont été observés chez l'enfant. Un nombre restreint d'autres molécules (e.g. picaridin, PMD, IR 3535) à spectres d'activité moins larges, ainsi que certaines huiles essentielles, complètent le marché des répulsifs anti-moustiques qui comporte très peu de molécules. Il est donc nécessaire de trouver de nouveaux répulsifs actifs durablement sur les moustiques mais dont les effets (éco)toxicologiques sont faibles. C'est ce que nous proposons de faire en utilisant différentes approches in silico pour identifier de nouveaux répulsifs potentiels qui seront synthétisés et testés au laboratoire. Leurs effets (éco)toxicologiques seront également évalués.

Argumentaire de l'originalité et/ou caractère novateur du projet

L'élaboration de modèles structure-activité répulsive de type QSAR à partir d'un très grand échantillon de molécules présentant une grande diversité structurale et d'intelligence artificielle (IA) n'a jamais été faite. Ceci permettra d'identifier des molécules candidates structurellement différentes du DEET et dont l'activité répulsive est intéressante. Le couplage avec de la modélisation moléculaire pour affiner la sélection des molécules et mieux comprendre leur mécanismes d'action est également très novateur. L'originalité de notre projet réside aussi dans la synthèse des molécules candidates. Enfin, à notre connaissance, ce sera la première étude de modélisation de répulsifs prenant en compte les effets adverses des molécules candidates.

Argumentation du choix des questions

Le projet répond à la question : Lutte anti-vectorielle : nouvelles substances actives et produits biocides, développement de technologies innovantes.

La découverte de nouveaux répulsifs représente un enjeu majeur car elle étoffera la liste trop restreinte de molécules capables de repousser les moustiques et d'augmenter nos connaissances sur les liens existant entre la structure des molécules et leur perception par les moustiques contribuant ainsi à une meilleure connaissance de leur mécanisme d'action. La recherche de répulsifs présentant moins d'effets adverses pour l'homme et l'environnement est également essentielle.

Description des méthodes mises en œuvre

Modélisation (24 mois). L'US Army a testé le caractère répulsif de plus de 6000 molécules sur *Ae. aegypti* selon les mêmes conditions expérimentales. Les molécules ont été testées en cutané et sur vêtements. P1 ayant obtenu une copie de cette banque, elle sera utilisée pour élaborer les modèles QSAR. Les molécules seront codées par des descripteurs topologiques et physico-chimiques 2D et 3D. Un algorithme génétique couplé à un perceptron à trois couches permettra de sélectionner des sets de descripteurs moléculaires pertinents. Des techniques d'AI utilisant des réseaux de neurones artificiels de différents types dont le « Deep learning » (DL) seront testés. Utilisé en « Big data » le DL permet, grâce à des algorithmes puissants, d'établir des relations complexes à partir de grands échantillons d'apprentissage. Les modèles QSAR obtenus subiront une validation interne (i.e., LOO) et externe par échantillons tests. Le ou les modèles sélectionnés seront utilisés pour prédire l'activité théorique d'un grand nombre de molécules non synthétisées (MNS). Les protéines liant les odeurs (odorant-binding proteins, OBP) intervenant dans le mécanisme de l'olfaction chez les insectes et la structure cristalline (SC) de celle d'*Ae. aegypti* étant disponible (PDB : 3K1E), P1 utilisera de la modélisation moléculaire pour optimiser la sélection des MNS et affiner leur mécanisme d'action.

Synthèses (10 mois). Les MNS sélectionnées seront synthétisées par P2 si elles n'existent pas dans le commerce. Les synthèses seront toujours suivies d'une étape de purification (>95 %) et d'une caractérisation par RMN, spectrométrie de masse haute résolution, HPLC, UV-visible et Infrarouge.

Tests (3 mois). Les 5 molécules présentant le meilleur compromis entre activité répulsive et diversité structurale seront testées au laboratoire par C1 en utilisant le test normalisé OMS de mesure du caractère répulsif des molécules. Elles seront testées prioritairement sur *Ae. aegypti* mais selon les résultats, d'autres espèces sont également envisagées.

Les effets (éco)toxicologiques (3 mois) des molécules candidates seront évalués par P1 en utilisant la QSAR Toolbox (OCDE) recommandée pour être utilisée par les gouvernements, l'industrie chimique, etc. pour combler les lacunes en matière de données d'(éco)toxicité nécessaires pour évaluer les effets adverses des molécules. De plus, la SC de l'OBP chez *Apis mellifera* étant disponible (PDB : 3S0D), l'impact potentiel des molécules sur l'olfaction de l'abeille sera également étudié *in silico*. Une comparaison avec les mécanismes observés chez *Ae. aegypti* sera faite.

4. Membres participants au projet

Equipe 1 : CTIS - Rillieux La Pape

Responsable de l'équipe : M. James Devillers

Equipe 2 : Université Paul Sabatier, Laboratoire des IMRCP - Toulouse

Responsable de l'équipe : Mme Valerie Sartor

5. Budget

Subvention accordée (€ TTC) : 121 472 € TTC

Résumé Lilli - 2019_1_108

Responsable scientifique : Mme Anke Huss

Organisme : Utrecht University, Institute for Risk Assessment Sciences – Utrecht, The Netherlands

1. Titre

Projet complet

36 mois

Exposition nocturne à la lumière et qualité du sommeil

2. Questions à la recherche

LUMI 1 - Caractérisation des expositions et des impacts de la pollution lumineuse pour la population générale et pour l'environnement.

3. Résumé

Objectif détaillé

Exposure to light at night can affect sleep quality and health, but how can light exposure be assessed for large epidemiological studies? Measurements are time intensive and costly, which is why a range of previous epidemiological studies have evaluated light at night levels in bedrooms either with questionnaires ("how dark is your bedroom at night?"), or have used proxies of light levels, e.g. satellite pictures or International Space Station (ISS) photos. It is unclear how valid either of these approaches are. One previous publication indicated that satellite pictures have very low correspondence to indoor measured light levels ($r=0.03$; Rea et al, Chronobiol Int 2011). We recently corroborated that finding using bedroom measurements in 250 Dutch children using sensitive light meters (manuscript under rev.). In addition, special interest is in the blue light spectrum, which has been shown to be particularly effective in terms of eliciting biological responses. In contrast to satellite pictures such as the VIIRS-DNB, ISS photos also include information regarding light in the blue spectrum. ISS pictures, however, are not easily calibrated and display large spatial variation across photos. For both satellite or ISS pictures it is unclear in how far captured (upward directed) light represents outdoor, indoor or personal exposure to light at night. ISS photos have been used to derive outdoor exposure to blue light, but again with unclear validity as to personal exposure. In our previously mentioned measurement sample, blue light exposure was also not correlated to satellite pictures.

We suggest here to perform outdoor, indoor and personal light measurements with a sensor that can measure in five different light spectra (blue, red, green, infrared, UV; and Lux). The sensor is sensitive (<0.01 lux LOD), small (1x2x5cm) and lightweight and can be used for personal as well as for outdoor measurements. Light measurements will also be used to evaluate effects of exposure patterns on sleep.

Aim of this project is to

1) Perform outdoor measurements at night to measure light exposure in different spectra at a high resolution (1 measurement per second, <0.01 lux sensitivity). For this aim, different areas with different 3D geometry, street lighting characteristics and different ISS pictures will be selected, in France, Spain and the Netherlands. The measurements will be used to develop outdoor exposure maps, and to validate satellite and ISS pictures.

2) Perform one whole week of light personal measurements among 75 volunteers per country living in the selected areas of outdoor measurements. During the night, the meters will measure bedroom light levels. These measurements will be used to validate in how far outdoor exposure can be used as proxy for indoor and personal exposures, especially in the blue light spectrum.

3) Assess for each participant sleep parameters like sleep quantity or efficiency using wrist-accelerometry. These measurements will be used to assess in how far light exposure affects sleep.

Argumentaire de l'originalité et/ou caractère novateur du projet

Recent epidemiological studies evaluating satellite light at night pictures have suggested that higher levels of LAN exposure increase risk of breast and prostate cancer, obesity or markers of cardiovascular disease.

Validation of the exposure assessment in terms of outdoor, indoor or personal measurements of using satellite or ISS photos is largely lacking. In addition, outdoor light at night measured by satellites displays higher levels in urban environments, which means that this measure could potentially represent a proxy for other, likely urban, environmental exposures such as noise or air pollution. For example, in our above mentioned sample, satellite measured light at night had a correlation of 0.76 with NO₂, a primarily traffic related air pollutant. This means that it is unclear how previous epidemiological studies evaluating light at night exposures from satellites or ISS pictures should be interpreted. For the future, the planned measurement survey will be informative regarding the design of future studies planning to evaluate associations of light at night with health. If valid, we will apply outdoor light proxies in ongoing large cohort studies to evaluate health effects.

Argumentation du choix des questions

Our project links to "Pollution Lumineuse" and will improve exposure assessment, validate methods for exposure assessment for large epidemiological studies and evaluate effects on sleep.

Description des méthodes mises en œuvre

Outdoor measurements will be done in selected areas that pertain to differences in build-up and ISS picture coverage. Surveys will be performed during night (outside astronomical twilight) and measurements will be taken in horizontal, downwards and upwards direction to capture exposure (down and horizontal) and satellite measured (upward directed) light. Outdoor measurements will be taken walking or biking as average speeds allow for measurements with high spatial accuracy while enabling mapping of whole areas. We will map outdoor light exposures in the areas of addresses of participants of the personal measurements. Simultaneously the measurements can be used to validate satellite measured visible light, and ISS photographed light exposure in specific light spectra.

Per country 75 persons will be invited to participate in the personal measurements. Participants will carry the meters during a whole week and during nights the meters will assess bedroom exposure levels. We will also ask for indoor light sources in order to evaluate additional light predictors (e.g. monitor use) and bedroom darkness. Simultaneous wrist accelerometry will allow the evaluation of personal light exposure patterns on sleep quality.

Month 1-8: Protocol and ethical clearance for personal measurements,

Month 9-20: Personal measurements, outdoor survey, repeat per country,

Month 21-36: Analysis and reporting.

4. Membres participants au projet

Equipe 1 : Utrecht University, Institute for Risk Assessment Sciences – Utrecht, The Netherlands

Responsable de l'équipe : Mme Anke Huss

Equipe 2 : Inserm U1153 - EAROH - Villejuif

Responsable de l'équipe : Mme Sabine Plancoulaine

Equipe 3 : ISGlobal – Barcelona, Espagne

Responsable de l'équipe : Mme Monica Guxens

5. Budget

Subvention accordée (€ TTC) : 199 990 € TTC

Résumé LuLi - 2019_1_215

Responsable scientifique : Mme Muriel Vayssade

Organisme : Université de technologie de Compiègne, Centre de recherches, Laboratoire Biomécanique Bioingénierie UMR CNRS 7338 - Compiègne

1. Titre

Etude de faisabilité

24 mois

Développement d'un dispositif innovant in vitro pour l'évaluation toxicologique de xénobiotiques inhalés : Poumon/Foie

2. Questions à la recherche

ACHIM 6 - Modèles in vitro et in vivo chez l'animal et développement d'indicateurs globaux « d'effets cocktail » pour l'évaluation de la toxicité des mélanges de micropolluants en vue de l'évaluation d'une exposition chronique.

3. Résumé

Objectif détaillé

L'objectif de cette étude de faisabilité est de connecter in vitro deux organes, le poumon et le foie, à l'aide d'une plateforme microfluidique. Ce dispositif innovant serait pertinent pour l'étude toxicologique de substances inhalées (vapeurs de solvants, aérosols de pesticides, nanoparticules, ...) et l'évaluation de l'effet de polluants sur la santé humaine.

L'appareil respiratoire est une voie d'entrée de nombreux xénobiotiques. Actuellement, les études sur la toxicité par inhalation reposent sur des modèles in vitro, souvent peu représentatifs des conditions physiologiques, et in vivo. Afin de développer des méthodes alternatives à l'expérimentation animale, nous avons effectué un premier couplage entre une barrière pulmonaire immergée et une biopuce hépatique (lignée HepG2), capable de métaboliser les molécules chimiques en solution exposées sur la barrière pulmonaire [1]. L'objectif de notre étude de faisabilité est de réaliser un dispositif plus pertinent pour l'évaluation de la toxicité des substances inhalées : i) exposer les barrières pulmonaires à l'interface air-liquide et à des aérosols ; ii) mimer l'environnement alvéolaire (modèle alvéolo-capillaire [2]) ; iii) utiliser des cellules primaires humaines. Le rôle de chaque compartiment sur la toxicité des substances sera étudié : nous rechercherons l'impact de la biopuce hépatique vis-à-vis de la toxicité pulmonaire des substances inhalées, et/ou l'éventuelle modulation de la toxicité hépatique des composés inhalés par les cellules pulmonaires. Les données expérimentales seront utilisées pour alimenter des modèles physiologiques toxico-cinétiques (PBPK) et être utilisées en toxicologie prédictive ou lors de processus de surveillance.

Argumentaire de l'originalité et/ou caractère novateur du projet

Le couplage que nous proposons de réaliser entre une voie d'absorption majeure de xénobiotiques et un organe de détoxification comme le foie est original. Pour l'heure, les modèles d'inhalation in vitro correspondent à des barrières pulmonaires (constituées d'une à plusieurs populations cellulaires) cultivées en condition statique. Les puces pulmonaires existantes reproduisent certains paramètres physiologiques mais n'ont jusqu'à présent pas été utilisées en interaction avec d'autres organes. Une seule publication très récente décrit un système où un épithélium bronchique combiné à des sphéroïdes hépatiques d'HepaRG est traité par de l'aflatoxine B1 en solution. Notre approche novatrice consiste à coupler des modèles in vitro mimant l'environnement alvéolaire à une puce hépatique et à les exposer à des aérosols pour reproduire une exposition par inhalation pertinente. Par ailleurs, notre étude de faisabilité s'appuie sur une biopuce hépatique bien décrite et caractérisée, dans laquelle les activités métaboliques des hépatocytes primaires sont

maintenues à long terme. Ce modèle a ainsi montré son efficacité pour l'identification des biomarqueurs de toxicité de médicaments et pesticides [3,4].

Argumentation du choix des questions

L'établissement d'un tel dispositif reproduisant les interactions dynamiques entre tissus devrait permettre une évaluation plus physiologique et plus fiable de la toxicocinétique de substances inhalées (aérosols, nanoparticules, ...), et une meilleure connaissance des éventuelles modulations de toxicité entre organes. La possibilité de maintenir le dispositif en culture sur plusieurs jours permet d'envisager des expositions répétées aux aérosols ainsi que des expositions à des mélanges de micropolluants (hydrocarbures, pesticides, composés organiques volatils ...).

Description des méthodes mises en œuvre

Cette étude de faisabilité est composée de 3 tâches principales :

- Tâche 1 : Exposition séparée des barrières pulmonaires et puces hépatiques aux substances (UTC/INERIS, T0 à 12 mois).

Les modèles pulmonaires seront établis sur inserts, exposés à l'interface air-liquide et caractérisés (fonction de barrière, expression de marqueurs épithéliaux, surfactants). Le compartiment hépatique (hépatocytes primaires) sera réalisé dans une biopuce microfluidique [3,4]. Chaque compartiment sera exposé séparément aux xénobiotiques choisis (CCI4, pesticides tels que les pyréthriinoïdes, glyphosate ...) et la toxicité analysée (mortalité cellulaire, fonction de barrière, inflammation...). Le métabolisme des cellules hépatiques sera évalué (activités de cytochromes, synthèse d'albumine, dégradation des substances toxiques...).

- Tâche 2: Couplage des compartiments poumon/foie et exposition aux aérosols (UTC/INERIS, T6 à 24 mois).

Les deux organes seront couplés à l'aide du dispositif IIDMP développé par E. Leclerc [4], permettant le passage d'un flux de milieu de culture entre les compartiments. Les barrières pulmonaires seront exposées aux aérosols générés par le dispositif VitroCell, et la toxicité sur chacun des compartiments sera évaluée (méthodes tâche 1). La comparaison des résultats obtenus sur les monocultures et le couplage permettra d'évaluer l'apport de notre dispositif aux études de toxicité.

- Tâche 3: Modèles PBPK (INERIS, T18 à 24 mois).

L'ensemble des données expérimentales obtenues sur les couplages exposés aux substances sera transféré aux modèles PBPK. Ces modèles permettront d'estimer les doses de xénobiotiques et leurs métabolites, de décrire les processus qui régulent l'absorption des substances, leur distribution et élimination.

4. Membres participants au projet

Equipe 1 : Université de technologie de Compiègne, Centre de recherches, Laboratoire Biomécanique Bioingénierie UMR CNRS 7338 - Compiègne

Responsable de l'équipe : Mme Muriel Vayssade

Equipe 2 : Ineris - Verneuil-en-Halatte

Responsable de l'équipe : Mme Ghislaine Lacroix

5. Budget

Subvention accordée (€ TTC) : 49 760 € TTC

Résumé miR-Ex-HAP - 2019_1_010

Responsable scientifique : Mme Lydie Sparfel

Organisme : Université de Rennes 1, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, IRSET UMR INSERM 1085 - Rennes

1. Titre

Projet complet

36 mois

Utilisation des miARN circulants comme indicateurs d'exposition aux hydrocarbures aromatiques polycycliques seuls et en mélange

2. Questions à la recherche

CANC 5 - Identification et/ou validation de biomarqueurs pour évaluer les risques dans des situations d'exposition environnementales ou professionnelles.

ACHIM 3 - Quantification des niveaux d'exposition en population générale et pour les populations vulnérables ou sensibles. Développement de méthodes de mesurage de l'imprégnation biologique des populations exposées aux produits chimiques et en particulier aux CMR.

ACHIM 5 - Effets sur l'homme et l'environnement de faibles doses d'agents CMR (catégories 1A et 1B du règlement CLP) ou perturbateurs endocriniens et/ou cumuls d'exposition.

3. Résumé

Objectif détaillé

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), générés par combustion incomplète des matières organiques, font partie des polluants environnementaux les plus fortement représentés. Les expositions humaines aux HAP, d'origine professionnelle ou domestique, se font souvent sous forme de mélanges complexes et ont été associées à la survenue d'effets délétères (cancérogènes, cardiovasculaires ou immunotoxiques). L'évaluation du risque lié aux mélanges d'HAP reste toutefois encore mal maîtrisée. Les cellules mononucléées du sang périphérique, facilement accessibles par simple ponction sanguine chez l'homme et présentes au niveau des barrières de l'organisme représentant les points d'entrée des HAP, sont des cibles privilégiées pour l'étude des effets toxiques de ces polluants. Dans la continuité de nos travaux précédents ayant caractérisé les modifications des gènes et des séquences d'ADN en réponse aux HAP dans ces cellules circulantes, nous souhaitons nous intéresser maintenant au contrôle de l'expression des gènes après exposition à ces polluants. L'objectif de ce projet est de proposer l'utilisation des microARN (miARN) circulants comme indicateurs d'exposition aux HAP. Nous proposons : 1) d'analyser les modifications des profils d'expression des miARN présents dans les vésicules extracellulaires produites suite à une exposition contrôlée in vitro des cellules humaines mononucléées sanguines aux HAP seuls et en mélanges 'réel' et synthétique, par une approche à haut débit ; 2) d'identifier les cibles et les voies de signalisation régulées par ces miARN ; et 3) de valider in vivo un panel de ces miARN chez des rongeurs exposés à ces mêmes HAP dans les cellules sanguines et dans d'autres fluides biologiques comme l'urine puis, dans des échantillons urinaires d'individus ayant été exposés professionnellement aux HAP en mélange. Au total, nous souhaitons apporter des éléments novateurs sur les mécanismes moléculaires et cellulaires de toxicité des HAP seuls et en mélange et proposer de nouveaux indicateurs précoces d'exposition ou d'effets à ces polluants potentiellement applicables en biosurveillance des populations humaines.

Argumentaire de l'originalité et/ou caractère novateur du projet

L'étude de l'expression des miARN s'est révélée ces dernières années pertinente pour identifier une maladie avec exactitude, sensibilité et spécificité. Ils présentent aujourd'hui un rôle émergent en Toxicologie Environnementale car ils pourraient se révéler de puissants et fiables biomarqueurs pour permettre une évaluation précoce de l'exposition et du risque associé aux polluants environnementaux, notamment du fait

de leur accessibilité et stabilité au sein de vésicules circulantes dans les fluides biologiques. De plus, en inhibant la traduction et dégradant les ARNm, les miARN participent à la régulation épigénétique. S'il est bien établi que certains HAP sont capables de produire des effets génétiques en interagissant avec l'ADN, leur capacité à altérer les mécanismes épigénétiques reste aujourd'hui peu documentée. Enfin, les miARN, facilement mesurables et peu nombreux, bénéficient d'une haute conservation inter-espèces et ne sont pas toujours spécifiques d'une cellule, un panel de miARN pourrait alors constituer une signature caractéristique de l'exposition ou de l'effet aux HAP.

Argumentation du choix des questions

Notre projet combine des expositions in vitro et in vivo aux HAP, seuls et en mélange 'réel' à des doses proches de l'exposition environnementale, à la mesure des profils d'expression des miARN circulants. Il est en lien avec la question 5 de l'axe 'Cancers' et les questions 3 et 5 de l'axe 'Agents chimiques' car il contribuera à caractériser de nouveaux biomarqueurs d'exposition aux HAP, facilement quantifiables et accessibles, et à identifier de nouveaux mécanismes de toxicité de ces polluants.

Description des méthodes mises en œuvre

Notre projet, d'une durée de 36 mois, comprendra 3 principales tâches.

(1) Caractérisation des profils d'expression des miARN circulants (miRNome) après exposition in vitro de cellules mononucléées sanguines (issues de donneurs sains provenant de l'établissement français du sang) aux HAP seuls (benzo(a)pyrène et pyrène) et en mélanges industriels réel (produit dérivant de la houille et utilisés dans les électrodes des fours de métallurgie) et synthétique reconstitué à l'identique (quant au mélange d'HAP particuliers); une approche à haut débit sans a priori sera utilisée pour définir un panel de miARN, signature de chaque condition d'exposition (1 an, P1, P2).

(2) Analyse in silico des gènes cibles et des voies de signalisation régulées pour chaque condition ; les miARN les plus pertinents seront testés en analysant leurs effets sur le phénotype de cellules cibles des HAP (endothéliales, hépatiques, pulmonaires...) à l'aide d'approches utilisant des miR-mimic augmentant l'activité d'un miARN ou des antago-miR bloquant l'activité d'un miARN (1 an, P1).

(3) Validation in vivo des signatures identifiées dans le sang et l'urine de rats exposés par le P2 aux mêmes HAP seuls et en mélanges et étude de faisabilité dans des échantillons urinaires de travailleurs exposés aux mélanges industriels (1 an, P1, P2) ; la comparaison des signatures à la mesure des HAP et de leurs métabolites sanguins et urinaires nous permettra de préciser l'intérêt de quantifier les miARN selon les conditions d'exposition et définir leur place comme biomarqueurs d'exposition aux HAP dans les fluides biologiques facilement accessibles.

4. Membres participants au projet

Equipe 1 : Université de Rennes 1, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, IRSET UMR INSERM 1085 - Rennes

Responsable de l'équipe : Mme Lydie Sparfel

Equipe 2 : Université Grenoble Alpes, Faculté de Médecine EPSP-TIMC - La Tronche

Responsable de l'équipe : Mme Anne Maitre

5. Budget

Subvention accordée (€ TTC) : 200 000 € TTC

Résumé MISSTICK - 2019_1_113

Responsable scientifique : M. Daniel Zalko

Organisme : Inra, UMR 1331 Toxalim - Toulouse

1. Titre

Projet complet

36 mois

Caractérisation du transfert et du métabolisme cutané des principaux bisphénols et autres révélateurs de coloration dans les papiers thermiques utilisés en France

2. Questions à la recherche

ACHIM 4 - Etudes sur les substituants (exposition et impact).

PE 5 - Études sur les niveaux d'exposition et évaluation des risques pour les travailleurs (expositions directes) et pour la population générale (expositions directes et indirectes par exemple via l'alimentation), et en particulier pour les populations vulnérables ou sensibles (enfants, femmes enceintes, personnes atteintes de pathologies...).

CoEm 2 - Problématiques émergentes : risques chimique, physique et biologique induits pour l'homme et l'environnement, caractérisation de l'exposition.

3. Résumé

Objectif détaillé

Le bisphénol A (BPA) est utilisé depuis le début des années 1970 comme révélateur de coloration (RC) dans les papiers d'imprimantes thermiques (PIT). Suite aux études réalisées en 2011 (Zalko et al.; Marquet et al.) et 2012 (Demierre et al.) la pénétration du BPA par voie cutanée chez l'homme a été démontrée. Il a été estimé que cette voie d'exposition était le deuxième contributeur à l'exposition humaine après la voie orale. Les données quantitatives (pénétration cutanée) aussi bien que qualitatives (métabolisation) concernant le BPA ont été l'objet d'une interprétation divergente entre agences (ANSES, 2014-SA-0033). Le remplacement progressif en France des PIT à base de BPA par des papiers portant différents logos («garanti sans BPA», «sans phénol», «sans bisphénols», «0% BPA») ne signifie qu'ils soient exempts de RC. Sur la base des quelques études disponibles, il est vraisemblable que le BPA soit progressivement remplacé par des bisphénols dont l'activité biologique n'est qu'en partie élucidée (BPS, BPF, D8), ou par des molécules distinctes de la famille des bisphénols (Pergafast 201) dont l'innocuité n'est pas clairement établie. Pour la population générale, le contact occasionnel avec les papiers thermiques est fréquent (tickets de caisse). Il l'est encore plus dans le cadre d'une exposition professionnelle (agents de caisse). Cette exposition soulève des problèmes non résolus en termes (1) de caractérisation structurale des révélateurs de coloration présents dans les PIT en France; (2) de quantification de leur pénétration percutanée chez l'homme; (3) de leur biotransformation au niveau cutané : métabolites néoformés et biodisponibilité finale, et (4) d'un criblage des activités biologiques (composés parents et/ou métabolites) permettant d'identifier un potentiel de Perturbation Endocrine des RC en cours d'utilisation.

Argumentaire de l'originalité et/ou caractère novateur du projet

En 2018, nous avons conduit une étude pilote sur n=11 tickets de caisse différents, et mis au point une méthodologie d'extraction/dosage pour les principaux RC. 100% des tickets se sont révélés positifs soit au BPS, soit au Pergafast 201, avec des concentrations allant jusqu'à 100 µg/cm². Le projet MISSTICK a pour objectif d'établir un état des lieux détaillé concernant les RC présents dans les PIT sur le marché national, et de générer les données permettant une évaluation globale de leur pénétration et de leur métabolisation cutanée, ainsi que de leur activité biologique. Cent échantillons seront collectés en provenance de terminaux fixes ou portables, et de sources commerciales (papiers neufs disponibles à la vente). La méthodologie d'extraction/dosage (HPLC/DAD/HRMS) sera optimisée en ciblant les principaux composés susceptibles d'être utilisés (dont BPS, BPF, BPA, Pergafast, D8). La pénétration percutanée des RC sera explorée à l'aide de

modèles de peau humaine (explants cutanés issus de biopsies abdominales, 24h, cellules de diffusion statiques de Franz, conditions de dose finie avec plusieurs concentrations et véhicules de dépôt) conformément aux guidelines OCDE (#428, 2004 modifiée 2011) et EFSA (2017-4873). L'utilisation de modèles de peau viable permettra d'explorer la biotransformation des RC, constituant un apport supplémentaire de l'étude. Les bisphénols seront suivis en prenant appui sur la disponibilité de molécules marquées (14C ou 3H, radio-HPLC). Pour le Pergafast 201, la molécule radio-marquée n'est pas disponible, mais une molécule marquée au deutérium l'est (d4-Pergafast). Les incubations sur explants cutanés seront confortés par l'exploration du métabolisme à l'aide de fractions sub-cellulaires de peau humaine et à l'aide de bactosomes spécifiques d'isoformes humaines de CYP450. Les métabolites principaux seront produits puis testés en complément des molécules parentales (INSERM) sur un panel de récepteurs nucléaires (ER, AR, ERRg, PXR, PPARg, lignées déjà établies).

Argumentation du choix des questions

Le projet cible la problématique des substituants (Achim 4) du BPA dans les papiers thermiques, qui constituent une problématique émergente (CoEm 2) concernant des composés chimiques ayant un potentiel de Perturbateur Endocrinien. Le projet sera centré sur la caractérisation de la biodisponibilité des RC pour l'homme par voie percutanée, en vue d'une meilleure évaluation de l'exposition (PE 5) et au final du risque associé aux RC présents dans les PIT en France.

Description des méthodes mises en œuvre

Le projet MISSTICK, d'une durée de 36 mois, s'articule autour de 6 tâches :

1. Collecte d'un panel de 100 PIT sur le marché Français (M1-12, P1)
2. Développements et validation analytique ; Caractérisation des révélateurs de coloration (RC) présents dans les PIT (HPLC-UV/CAD, R-HPLC, LC-HRMS, M1-12, P1-P3)
3. Caractérisation du passage et du métabolisme cutané sur peau viable humaine (n=8) pour les principaux RC, biodisponibilité, profilage métabolique des milieux récepteurs et des extraits de peau (M6-28, P1-P3)
4. Etudes complémentaires des biotransformations cutanées (modèles sub-cellulaires, bactosomes) pour la production, l'identification et la purification des métabolites (M6-30, P1)
5. Criblage des activités biologiques des molécules parentes et de leurs métabolites (M6-36, P1-P2)
6. Synthèse des données d'exposition et de passage percutané (M24-36, P1-P3)

4. Membres participants au projet

Equipe 1 : Inra, UMR 1331 Toxalim - Toulouse

Responsable de l'équipe : M. Daniel Zalko

Equipe 2 : Inserm, IRCM-INSERM U1194-ICM - Montpellier

Responsable de l'équipe : M. Patrick Balaguer

Equipe 3 : Inra, UMR 1331 Toxalim - INRA-INP - Toulouse

Responsable de l'équipe : M. Laurent Debrauwer

5. Budget

Subvention accordée (€ TTC) : 194 509 € TTC

Résumé Molrisk - 2019_1_059

Responsable scientifique : M. Jerome Boissier

Organisme : Université de Perpignan, UMR 5244 - Perpignan

1. Titre

Projet complet

36 mois

Un nouvel outil pour inférer le risque de transmission des maladies infectieuses transmises par les mollusques en Europe

2. Questions à la recherche

ABIO 1 - Exposition de la population générale et/ou des travailleurs aux bioaérosols et à différents agents biologiques (micro-organismes, toxines, virus et bactéries pathogènes). Comportement des agents pathogènes dans divers compartiments de l'environnement, notamment dans les milieux aquatiques et effets potentiels sur la santé humaine.

LAVE 1 - Vecteurs et santé humaine, animale ou végétale : biologie, écologie, distribution des vecteurs, relation hôte-pathogène, surveillance des vecteurs, détection (relations agent pathogène - pathogénicité ; vecteur sentinelle...), exposition différenciée, résistance.

3. Résumé

Objectif détaillé

Global changes promote outbreaks and the spread of exotic pathogens worldwide. In particular tropical diseases transmitted by arthropod vectors such as dengue and chikungunya recently emerged in Europe and constitute new public threats. So far, the risks of emerging snail-borne diseases in Europe have been largely overlooked. Yet, during the summer 2013, 106 human urogenital schistosomiasis cases have been contracted in the Cavu River in Corsica. Urogenital schistosomiasis is transmitted through freshwater snails and is endemic from Africa. The geographical expansion of this parasite from the tropics to the Mediterranean region hence constitutes a real threat for Southern Europe. The European Centre for Disease prevention and Control stated: "there is a need to consider enhancing epidemiological surveillance for schistosomiasis in the EU." Following the first emergence in 2013, a recrudescence of locally acquired schistosomiasis in Corsica occurred in summer 2015. In September 2017, new cases have been identified with infections having occurred in summer 2016 thus indicating that the transmission is still persisting. Despite a huge effort to detect infected molluscs in the Cavu river during the last three summers (3,453; 5,634 and 5000 molluscs were tested by PCR), no parasite has been evidenced, showing that the tool to identify active transmission sites is far from being optimal.

Like schistosomiasis other snail-transmitted diseases of livestock or human health importance are already propagating in Europe. For instance, a noticeable rise of opisthorchiasis or fasciolosis has been observed in European countries. Control strategies based on snail location/elimination are relevant methods in an integrated control approach. However, the tools and resources for an adequate risk assessment are currently lacking. Standard method for freshwater snail detection is archaic (scooping the water bodies), time consuming and requires considerable malacological skills. Moreover, freshwater snail populations are highly dynamic in space and time. Thus, determining the distribution and monitoring the spatio-temporal dynamics of snail vectors at the European scale using traditional methods is hopeless. Moreover, once the (potentially) receptive transmission sites would be identified, yet another problem would need to be solved: there are no adequate tools for the detection of ongoing parasitic transmission (e.g. the current situation in Corsica). Current methods to detect infection in humans or in animals are expensive, invasive, and lack sensitivity. It is thus urgent to develop a preventive and cost-effective method that allows monitoring both vector snails and parasites at large spatial and temporal scales. The development of such method will help keeping one step ahead the potential spread of emerging snail-borne diseases in Europe.

Argumentaire de l'originalité et/ou caractère novateur du projet

Environmental DNA (eDNA) is widely used in aquatic ecology for the detection of targeted species, and to assess ecosystem biodiversity. Such methods are also promising for the detection of both parasites and vectors. These assays are based on the detection of free or particle-attached vector/parasite DNA present in the environment (e.g. water, sediment), and hence enabling the most direct measure of infection risk/transmission.

Argumentation du choix des questions

Vecteurs, changement climatique et santé

The anti-vectorial fight starts by documenting and mapping the distribution of the vectors. The present project will offer efficient tools to map infectious disease snail vectors (usually referred as intermediate host); Freshwater snails (and the diseases they transmit) are expected to spread northward across Europe due to ongoing climate changes. In this project we will develop an effective tool to detect and map in a real-time fashion the risks of snail-borne diseases emergence and their potential spread.

Agents biologiques

The present project will infer the potential risk of human/animal exposition to snail born infectious disease (related to freshwater environments).

Description des méthodes mises en œuvre

This 3 years project is structured along two main axes. [Targeted approach] First, in relation to recent schistosomiasis outbreak in Corsica, we will develop an eDNA protocol to detect *Schistosoma* sp. in water samples, using a targeted approach by quantitative real-time PCR or digital PCR with specific primers. Importantly, since the last call we have successfully develop a targeted approach on the *Bulinus* snail vector in Corsica. [Global Approach] Second, we will develop a new tool based on eDNA analyzing using metabarcoding from water samples to characterize the current geographical distribution of all snails species known to be involved in snail-born disease infections in Europe. This non-invasive technique is based on the amplification and high-throughput sequencing of a molecular marker using primers targeting a peculiar taxonomic group. Metabarcoding approach will allow to (i) describe the whole snail diversity (ii) monitor species distribution in space and time and identify potential species associations (iii) reduce survey costs and reduce operator-dependent biases in malacological sampling and analyses. For both parasite and host detection, we will set-up the protocols in controlled lab mesocosms (1 years) followed by a validation step in natura (1.5 years). Future developments using metabarcoding will include the detection of the whole trematode diversity and would be applicable for the detection of other parasitic diseases of medical or veterinary interest.

4. Membres participants au projet

Equipe 1 : Université de Perpignan, UMR 5244 - Perpignan

Responsable de l'équipe : M. Jerome Boissier

Equipe 2 : Centre d'écologie fonctionnelle et évolutive, LabEx CeMEB - Montpellier

Responsable de l'équipe : M. Philippe Jarne

Equipe 3 : Institut de recherche de la Tour du Valat, Département Conservation des Espèces - Arles

Responsable de l'équipe : Mme Marion Vittecoq

5. Budget

Subvention accordée (€ TTC) : 83 513 € TTC

Résumé NanOCo - 2019_1_184

Responsable scientifique : M. Aurélien Deniaud

Organisme : CEA - Grenoble

1. Titre

Etude de faisabilité

18 mois

Impact sur les fonctions endocrines de NANoparticules métalliques seules et en mélange avec des composés Organiques perturbateurs endocriniens pour l'analyse de l'effet COcktail

2. Questions à la recherche

NANO 4 - Ecotoxicologie et toxicologie des nanomatériaux. Recherches méthodologiques, méthodes de référence, matériaux de référence. Comparaison d'études.

ACHIM 1 - Exposition aux contaminants et effets sur les écosystèmes et la santé humaine : milieux aquatiques, approche par compartiment (sol, air, eau...) et effets des mélanges.

PE 3 - Étude des effets à faibles doses et/ou des effets cocktails.

3. Résumé

Objectif détaillé

Nanomaterials are increasingly used for their valuable physico-chemical properties. However, this widespread use leads to environmental and safety concerns. Two different categories of metal nanoparticles (NP) can be described (see our recent review Chevallet M. BBA 2016), i) persistent NPs such as TiO₂NPs (more than 10,000 tons/year) and ii) NPs that dissolve into ions in aqueous aerobic conditions including silver NPs (AgNPs – 500 tons/year). The former mainly trigger particle-induced toxicity leading to inflammation mechanisms for instance, while AgNP toxicity is primarily due to released Ag(I) species. AgNPs are used as biocides in various products including textiles, food packaging or medical devices, a property that requires Ag(I) release. Due to their reactivity, AgNPs are thus dispersed in various forms in the environment and their impact on human health and the environment is poorly understood. In mammals, AgNPs can go through biological barriers and accumulates mainly in the liver. We have previously shown that following endocytosis, AgNPs dissolve into toxic Ag(I) ions that distributes throughout hepatocytes (Veronesi G. Nanoscale 2016). Interestingly, we revealed the presence of Ag(I) in the nucleus, where it disrupts the activity of two nuclear receptors (FXR, LXR). This family of transcription factors is crucial for development and is known to be the target of endocrine disruptors (EDs) that could activate or inhibit their activity. Our results therefore suggest a direct endocrine mode of action of AgNPs. Other publications highlight that the coexistence of organic toxicant and NPs in the environment, and in the human exposome, influence the pollutants bioavailability and toxicity. Several studies have for instance shown NPs to act as carrier to enhance EDs bioavailability, others indicate a direct endocrine activity in vivo for different types of NPs (Naasz S. STE 2018).

Our preliminary study, and the data available in the literature, highlight the need to characterize the endocrine activity of NPs alone or mixed with EDs. Our objective in the present project is to assess the endocrine potential of two types of metal NPs, alone or in mixture with reference organic EDs in models that are relevant both for a toxicological and for an ecotoxicological point of view.

Argumentaire de l'originalité et/ou caractère novateur du projet

The two points planned to be investigated are both original and novel in toxicology and ecotoxicology. The endocrine potential of two types of widely used metal NPs will be assessed on amphibian and fish models using assays validated by national (AFNOR) and international standards (OECD, under validation). However, the main originality of the project concerns the analysis of the in vivo effects of relevant mixtures of these

metal NPs with known EDs in order to assess a possible synergistic or antagonistic effect. The same hypothesis will be assessed on a human hepatic cell line to increase the relevance of the study and using spheroid culture of hepatocytes that are physiologically more relevant.

Argumentation du choix des questions

This project belongs both to the study of nanomaterials toxicity and ecotoxicity and to the analysis of their co-exposure with known endocrine disruptors in order to better understand the effect of this cocktail on human health and in specific ecosystems particularly exposed to pollutants. Since this project is ambitious it is proposed as a feasibility study and it will enable to tackle important questions for this Anses call, particularly ED3 and NANO4. These questions could be further studied in a complete follow-up project if this one is successful. Besides, the relevance and the complementary of the approaches chosen, whole organisms and cellular assays will be a clear asset.

Description des méthodes mises en œuvre

The impact of the organic compounds on NP stability and dispersion in the conditions of the biological assays will be tested (month 0-3).

TiO₂NPs and AgNPs will be assessed using amphibian and fish larvae for disruption of thyroid, estrogen and androgen pathways by testing a range from sub-lethal to environmental concentrations (month 0-12). Binary mixtures composed of a single selected concentration of NPs and reference EDs will then be assessed using the same assays (month 9-18). Different endocrine substances such as plasticizer, synthetic hormone, cosmetics substances, pesticides and drugs will be selected based on the possible co-exposure of humans or environment to the EDs and the NPs.

The human hepatic cell line HepG2/C3A will be used to analyze the impact of the same NPs and mixtures on relevant endocrine pathways by quantifying specific mRNAs, similarly to our recent study on LXR and FXR nuclear receptors. These experiments will be performed both on standard 2D cell culture set-up as well as on spheroids that better mimic liver architecture and physiology (month 9-18).

4. Membres participants au projet

Equipe 1 : CEA - Grenoble

Responsable de l'équipe : M. Aurélien Deniaud

Equipe 2 : Watchfrog - Evry

Responsable de l'équipe : M. David Du Pasquier

5. Budget

Subvention accordée (€ TTC) : 49 820 € TTC

Résumé NANOWAVE - 2019_2 RF_025

Responsable scientifique : Mme Katia Grenier

Organisme : CNRS, LAAS UPR 8001 - Toulouse

1. Titre

Projet complet

36 mois

Evaluation de la co-exposition de nanomatériaux avec des ondes radiofréquences

2. Questions à la recherche

RFES 2.3 - Étude des effets des co-expositions aux RF se rapprochant des situations réelles d'exposition et permettant d'analyser l'effet combiné des RF et d'autres facteurs environnementaux (physiques ou chimiques) sur l'organisme.

3. Résumé

Objectif détaillé

Ce projet interdisciplinaire s'inscrit dans la problématique de l'étude in vitro des réponses cellulaires à l'exposition aux radiofréquences (RF). L'objectif est d'évaluer un effet synergique des nanomatériaux associés à des ondes radiofréquences, plus précisément à des gammes de fréquences et puissances comparables aux expositions rencontrées au niveau grand public ou en milieu professionnel plus fortement impacté. Pour cela, le projet s'appuie sur une double métrologie et protocole associé, qui combine un système d'exposition RF calibré fonctionnant avec des plaques à puits standards et une analyse de toxicité réalisée à l'aide d'une nouvelle méthode par fluorescence (test LUCS) capable de mesurer des changements d'homéostasie cellulaire.

Le projet a pour but d'évaluer les effets synergiques potentiels des ondes RF en présence de nanomatériaux de référence, qui se traduirait par des IC50 et des seuils d'effets indésirables (NOAEL) des nanomatériaux plus faibles.

Argumentaire de l'originalité et/ou caractère novateur du projet

L'originalité de l'approche repose sur une double métrologie novatrice associant exposition RF et analyse de toxicité cellulaire par technique LUCS, compatible avec une future standardisation, et de son exploitation pour évaluer un effet synergique de nanomatériaux avec des ondes RF.

Par ailleurs, l'état de l'art sur la toxicité associée aux nanomatériaux (NM) montre que le sujet de la spécificité de l'effet toxique des matériaux à l'échelle nano (1-100 nm), comparativement aux effets observés à l'échelle micro, reste largement débattu, et ce, malgré les nombreux arguments concernant les particularités des NM tels que leur rapport taille/surface, les charges de surface (potentiel zéta), leur morphologie, ou l'augmentation du potentiel redox.

Or, un effet synergique entre les ondes RF à forte puissance et des NM, notamment les particules d'or, des CNT ou les quantum dots a été clairement démontré et a trouvé des applications en clinique pour déclencher la mort thermiquement induite de cellules cancéreuses ciblées.

Un objectif du projet consiste à élargir ces observations aux ondes RF de plus faibles puissances et aux NM reconnus d'intérêt public, dans un contexte environnemental plus large.

Argumentation du choix des questions

Bien que l'impact des ondes RF à faible puissance sur le vivant ne soit pas encore clairement élucidé, l'étude de possibles effets synergiques avec d'autres stress environnementaux fait défaut dans la littérature. Or du fait de la forte interaction des ondes électromagnétiques avec des nanomatériaux, on peut s'attendre à ce que les seuils d'impact nocif des nanomatériaux soient abaissés en présence d'ondes RF (suivant la fréquence, la modulation, ...).

Afin d'évaluer de tels effets synergiques, des études in vitro de toxicité RF et de nanoparticules sont envisagées à l'aide de la technologie Light-Up Cell System (LUCS) qui permet de mesurer l'état homéostatique des cellules vivantes.

Description des méthodes mises en œuvre

- Description des méthodes mises en œuvre - éléments de calendrier (2689)

Le projet s'appuiera sur l'expertise en nano-toxicologie du CIRIMAT, la mise à disposition de nanomatériaux pertinents sur le plan de la santé publique, d'une part issus du CIRIMAT mais surtout standardisés par le JRC Nanomaterials Repository de la Commission Européenne et présents en bonne place dans le registre national R-Nano.

La plateforme d'applicateurs RF déjà développée est constituée d'un réseau d'éléments rayonnants qui permettent d'éclairer simultanément et de manière calibrée plusieurs puits d'une même plaque de culture standard. Ce système (brevet déposé) est placé en incubateur pour des expositions de longue durée (de quelques heures à quelques jours) et alimenté par un générateur délivrant des niveaux de puissance (rampe) ou de modulation (CW, pulsé ou autre).

La technologie de fluorescence LUCS est un test sur cellules vivantes qui mesure l'état d'homéostasie ou d'altération (toxicité) du modèle étudié. La technologie n'est pas limitée en termes de modèles cellulaires et a été optimisée pour le haut débit sur plaques 96 et 384 puits. Le test LUCS a déjà été utilisé sur des programmes ANR (MONOIL, RIMNES), DGA RAPID et ANSES (PNA) et dans le cadre d'une étude de toxicité de nanomatériaux. Les tests seront menés sur une lignée cellulaire classique (SHS-Y5Y) ainsi que sur des cellules souches humaines pluripotentes induites (hiPSC) reprogrammées puis différenciées en phénotype neuronal et dermique.

Composition du projet:

WP1. Mise en place des cultures de cellules souches reprogrammées et cadrage du processus de différenciation - M0-M9

WP2. Caractérisation et mise en suspensions des nanomatériaux M0 – M12

WP3. Toxicité des ondes RF seules – M0-M24. Ce WP bénéficiera de la puissance statistique conséquence de la parallélisation de la double métrologie mise en œuvre. Le calibrage de la plateforme RF en terme de Débit d'Absorption Spécifique sera vérifié.

WP4. Toxicité de nanomatériaux ; détermination des IC50 et NOAEL pour chaque nanomatériau sur les différents modèles cellulaires – La présence intracellulaire des nanomatériaux sera également évaluée - M10-M24. Ce WP sera mené en parallèle du WP3 et servira de base pour le WP5 en fournissant les NOAEL pour chaque type de nanomatériaux.

WP5. Evaluation d'effet synergique : application des RF sur les NOAEL déterminées en WP3; M24-M36. Les méthodologies des WP3 et 4 seront reprises afin de qualifier et quantifier les effets synergiques nanomatériaux + RF en fonction des DAS appliqués.

4. Membres participants au projet

Equipe 1 : CNRS, LAAS UPR 8001 - Toulouse

Responsable de l'équipe : Mme Katia Grenier

Equipe 2 : AOP, LAAS CNRS - Toulouse

Responsable de l'équipe : M. Christophe Furger

Equipe 3 : Université Paul Sabatier, CIRIMAT/LCMIE - Toulouse

Responsable de l'équipe : M. Emmanuel Flahaut

5. Budget

Subvention accordée (€ TTC) : 397 586 € TTC

Résumé NaPeauLi - 2019_1_087

Responsable scientifique : Mme Céline Bouvier-Capely

Organisme : IRSN, Laboratoire LRSI, Direction PSE-SANTE, Service SESANE - Fontenay-aux-Roses

1. Titre

Etude de faisabilité

24 mois

Développement d'un modèle expérimental pour l'étude de la décontamination de la peau après une exposition cutanée aux nanoparticules métalliques

2. Questions à la recherche

NANO 3 - Evaluation de l'exposition humaine (y compris par voie orale) aux nanomatériaux manufacturés (mesures, modélisation) tout au long du cycle de vie.

NANO 4 - Ecotoxicologie et toxicologie des nanomatériaux. Recherches méthodologiques, méthodes de référence, matériaux de référence. Comparaison d'études.

3. Résumé

Objectif détaillé

L'essor des nanotechnologies entraîne un nombre croissant de travailleurs exposés. En milieu professionnel, l'exposition par voie cutanée aux nanoparticules (NP) ne peut pas être négligée. En effet, selon les caractéristiques physico-chimiques des NP et l'état de la peau, la contamination de la peau peut entraîner une pénétration cutanée des NP ou des ions libérés pour certaines NP métalliques. C'est pourquoi, il est nécessaire de disposer de moyens efficaces de lavage de la peau. Très peu de données sont actuellement disponibles sur les moyens de décontamination de la peau contaminée par des NP. Afin de traiter cette question, l'objectif de cette étude de faisabilité est de développer un modèle expérimental adapté pour l'étude de la décontamination de la peau à des NP de type métallique. En effet, ces NP sont rapportées comme présentant actuellement le plus fort potentiel d'exposition par voie cutanée. Dans ce projet, les NP d'Ag et de TiO₂ seront étudiées en tant que NP majoritairement produites et utilisées. La grande différence de solubilité de ces deux NP permettra aussi d'étudier l'influence de ce paramètre sur le modèle proposé. A termes, le modèle permettra de tester différentes formules de nettoyage de la peau et d'évaluer leur efficacité suite à une contamination cutanée à différents types de NP.

Argumentaire de l'originalité et/ou caractère novateur du projet

La prévention de l'exposition cutanée aux NP en situation professionnelle est moins documentée que l'exposition par inhalation, même si cette voie d'exposition peut être préoccupante. Cette problématique touche aussi bien les métiers liés à la production de NP manufacturés ou à leur utilisation que les secteurs d'activité où ces NP sont des sous-produits de divers procédés industriels. Ainsi, dans l'industrie nucléaire, l'exposition aux nanoparticules peut intervenir à différents stades du cycle du combustible nucléaire jusqu'au démantèlement des installations. Ce projet permet de répondre à des questions pratiques que se posent les médecins du travail.

Argumentation du choix des questions

Le projet s'inscrit dans les questions 3 et 4 de l'axe Nanomatériaux. Il permettra de fournir des informations concrètes pour faciliter/préciser le suivi des expositions professionnelles et la prévention des risques professionnels (cf. page 11 de l'AAP) pour le cas des NP, et sera également intéressant pour la population générale qui est elle aussi exposée aux NP par voie cutanée (cosmétiques, textiles). Concernant la toxicologie des NP, le projet permettra d'acquérir des données complémentaires sur la pénétration cutanée, avec une spéciation précise des NP et des ions, notamment pour l'Ag.

Description des méthodes mises en œuvre

- **Modèle et méthodes** : le modèle est basé sur l'utilisation de cellules de Franz. Elles sont constituées d'un compartiment donneur et d'un compartiment receveur séparés par un explant de peau d'oreille de cochon, modèle animal proche de la peau humaine. Les NP seront appliquées sur la peau côté couche cornée. La formule de lavage pourra être appliquée rapidement après la contamination (30 min) jusqu'à des temps tardifs (8 heures) pour mimer aussi bien un traitement précoce suite à un incident qu'une douche en fin de poste de travail potentiellement exposant. L'efficacité du lavage sera évaluée en suivant la cinétique de diffusion transcutanée jusqu'à 24 h post-exposition en quantifiant par Single Particle – ICPMS de façon distincte les NP et les ions associés, à intervalles définis, dans le compartiment receveur, et grâce à un bilan matière par ICPMS effectué en dosant le milieu donneur et l'explant de peau. En complément, la localisation de la contamination par les NP en surface de la peau et en coupe pourra être réalisée par ablation laser/ICPMS ou SIMS pour évaluer la pénétration cutanée des NP.

- **Description des NP** : des suspensions commerciales aqueuses de NP d'Ag et de TiO₂ parfaitement caractérisées seront utilisées à ce stade, avec une taille nominale inférieure à 100 nm et une concentration déterminée lors de la mise en place du modèle.

- **Formules de lavages** : des nettoyages classiques (eau/savon répandu type Marseille) seront comparées à un lavage reconnu pour préserver l'intégrité de la peau. En effet, si les données existantes montrent que la pénétration des NP elles-mêmes est faible sur peau saine, il s'agira de déterminer si une action lavante classique peut entraîner une augmentation de la pénétration cutanée pour les deux NP. Au stade de la faisabilité, la détermination d'une nouvelle formulation de lavage spécifique aux NP ne sera pas réalisée mais pourra constituer une suite du projet.

- **Calendrier** : 1ère année : mise en place du modèle (doses d'exposition, temps de cinétique, formules de lavage...), 2ème année : utilisation du modèle et acquisition des données pour les deux NP.

4. Membres participants au projet

Equipe 1 : IRSN, Laboratoire LRSI, Direction PSE-SANTE, Service SESANE - Fontenay-aux-Roses

Responsable de l'équipe : Mme Céline Bouvier-Capely

Equipe 2 : CEA, Laboratoire de biologie médicale - Grenoble

Responsable de l'équipe : Mme Véronique Chamel

5. Budget

Subvention accordée (€ TTC) : 49 977 € TTC

Résumé NIGHTLIGHTSIGHT - 2019_1_054

Responsable scientifique : M. David Hicks

Organisme : Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, CNRS UPR 3212 - Strasbourg

1. Titre

Projet complet

24 mois

LUMIERE DE NUIT ET SANTE VISUELLE: APPROCHES EXPERIMENTALES

2. Questions à la recherche

LUMI 1 - Caractérisation des expositions et des impacts de la pollution lumineuse pour la population générale et pour l'environnement.

PE 2 - Étude des modes d'action en vue d'identifier une éventuelle perturbation endocrinienne en rapport avec le développement de certaines pathologies, y compris sous l'angle des effets trans/intergénérationnels.

3. Résumé

Objectif détaillé

Explorer et caractériser les effets sur la santé rétinienne de l'exposition à la lumière artificielle pendant la nuit ("LAN"), en utilisant le rongeur diurne *Arvicanthis* comme modèle animal pertinent de la rétine humaine. Nous étudierons les effets sur la structure et la fonction rétinienne de l'exposition chronique aux LEDs dont les émissions spectrales sont enrichies en lumière bleue (<500 nm), ainsi qu'aux LEDs dont ces émissions sont filtrées. Nous analyserons en parallèle les effets perturbateurs de ces expositions sur l'horloge circadienne, impliquée dans les effets nocifs de la LAN sur la santé générale.

Argumentaire de l'originalité et/ou caractère novateur du projet

Aspects particulièrement originaux: 1. L'utilisation du rongeur diurne, *Arvicanthis ansorgei*, dont l'organisation temporelle de l'horloge et sa physiologie visuelle similaire à l'homme constituent des atouts pour modéliser les effets potentiellement néfastes de la pollution lumineuse. 2. Exploration des effets de la LAN sur la santé visuelle, domaine très négligé de la pollution lumineuse. 3. L'utilisation des sources lumineuses « LED » – technologie bientôt universellement installée – couplée aux filtres sélectifs, permettra d'examiner précisément le rôle du spectre (surtout la lumière de courte longueur d'onde) dans ces perturbations.

Argumentation du choix des questions

LUMI: L'impact de la LAN sur la vision est très mal connu. La vulnérabilité au stress photique est accrue la nuit chez les souris et rats (Organisciak et Vaughan, 2010), et des processus oculaires sous contrôle circadien sont déréglés par la LAN (Bobu et Hicks, 2009, 2013). Mais les conséquences sur la santé visuelle des expositions répétées et chroniques, telles que rencontrées aussi bien à l'intérieur (éclairage domestique, travail posté) que l'extérieur (éclairage des routes, des villes), ne sont pas connues. De plus est les sources lumineuses seront bientôt exclusivement de type « LED », potentiellement plus injurieuses en raison du fort composé « bleu » (émissions de courte longueur). Ce projet va explorer cette question, et les effets de bloquer les émissions <500 nm.

PE2: La LAN a été caractérisé comme un perturbateur endocrinien en raison de son action suppressive sur la sécrétion nocturne de la mélatonine, pensée d'être à la base des effets négatifs sur la santé (Bedrosian et al., 2016). La rétine est la deuxième source de synthèse de la mélatonine après la glande pinéale, où elle sous contrôle circadien (Gianesini et al., 2015) et est censée jouer un rôle neuroprotecteur (Baba et al., 2009). Rien n'est connu concernant l'exposition à la LAN, son effet sur le profil de la mélatonine rétinienne et la santé visuelle.

Description des méthodes mises en œuvre

Modèle animal: Nous allons utiliser *Arvicanthis ansorgei*, rongeur diurne dont la rétine se rapproche plus à celle de l'homme, et dont notre institut héberge la seule colonie viable au monde. Les animaux seront maintenus en cycle standard 12h lumière blanche froide (4000K) 500 lux/12h d'obscurité, avant de les passer aux protocoles expérimentaux : 1. Groupe contrôle (n=40) maintenu en cycle L/D standard ; 2. Groupe test 1 (n=40) exposé à la lumière de 500 lux pendant la première moitié de la nuit (6h), et maintenus en lumière 500 lux pendant la journée, pour un total de 12 mois ; 3. Groupe test 2 (n=40) exposé à la lumière de 500 lux pendant 6h durant la nuit, mais dont les émissions spectrales <500 nm seront filtrées, et maintenus en lumière 500 lux pendant la journée, pour un total de 12 mois. Les animaux seront examinés au début et ensuite tous les 3 mois : des mesures non-invasives, d'une part la sensibilité rétinienne et le fonctionnement des photorécepteurs par électrorétinographie (ERG), et d'autre part l'intégralité tissulaire (densité des couches cellulaires, aspect du lit vasculaire, cumul de lipofuscin...) par « ocular coherence tomography » et « scanning laser ophthalmoscopy », montreront l'état de santé rétinien. Ces analyses seront complétées sur des tissus post-mortem (n=8 pour chaque groupe, prélevés à 3, 6, 9 et 12 mois), par des approches cellulaires (structure rétinienne par morphométrie et immunochimie), et moléculaires (expression quotidienne des gènes d'horloge et des « sorties » (outputs) visuelles par qPCR sur les structures oculaires et neurales. Les voies cellulaires affectées par la désynchronisation circadienne (stress oxydatif, SIRT1, mTOR, marqueurs épigénétiques) seront analysées dans les tissus cibles.

4. Membres participants au projet

Equipe 1 : Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, CNRS UPR 3212 - Strasbourg

Responsable de l'équipe : M. David Hicks

Equipe 2 : Inra, UMR CSGA, Equipe Œil et Nutrition - Dijon

Responsable de l'équipe : M. Niyazi Acar

5. Budget

Subvention accordée (€ TTC) : 138 919 € TTC

Résumé NormThyr3D - 2019_1_111

Responsable scientifique : Mme Catherine Ory

Organisme : CEA, Laboratoire de Cancérogénèse Expérimentale, DSV/SREIT/iRCM - Fontenay-aux-Roses

1. Titre

Etude de faisabilité

24 mois

Modèles in vitro 3D humains pour l'évaluation des risques de carcinogénèse thyroïdienne après exposition à des facteurs environnementaux

2. Questions à la recherche

CANC 2 - Identification de facteurs de risques environnementaux ou professionnels des cancers.

CANC 5 - Identification et/ou validation de biomarqueurs pour évaluer les risques dans des situations d'exposition environnementales ou professionnelles.

3. Résumé

Objectif détaillé

The aim of this project is to develop in vitro 3D models relevant to human normal thyrocyte/thyroid tissue physiology to analyze the response to carcinogenic stresses as function of dose and mode of exposure (acute, chronic, cocktail exposure). Indeed, over the last decades, the trends of thyroid cancers have been increasing worldwide, mostly explained by the over-diagnosis of small size cancers. However, epidemiology studies reported a recent increase of papillary thyroid cancers (PTC) of all sizes, suggesting that systematic scrutiny could not be the only explanation and opening the hypothesis of an impact of environmental factors on thyroid carcinogenesis. Currently, exposition to ionizing radiation (IR) at doses above 50mGy during childhood is the only etiology factor associated with an excess of PTC. For lower doses, the risk of thyroid cancers is not known because of the statistic limits of conventional epidemiology. Yet, Chernobyl fall out in western Europe caused a societal debate on the risk of low doses (LD) of IR for the development of these cancers. The impact of environmental exposure on thyroid pathologies and cancers is now enlarged to various pollutants suspected to act as endocrine disruptors (ED) on the function of the hypothalamic–pituitary–thyroid axis. Estimation of the risk associated with ED exposure is even more difficult to assess as people are usually exposed to a cocktail of EDC.

As thyroid physiology displays high species specificities, this project will empty the lack of human models to analyze the short/mid-term response of normal human thyroid tissue to known and suspected carcinogenic stress. Such models are crucial to assess 1) the toxicity of EDC and to rank them as etiologic factors to be taken in account in epidemiology studies, 2) the effect of low dose of IR and 3) if EDC could modify the radiosensitivity of the thyroid tissue at doses used for medical diagnosis or in a context of environmental exposure.

Argumentaire de l'originalité et/ou caractère novateur du projet

We propose to developed two complementary in vitro 3D models of human normal thyroid tissue: thyrospheres (thyroid follicle-like organoids developed from isolated thyrocytes), and organotypic culture (3-4mm³ cubes of normal thyroid tissue), both cultivated and maintained in matrigel. Such models were not yet described using human thyroid tissue. Mouse or porcine normal tissue models were already described but unfortunately, they are not relevant of human tissue physiology and thus not adapted for studying human thyroid carcinogenesis. Specifically, either sporadic (S) or IR induced thyroid carcinogenesis lead to 80% of PTC in human, while mice exposed to I131 developed mainly hyperplasias and a low incidence of follicular thyroid carcinomas.

3D models of human normal thyroid tissue will permit to analyse the response of thyrocytes alone (thyrosphère) or thyroid tissue in its cellular complexity (organotypic culture) for analyzing the risk of cancers after exposure to different stress.

Argumentation du choix des questions

We aim to obtain models that should mimic as best the cellular and molecular behavior of normal thyroid tissue and consequently they should display an accurate response to carcinogenic stresses as compared to the thyroid tissue response in vivo. We expect to maintain the 3D cultures at least over a period of 2 months for organotypic cultures and 6 months for thyrospheres, as described in the literature for porcine and mice models, respectively, to identify pathways and biomarkers associated with the sequential first steps of stress-induced carcinogenic process in the human thyroid.

These models will be useful tools to decipher the effect of EDC exposure that are suspected but not yet demonstrated to be implicated in the development of thyroid pathologies and cancers. These models will be also used to compare the risk of low dose of IR (<50 mGy) like those encountered in the environment or during medical imaging explorations, to that of higher doses known to induce thyroid cancers. They will also allow challenging if EDC could modify the thyroid tissue sensitivity to IR and eventually could increase the risk to develop thyroid cancers after IR exposure at low doses.

Description des méthodes mises en œuvre

Biopsies of human normal tissue will be collected from patients who will have a lobectomy for a thyroid cancer in the contralateral lobe.

The balance between the maintenance of the thyrocytes differentiation and the proliferative capacities depend on a network of growth factors. We will first test several culture conditions to optimise the maintenance of the cellular differentiation status of the thyrocytes in both models, and the organisation of the thyrospheres in follicle-like structures.

Maintenance of the tissue will be verified by the pathologists after histological staining of FFPE slides. We will validate our models as relevant of normal tissue in vivo following 1) the expression and/or cellular localization of well-known differentiation markers associated with the function of the thyrocytes in vivo by immunocyto/histo chemistry and 2) the physiological parameters such as iodide uptake, TG iodination, T3/T4 release. The ability of our models to display a stress response close to which of the normal tissue in vivo will be estimated after IR exposure at a dose range from 0.1 to several Grays and analysis of the sensitivity of the models in terms of proliferation, apoptosis, DNA repair and genetic stability.

4. Membres participants au projet

Equipe 1 : CEA, Laboratoire de Cancérogenèse Expérimentale, DSV/SREIT/iRCM - Fontenay-aux-Roses

Responsable de l'équipe : Mme Catherine Ory

5. Budget

Subvention accordée (€ TTC) : 49 972 € TTC

Résumé PE-Lipidom - 2019_1_157

Responsable scientifique : Mme Anne-Laure Schang

Organisme : Université Paris 5, Faculté de Pharmacie de Paris, UMR 8038 - C-TAC - Paris

1. Titre

Etude de faisabilité

24 mois

Neurotoxicité des Perturbateurs Endocriniens : Evaluation de l'impact du bisphénol A sur la myélinisation par une approche lipidomique globale

2. Questions à la recherche

PE 1 - Développement et test de méthodes permettant d'investiguer des mécanismes d'action, en vue de caractériser des modes d'action « perturbateurs endocriniens ».

PE 2 - Étude des modes d'action en vue d'identifier une éventuelle perturbation endocrinienne en rapport avec le développement de certaines pathologies, y compris sous l'angle des effets trans/intergénérationnels.

3. Résumé

Objectif détaillé

Les troubles neuro-développementaux (TND), incluant des déficits cognitifs, d'apprentissage, de l'attention ou encore les troubles du spectre autistique, touchent plus de 10 % des enfants dans le monde et constituent un problème de santé publique majeur (Grandjean et Landrigan Lancet Neurol. 2014 13:330-8). Les polluants environnementaux sont aujourd'hui mis en cause dans l'augmentation de l'incidence des TND. Au cours du développement, le cerveau est notamment exposé à de nombreux perturbateurs endocriniens (PE), et cette exposition est associée à un risque accru de TND (Braun JM. Nat Rev Endocrinol. 2017 13:161-73). Parmi les PE incriminés, le bisphénol A (BPA), aujourd'hui interdit dans les contenants alimentaires, est cependant systématiquement retrouvé dans les matrices biologiques humaines. Si le lien causal entre exposition précoce au BPA et augmentation du risque de TND fait peu de doute, les mécanismes de toxicité en jeu restent mal compris.

Notre objectif est de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la toxicité des PE au niveau du cerveau immature. Au cours du développement cérébral, les oligodendrocytes immatures prolifèrent, migrent, se différencient et myélinisent les axones par enroulement successif de membranes de myéline fortement enrichies en lipides (70%). La myélinisation conditionne la transmission efficace des messages nerveux. Or, certains PE pourraient perturber la myélinisation et conduire à l'apparition de TND. Ainsi, l'exposition précoce au BPA altère le nombre d'oligodendrocytes et la myélinisation dans l'hippocampe de rat (Nesan et al., Horm Behav. 2018 101:50-58) et cette altération pourrait être le fait d'une toxicité directe de ce PE sur les oligodendrocytes (Tiwari et al., Mol Neurobiol. 2014 51:1381-416). Les lipides étant un constituant fondamental de la myéline, notre objectif est d'évaluer, du point de vue des modifications du lipidome, la toxicité qu'induit le BPA au niveau du cerveau immature et au cours de la différenciation de l'oligodendrocyte en culture.

Argumentaire de l'originalité et/ou caractère novateur du projet

A ce jour, les mécanismes cellulaires de neurotoxicité des PE ont presque exclusivement été étudiés dans les neurones. A l'inverse, il existe très peu de données concernant l'effet des PE sur les oligodendrocytes et la myélinisation. En s'intéressant à ces aspects, ce projet contribuera à combler cette lacune. De plus, le principal caractère novateur de l'étude, située à l'interface entre neurosciences, toxicologie et chimie analytique, réside dans l'exploration des modifications du lipidome à la suite d'une exposition aux PE. Effectivement, alors qu'ils sont les principaux constituants de la myéline, les lipides ne sont pratiquement jamais analysés dans les études

de neurotoxicité. Fondée sur l'expertise du laboratoire, l'analyse qualitative et quantitative des lipides sera réalisée par chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse (HPLC-MS). Par cette approche, l'exploration exhaustive du lipidome pourrait apporter des informations essentielles sur les mécanismes de toxicité du BPA et, par la suite, sur celui d'autres PE.

Argumentation du choix des questions

Ce projet a pour but d'approfondir la connaissance de l'impact sanitaire des PE. En évaluant la pertinence d'une étude de la toxicité des PE par une approche lipidomique, il contribuera au développement de méthodes permettant d'investiguer certains des mécanismes d'action des PE en vue de caractériser des modes d'action « PE » en rapport avec le développement de TND (questions PE 1 et PE 2). Le BPA, largement étudié et pour lequel des données préliminaires de toxicité ciblant la myélinisation sont disponibles, a été choisi comme PE de référence pour évaluer la faisabilité et la pertinence des analyses lipidomiques dans l'exploration des mécanismes de toxicité des PE. Cette approche sera ensuite appliquée à l'étude de la toxicité d'autres PE répandus et potentiellement neurotoxiques tels que les phtalates ou encore les bisphénols S et F, utilisés en remplacement du BPA.

Description des méthodes mises en œuvre

L'étude associera un modèle in vivo à des modèles cellulaires d'oligodendrocytes murins pouvant être différenciés in vitro, incluant la lignée immortalisée Oli-Neu. De M (mois) 1 à M12, le BPA (ou le véhicule) sera administré à la dose de 40µg/kg à des souris gestantes pendant la gestation puis la lactation (Tiwari et al., Mol Neurobiol. 2014 51:1381-416). La myélinisation sera par la suite évaluée chez les descendants des deux sexes par des analyses histologiques et moléculaires, sur tissu ou oligodendrocytes purifiés par tri cellulaire magnétique (technologie MACS). L'analyse lipidomique sera alors réalisée sur certaines régions cérébrales (hippocampe, corps calleux) par HPLC-MS (de M13 à M18). Les modèles in vitro permettront de préciser les mécanismes d'action du BPA en réalisant la modulation pharmacologique ou de l'expression de récepteurs hormonaux (de M6 à M24). De plus, l'évaluation des modifications lipidomiques induites par le BPA sur la lignée Oli-Neu en cours de différenciation permettra de valider l'utilisation de ce modèle en première intention pour évaluer la toxicité des PE.

4. Membres participants au projet

Equipe 1 : Université Paris 5, Faculté de Pharmacie de Paris, UMR 8038 - C-TAC - Paris

Responsable de l'équipe : Mme Anne-Laure Schang

Equipe 2 : Hôpital Robert Debré, Inserm UMR_S1141 - Paris

Responsable de l'équipe : M. Pierre Gressens

5. Budget

Subvention accordée (€ TTC) : 50 000 € TTC

Résumé PoDéMos - 2019_1_116

Responsable scientifique : Mme Claudine Berr

Organisme : Université de Montpellier, Hôpital de la Colombière, Unité Inserm 1061 - Montpellier

1. Titre

Projet complet

36 mois

Effets de la POLLution de l'air sur le risque de Démence et sur ses Marqueurs biOlogiques dans la cohorte des 3C

2. Questions à la recherche

SHS 4 - Facteurs d'inégalités d'expositions aux risques environnementaux et sanitaires.

AIRR 4 - Indicateurs pertinents pour l'évaluation des expositions chroniques et/ou cumulées à la pollution de l'air (intérieur / extérieur).

3. Résumé

Objectif détaillé

Dementia is a neurodegenerative disease with devastating effects on individuals, families and society. Dementia affects more than 6 % of people over 65 in Europe. Most cases are Alzheimer's disease (AD), the other forms being mainly vascular or mixed dementia. Without cure, identification of modifiable environmental risk factors is a major challenge. In a large French population-based longitudinal cohort with high quality of dementia screening (the Three-City Study), our project aims to determine:

- 1) the effects of AP exposure on dementia risk in a prospective way,
- 2) how living in a deprived neighborhood may explain the association between AP exposure and dementia
- 3) the impact of AP on the biological markers of dementia
- 4) to what extent the AP-related changes in biological markers of dementia could mediate the link between AP and dementia.

By providing the strength of the link as well as responses about its biological plausibility, our project will improve our understanding of how AP might be a risk factor of dementia.

Argumentaire de l'originalité et/ou caractère novateur du projet

The ever-increasing concern over traffic related AP, namely particulate matter (PM) and nitrogen dioxide (NO₂), has recently raised questions regarding their possible chronic health effects on the brain. Indeed, AP-related early AD-like pathology (hippocampal atrophy, diffuse amyloid plaques) are reported in animal, and in human post-mortem studies.

However, the evidence of the effect of AP on dementia risk is scarce. First, previous studies did not have individual estimates of AP, almost never controlled for socio-economic neighborhood characteristics, used registers to assess the occurrence of dementia, and/or were retrospective. The few prospective studies estimate exposure at the end of follow-up or were conducted in old women only. Furthermore, the effects of AP on the biological markers identifying people at high risk of dementia are not yet known. Few studies have investigated in vivo the relationships between AP and markers of neurodegeneration (hippocampal and brain atrophies) or vascular burden (white matter hyperintensities (WMH)) with inconsistent results, and none the association between AP and markers of amyloid deposition. Hence, PoDéMos will be the first longitudinal study investigating the influence of personal AP exposure on the risk of dementia (based on a highly reliable clinical diagnostic), as well as the first study interested in the relationship between AP exposure and markers of amyloid deposition.

Argumentation du choix des questions

We will develop indicators of global exposure (combination of air pollutants) in the years preceding dementia onset. Based on our expertise in social health inequalities, we will explore to what extent the deprivation neighborhood is a confounding factor.

Description des méthodes mises en œuvre

POPULATION - The project will concern the whole 3C study population, 9294 subjects aged over 65 years from the general population recruited in Bordeaux, Dijon, and Montpellier in 1999-2001 for the objectives 1 & 2, and only Montpellier for objectives 2 & 3. Subjects were followed 12 to 15 years.

DEMENTIA - At baseline and every 2 years, diagnoses of dementia were preliminary made by a neurologist according to DSM-IV criteria and validated by an independent panel of neurologists. Cases of dementia were classified as AD or mixed/vascular dementia. More than 1053 incident cases of dementia were observed over the 15-years period of follow-up.

AP EXPOSURE - Individual exposure estimates will be obtained using participants' geocoded home addresses at baseline applying NO₂ and PM₁₀ high resolution maps (100mx100m) developed with a European Land-use regression (LUR) models built in 2010. From this LUR models, backward extrapolations will be done for the period 1994-2009 using yearly and regionally specific coefficients.

This method will allow to assess the chronological exposure to AP during the decade preceding the dementia onset, even without residential history, as we know that AP temporal variations over the year are minors and elderly are not very incline to change residency.

NEIGHBORHOOD SOCIO-ECONOMIC STATUS - We will use the previously defined 3C deprivation score (Letellier 2017).

BIOMARKERS - In Montpellier E3C center, 700 participants underwent neuroimaging at baseline and 394 at the 12-year follow-up. We will focus on brain parenchymal fraction, hippocampal and WMH volumes.

Plasma samples were collected at baseline (n=320) and 12-year follow-up (n=296). Plasma amyloid-beta dosages will be taken as an index of brain amyloid deposits.

TASKS

Months 0-12:

1. Geocodage of the participants' address.
2. Integrating the LUR models with the participant's geocodes.
3. Conducting descriptive analyses of exposures and development of indicators estimating the cumulated exposure to different AP using data mining methods (principal component analysis, hierarchical clustering).

Months 13-30:

4. Statistical analyses: Cox models to assess the effect of AP on the risk of dementia. Associations between AP and biomarkers will be analyzed using linear or logistic regression models. The gene-environment interaction Apolipoprotein E genotype-AP will be systematically tested.

5. Presentations in scientific conferences.

Months 30-36:

6. Publishing the findings in scientific journals.

7. Presentations in scientific conferences.

4. Membres participants au projet

Equipe 1 : Université de Montpellier, Hôpital de la Colombière, Unité Inserm 1061 - Montpellier

Responsable de l'équipe : Mme Claudine Berr

Equipe 2 : Inserm, IRSET UMRS 1085 - Rennes

Responsable de l'équipe : Mme Benedicte Jacquemin

5. Budget

Subvention accordée (€ TTC) : 169 824 € TTC

Résumé SOHO-EpiMetCan - 2019_1_186

Responsable scientifique : Mme Sylvie Bortoli

Organisme : INSERM UMR 1124 Faculté des Sciences Fondamentales et Biomédicales - Paris

1. Titre

Projet complet

36 mois

Impact de l'utilisation des fongicides SDHi : évaluation épidémiologique, épigénétique et métabolique en lien avec le cancer

2. Questions à la recherche

CANC 1 - Etude des risques de cancers liés à des expositions environnementales et/ou professionnelles aux substances potentiellement cancérigènes (entre autres avec une approche « vie entière »).

CANC 2 - Identification de facteurs de risques environnementaux ou professionnels des cancers.

CANC 5 - Identification et/ou validation de biomarqueurs pour évaluer les risques dans des situations d'exposition environnementales ou professionnelles.

3. Résumé

Objectif détaillé

Contexte : les inhibiteurs de la succinate déshydrogénase (SDHi) sont des fongicides dont l'usage a fortement augmenté depuis 10 ans, notamment pour assurer la protection des céréales contre les moisissures. Les SDHi inhibent la succinate déshydrogénase (SDH), une enzyme mitochondriale impliquée dans la respiration cellulaire, présente dans la plupart des espèces vivantes. Les SDHi pourraient donc également altérer l'activité de la SDH humaine, avec un impact potentiellement très important sur la santé humaine. La dérégulation de l'activité SDH entraîne l'accumulation d'un oncométabolite, le succinate, qui inhibe l'activité de dioxygénases telles que les HIF prolyl-hydroxylases et/ou les déméthylases de l'ADN et des histones. Ainsi, une augmentation du niveau de succinate pourrait entraîner une dérégulation métabolique favorisant l'hypoxie et le remodelage épigénétique, deux événements importants dans la cancérogenèse. Chez l'être humain, l'inactivation de la SDH liée à un déficit génétique peut entraîner des pathologies cancéreuses impliquant des mécanismes de remodelage épigénétique et métabolique, et nous posons l'hypothèse que l'inactivation chimique de la SDH par les SDHi pourrait affecter ces mécanismes, avec un impact potentiel sur la cancérogenèse humaine.

Problématique : une expertise récente de l'INSERM a mis en évidence qu'une exposition professionnelle aux pesticides pouvait être associée à l'apparition de certains cancers notamment hématologiques. Concernant les SDHi, les données mécanistiques et sanitaires sont extrêmement parcellaires et ne permettent pas à ce jour d'avoir une vision claire de l'impact de leur utilisation sur le risque de développer un cancer. En particulier, les tests réglementaires actuellement utilisés pour évaluer ce risque n'incluent pas l'étude des modifications épigénétiques et métaboliques qui peuvent jouer un rôle important dans la cancérogenèse. **Objectifs** : sur la base d'un réseau interdisciplinaire de partenaires scientifiques, ce projet propose une évaluation de l'impact des SDHi sur le remodelage épigénétique et la reprogrammation métabolique en lien avec la cancérogenèse.

Résultats attendus : ce projet devrait permettre de développer de nouveaux outils d'évaluation du risque en les confrontant aux tests classiques de toxicologie.

Il vise à proposer une nouvelle approche d'évaluation du risque basée sur l'utilisation du succinate comme biomarqueur.

Argumentaire de l'originalité et/ou caractère novateur du projet

Cette étude devrait permettre d'apporter des connaissances nouvelles sur le mode d'action de ces fongicides. Son originalité repose sur l'exploration de mécanismes de toxicité des fongicides SDHi basés sur les régulations épigénétiques et l'homéostasie métabolique, deux processus excessivement importants dans la

promotion et la progression du cancer, et récemment décrits pour être dérégulés en réponse à une exposition aux pesticides. Ce projet vise à favoriser le développement de nouveaux outils d'évaluation du risque en lien avec le cancer, sur la base de mécanismes qui ne sont actuellement pas explorés par les tests réglementaires classiques.

Argumentation du choix des questions

La problématique posée permettra

- 1) de caractériser les mécanismes d'action et de toxicité des SDHi;
- 2) d'apporter des connaissances nouvelles sur le risque de cancer lié à une exposition environnementale et/ou professionnelle aux SDHi;
- 3) d'identifier des biomarqueurs pour évaluer les risques dans des situations d'expositions environnementales ou professionnelles.

Description des méthodes mises en œuvre

1) Evaluation des expositions professionnelles et maladies afférentes.

Ce volet est basé sur l'étude de la cohorte AGRICAN, qui inclut environ 180 000 agriculteurs avec l'historique des cultures et des conditions de travail. Une incidence de 2 000 cancers est identifiée chaque année (plus de 15 000 cancers à ce jour). La matrice d'exposition agricole PESTIMAT permettra d'identifier les agriculteurs exposés aux fongicides mitotoxiques (environ 20 SDHi et 40 autres fongicides ciblant d'autres enzymes mitochondriales) et d'étudier leur association avec la localisation des tumeurs.

2) Etude des mécanismes d'action des SDHi. Par des approches in vitro sur différents modèles cellulaires, nous comparerons les effets des SDHi à faibles et fortes doses mimant respectivement les expositions chroniques et aiguës.

Nous étudierons l'impact des SDHi sur la reprogrammation métabolique 1) par la mesure de l'activité SDH, des niveaux de succinate, des taux de respiration et d'acidification (Seahorse), de la production de lactate et des capacités oxydatives (substrats radiomarqués); 2) par la caractérisation du métabolome en RMN.

Nous étudierons les modifications épigénétiques par analyse pangénomique de la méthylation de l'ADN (Reduced Representative Bisulfite Sequencing) et leurs conséquences sur le transcriptome (RNAseq).

3) Impact sur la cancérogenèse

Nous étudierons les modifications du phénotype cellulaire par la mesure de la prolifération cellulaire, des capacités de migration et d'invasion, et la mesure de la clonogénicité suite à une exposition chronique aux SDHi.

4. Membres participants au projet

Equipe 1 : INSERM UMR 1124 Faculté des Sciences Fondamentales et Biomédicales, Paris

Responsable de l'équipe : Mme Sylvie Bortoli

Equipe 2 : INRA TOXALIM UMR1331, Toulouse

Responsable de l'équipe : Mme Laurence Huc

Equipe 3 : Hôpital européen Georges Pompidou, Laboratoire PARCC, Inserm UMR 970, Equipe génétique et métabolisme des cancers rares, Paris

Responsable de l'équipe : Mme Judith Favier

Equipe 4 : Centre François Baclesse, UMR1086 Cancers et Préventions - IFR 146 ICORE, Caen

Responsable de l'équipe : M. Pierre Lebailly

5. Budget

Subvention accordée (€ TTC) : 199 992 € TTC

Résumé Stemcellair - 2019_1_200

Responsable scientifique : M. Laurent Boyer

Organisme : Hôpital Henri Mondor, APHP, Service Physiologie explorations fonctionnelles - Créteil

1. Titre

Projet complet

24 mois

Pollution de l'air et régénération pulmonaire

2. Questions à la recherche

AIRR 1 - Evaluation de l'exposition et des risques afférents aux polluants chimiques dangereux, aux agents pathogènes et aux particules présents dans l'air :

- sur des lieux peu étudiés (commerces, bureaux, moyens de transport),
- sur des zones à proximité de grands axes routiers, de ports, d'aéroports.

AIRR 2 - Pour des polluants émergents (au sens de l'ANSES) : devenir et impacts sanitaires et prise en compte dans les modèles de pollution de l'air des particules émises par les transports.

AIRR 4 - Indicateurs pertinents pour l'évaluation des expositions chroniques et/ou cumulées à la pollution de l'air (intérieur / extérieur).

3. Résumé

Objectif détaillé

Le mode de vie urbain lié à une pollution de l'air importante, quel que soit la nature des particules (aérosols de combustion, inorganiques, organiques secondaires et d'origine terrigène, depuis les PM1 jusqu'aux PM10), diminue la croissance pulmonaire chez l'enfant, et participe aux maladies respiratoires adultes comme l'emphysème. Il affecterait ainsi la capacité pulmonaire à générer de nouvelles alvéoles, soit au cours de la croissance soit une fois les alvéoles détruites. L'alveolisation dépend des cellules progénitrices alvéolaires (pneumocytes de type 2 (AT2)), mais aussi de leur microenvironnement, ou niche, qui contrôle leur devenir. Cependant, l'effet de pollution urbaine sur les cellules progénitrices, leur micro-environnement et leur capacité à générer des alvéoles n'est pas connu.

Notre hypothèse est donc que la pollution urbaine altère les capacités des cellules progénitrices alvéolaires à se différencier et à induire une régénération alvéolaire. Cela toucherait les cellules progénitrices et leur microenvironnement. Elle affecterait les principales voies de la régénération pulmonaire, dont la voie Wnt et le métabolisme lipidique.

Il s'agira de déterminer i) si une exposition à des environnements atmosphériques urbains et peri-urbains de grandes métropoles mondiales (en situation « trafic » importante), comparée à des environnements peri-urbains faiblement exposés à du trafic de proximité, durant l'enfance ou à l'âge adulte altère les capacités alvéolaires de régénération in vivo et in vitro, ii) si cet effet persiste à distance de l'exposition urbaine ii) l'impact respectif de l'exposition complexe sur les AT2, la niche de cellule souche (cellules mesenchymateuses fibroblastiques) et leurs interactions.

In vivo, le modèle murin d'alveolisation pulmonaire induit par une pneumonectomie sera utilisé. In vitro, une culture tridimensionnelle de type organoïde permettra de reproduire une structure alvéolaire (alvéolosome), en cocultivant des AT2 et des cellules mesenchymateuses.

Argumentaire de l'originalité et/ou caractère novateur du projet

Le caractère innovant repose sur i) l'absence de données sur l'impact de la pollution atmosphérique sur les cellules progénitrices pulmonaires ii) les méthodes utilisées tant le type d'exposition que les modèles de régénération pulmonaire iii) la perspective d'un modèle préclinique associant génération d'exposition atmosphériques réalistes (pour des zones comme Paris, Pékin, ville méditerranéenne du futur, etc) et des

alvéolosome, afin de tester l'impact de ces différentes expositions iv) une meilleure compréhension des mécanismes induits par la pollution de l'air sur la santé pulmonaire, notamment des enfants exposés précocement à une pollution atmosphérique

Argumentation du choix des questions

« Milieux et contamination »-« Air »-1b, 2 et 4. La plateforme CESAM (cesam.cnrs.fr) du LISA permet de reproduire tout type d'épisode physico-chimique atmosphérique dans toutes ses phases (gaz et particules) sur plusieurs jours, dont les niveaux de qualité de l'air associés aux zones urbaines, caractérisées par un fort trafic routier. L'utilisation des modèles in vivo et in vitro permettra d'identifier des indicateurs pertinents pour l'évaluation des expositions chroniques et/ou cumulées à la pollution de l'air extérieur, car basées sur la fonction des cellules progénitrices pulmonaires, indispensables à la croissance et l'homéostasie du poumon.

Description des méthodes mises en œuvre

Pneumectomie : elle induit une croissance du poumon contro-latéral et la formation de nouvelles alvéoles (à 10 jours et un mois). Elle aura lieu avant l'exposition à l'atmosphère complexe ou à distance.

Alvéolosome : les AT2 murin (tri cellulaire) seront cocultivés avec des cellules mesenchymateuse (digestion enzymatique). L'exposition sera réalisée pendant la formation des alvéolosomes, puis sur les AT2 ou les fibroblastes avant coculture.

La génération d'atmosphères complexes et l'exposition des souris sera réalisée par le LISA (UMR CNRS 7583, Créteil, France). Différentes atmosphères seront générées pour différentes villes (Contrôle, urbain, péri-urbain) pendant 5 à 8 jours. Des souriceaux (10 jours) et des souris adultes (2 mois) seront exposés. In vitro, le système CULTEX® LTC-C Advanced Long-Term Cultivation sera utilisé pour l'exposition de co-culture 3D (organoides).

Caractérisation des AT2, des cellules mesenchymateuses: Leur localisation et leur nombres seront évalués in vivo en caractérisant la niche de cellule souche (distance pneumocytes/fibroblastes). Leur contenu en particules (notamment les ultrafines < 1 microm), leur localisation intra-cellulaire, seront évalués en microscopie électronique ; la voie Wnt par analyse transcriptomique ; le contenu lipidique par analyse lipidomique. Les voies de signalisation identifiées seront testées dans le modèle d'alvéolosome.

4. Membres participants au projet

Equipe 1 : Hôpital Henri Mondor, APHP, Service Physiologie explorations fonctionnelles - Créteil

Responsable de l'équipe : M. Laurent Boyer

Equipe 2 : Université Paris 7, Faculté des Sciences et Technologie, LISA, UMR CNRS 7583 - Créteil

Responsable de l'équipe : M. Patrice Coll

5. Budget

Subvention accordée (€ TTC) : 200 000 € TTC

Résumé ThECA - 2019_1_112

Responsable scientifique : M. Davide Degli Esposti

Organisme : Irstea, UR Riverly, Laboratoire d'écotoxicologie - Villeurbanne

1. Titre

Etude de faisabilité

18 mois

Outil intégré pour l'identification et la quantification des perturbateurs endocrines chez les crustacés.

2. Questions à la recherche

ACHIM 1 - Exposition aux contaminants et effets sur les écosystèmes et la santé humaine : milieux aquatiques, approche par compartiment (sol, air, eau...) et effets des mélanges.

PE 1 - Développement et test de méthodes permettant d'investiguer des mécanismes d'action, en vue de caractériser des modes d'action « perturbateurs endocriniens ».

3. Résumé

Objectif détaillé

Anthropogenic activities have left a chemical pollution legacy affecting the entire ecosystem in the last decades. Endocrine disruptors (EDs) are chemicals that have the potential to interfere with the endocrine system, affecting development and reproduction (WHO, 2012). Research on EDs mainly focuses on vertebrates, leading to proposal specific ED targets (e.g. ER?, THR, AR) and in vitro assays that are widely recognized and currently proposed as tools for screening programs. Arthropods represent the vast majority of animal species and have endocrine systems highly different from that of vertebrates, mainly based on ecdysteroids (Ec) and juvenile hormone (JH) pathways (Trapp et al 2015). Thus, no screening tools for ED are currently available in these species. This mainly results from the lack of knowledge on endocrine control in invertebrates.

Crustaceans are among the most diverse arthropods and are essential for the good function of aquatic ecosystems. While a small number of fully annotated crustacean genomes are today available, transcriptomic and proteogenomics resources have increased in the last decade. Phylogenetic analysis and comparative genomics approaches have recently allowed the identification of the *Gammarus fossarum* USP/RXR gene that dimerizes with Ec receptor to activate the ecdysone responsive pathway. Since orthology does not necessarily imply a conserved function, a proper isolation and functional characterization of NRs in crustaceans is essential to address the hazard of emerging and priority contaminants.

The main objective of this project is to provide a streamlined testing tool including a bioinformatics pipeline and an in vitro test that can identify contaminants able to activate receptors mediating endocrine functions. This approach will allow i) contaminant classification as EDs in crustaceans based on their mechanism of action, i.e. NR agonist/antagonist ii) a prioritization scale in terms of hazard assessment based on the strength of the observed activation, iii) a toxicological toolbox to validate the in vitro tests in both marine and freshwater species.

Argumentaire de l'originalité et/ou caractère novateur du projet

1) Original approach combining bioinformatics, phylogenetics, in vitro assays and ecotoxicology to identify endocrine disruptors of crustacean, a neglected but essential phylum for ecosystem services.

2) This project address a major gap in toxicity testing of endocrine disrupting chemicals, since validated test guidelines of NR-based assays with non-mammalian models are still lacking within the level 2 of the OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment.

3) The results of this project will provide a practical tool to easily screen compounds and environmental samples for ED in aquatic environments.

Argumentation du choix des questions

This interdisciplinary project covers the research questions on endocrine disruption (point 1) and chemicals agents (point 1) and fits perfectly with the question about the development of testing methods to investigate the mechanisms of action of any chemical agent that activates an endocrine signaling pathways.

Description des méthodes mises en œuvre

Task 1 (months 1-4). Identification of EcR and RXR orthologs in crustaceans. We will focus on the research of orthologues of the NRs involved in molting and reproduction axes in crustaceans, namely EcR and USP/RXR, using databases such as OrthoDB, and other publicly available resources, (genomes or RNA-seq datasets). Phylogenetic analysis of the potential orthologues will be performed (Gouveia et al 2018, André et al 2017) to validate the functional annotation of the candidate sequences. The validated candidates will be cloned for testing in the task 2.

Task 2 (months 5-13). Risk evaluation of EDs based on in vitro activity assays. Validated NR candidates will be cloned into an expression vector containing the Renilla luciferase and the obtained constructs will be co-transfected with the reporter vector into COS-1 cells (André et al 2017). Transfected cells will be exposed to various known or suspected EDs, in particular model molecules such as insecticides targeting EcR (e.g. methoxyfenozide) or USP/RXR ligands (retinoic acids, organotins) and other emerging compounds (PFAS, synthetic retinoids, lipid regulating pharmaceuticals). Each compound will be classified as being a high, mid or low NR agonist/antagonist based on the luciferase reporter assay. This result will provide a scale of endocrine perturbation potential and allow for prioritization for the validation via in vivo testing.

Task 3 (months 14-18). Toxicological assessment of high risk EDs in gammarids sentinel species. The compounds identified as high NR agonists/antagonists will be tested in vivo on two sentinel species, one marine and one freshwater scud, *Gammarus locusta* and *Gammarus fossarum* respectively. Adverse effect on life history traits, such as molting or embryonic development will be systematically measured in experimental bioassays developed in *G. fossarum* (Geffard et al 2010, Coulaud et al 2011) using a wide-range of doses on the two species. The results of this task will allow validating the whole testing approach.

4. Membres participants au projet

Equipe 1 : Irstea, UR Riverly, Laboratoire d'écotoxicologie - Villeurbanne

Responsable de l'équipe : M. Davide Degli Esposti

Equipe 2 : University of Porto, Interdisciplinary Centre of Marine and Environmental Research – Matosinhos, Portugal

Responsable de l'équipe : M. Miguel Santos

5. Budget

Subvention accordée (€ TTC) : 41 558 € TTC

Résumé TigeRisk2 - 2019_1_055

Responsable scientifique : M. Jean-Philippe David

Organisme : CNRS, LECA - UMR 5553 - Grenoble

1. Titre

Projet complet

36 mois

Evaluation du risque de résistance aux insecticides chez le moustique tigre – Une approche prédictive combinant sélection expérimentale et marqueurs moléculaires

2. Questions à la recherche

LAVE 1 - Vecteurs et santé humaine, animale ou végétale : biologie, écologie, distribution des vecteurs, relation hôte-pathogène, surveillance des vecteurs, détection (relations agent pathogène - pathogénicité ; vecteur sentinelle...), exposition différenciée, résistance.

3. Résumé

Objectif détaillé

L'objectif du projet est d'identifier les allèles de la résistance aux insecticides pyréthrinoïdes (PYRs) chez le moustique tigre, et d'évaluer leur fréquence pour prédire leur dynamique afin de permettre la gestion précoce de la résistance sur le territoire français. Plus précisément ce projet vise à :

- 1) Coloniser au laboratoire des populations composites d'*Ae. albopictus* issues du mélange de populations collectées dans des zones géographiques où une augmentation de la résistance aux PYRs est détectée ou suspectée.
- 2) Sélectionner au laboratoire ces populations composites avec la deltaméthrine afin d'augmenter la fréquence des allèles de résistance.
- 3) Identifier ces allèles par une étude d'association génotype-phénotype combinant des bio-essais dose-réponse et une analyse par séquençage haut débit.
- 4) Évaluer la fréquence de ces allèles dans les populations naturelles ainsi que leur dynamique afin de prédire le risque d'émergence de la résistance en France.

Argumentaire de l'originalité et/ou caractère novateur du projet

La création de lignées résistantes permettra d'identifier les allèles de résistance afin ensuite de les détecter à un stade où la résistance est encore peu développée sur le terrain. Leur origine variée assurera une bonne représentation des marqueurs de résistance à surveiller.

L'identification des marqueurs de résistance sera assurée par couplage entre des bio-essais dose-réponse et une approche génomique par DNA-seq. Cette approche a déjà été utilisée avec succès par le CNRS LECA chez *Ae. aegypti* (Faucon et al. 2015) et est aujourd'hui applicable chez *Ae. albopictus* (génomome séquencé et annoté).

Le suivi des allèles de résistance sur le terrain permettra de prédire très en amont l'émergence de la résistance, et donc de mieux anticiper les solutions de gestions.

Argumentation du choix des questions

Le moustique tigre représente une menace sanitaire par la transmission d'arboviroses dans les territoires ultra-marins ainsi qu'en métropole.

Les PYRs constituent les seuls adulticides utilisables contre les moustiques en France. Cependant, leur efficacité est menacée par la résistance des vecteurs. La résistance aux PYR, fréquente chez *Ae. aegypti*, se développe chez *Ae. albopictus*. Des cas de résistance ont déjà été rapportés en Asie du Sud-Est tandis que son émergence est confirmée dans l'Océan Indien (Réunion) et dans le sud de l'Europe (Italie, Grèce). Le maintien

de l'efficacité de la LAV contre *Ae. albopictus* constitue un axe capital du plan national de Lutte contre le chikungunya et la dengue.

L'utilisation de marqueurs moléculaires permettra de détecter la résistance même à faible fréquence, avant que celle-ci ne soit clairement détectable par des bio-essais.

Description des méthodes mises en œuvre

Tâche 1 (mois 1 à 6): Echantillonnage et bioessais : Des populations d'*Ae. albopictus* seront collectées en Europe du Sud (France, Italie, Espagne), Océan Indien (La Réunion, Mayotte, Madagascar) et en Asie du sud-est (Laos, Thaïlande, Cambodge). Les niveaux de résistance à la deltaméthrine seront évalués par bio-essais sur adultes F1 en comparaison de souches sensibles de référence. Deux doses seront utilisées (dose OMS et dose réduite de 50%) afin de détecter de faibles niveaux de résistance. Des individus F0 de chaque population seront échantillonnés pour les analyses moléculaires prévues en tâche 4. Des individus de chaque population seront également ré-échantillonnés au mois 30 afin d'estimer la dynamique temporelle des allèles de résistance (tâche 4).

Tâche 2 (mois 6 à 18) : Sélection au laboratoire: Les populations les plus résistantes de chaque région seront mélangées afin de créer une population composite représentative de chaque région. Chaque population composite sera sélectionnée avec la deltaméthrine au stade adulte pendant 12 générations en insectarium (niveau de sécurité P2+). Les niveaux de résistance seront évalués toutes les 3 générations et des individus seront échantillonnés à chaque génération. Des répliques de ces populations composites seront aussi maintenues sans sélection.

Tâche 3 (mois 18 à 30): Identification des marqueurs de résistance : Chaque métapopulation montrant une résistance accrue à la deltaméthrine sera soumise à des bio-essais dose-réponse. Des pools d'individus survivants/morts à chaque dose (ainsi que des individus sensibles) seront utilisés pour une étude d'association génotype-phénotype par « whole genome DNA-seq » afin d'identifier les marqueurs ADN les plus associés à la résistance.

Tâche 4 (mois 24 à 36) : Suivi des marqueurs dans les populations naturelles et prévision du risque

Des tests moléculaires (qPCR ou séquençage) seront développés pour 10-15 marqueurs ADN, les plus associés statistiquement à la résistance. Nous génotyperons d'abord des individus F0 issus des différentes populations de terrain collectées dans la tâche 1, puis nous suivrons la fréquence de ces marqueurs dans les populations naturelles (ré-échantillonnage des populations résistantes au mois 30). L'analyse de ces fréquences et de leur évolution permettra une première cartographie du risque de résistance qui pourra ensuite se poursuivre au-delà du projet.

4. Membres participants au projet

Equipe 1 : CNRS, LECA - UMR 5553 - Grenoble

Responsable de l'équipe : M. Jean-Philippe David

Equipe 2 : Université de Montpellier, ISEM - Montpellier

Responsable de l'équipe : M. Pierrick Labbé

Equipe 3 : EID Rhône-Alpes - Chindrieux

Responsable de l'équipe : Mme Delphine Rey

Equipe 4 : Institut Pasteur du Laos – Vientiane, Lao

Responsable de l'équipe : M. Sebastien Marcombe

Equipe 5 : ARS-OI - Saint-Denis

Responsable de l'équipe : M. Jean Sébastien Dehecq

5. Budget

Subvention accordée (€ TTC) : 199 362 € TTC

Résumé ToxIALMix - 2019_1_052

Responsable scientifique : Mme Véronique André

Organisme : Université de Caen –Normandie, Centre François Baclesse, UFR Santé, composante Sciences pharmaceutiques, ABTE-ToxEMAC EA4651 - Caen

1. Titre

Projet complet

36 mois

Toxicité pulmonaire in vitro de mélanges complexes de polluants de l'air intérieur : effets d'une exposition répétée à l'interface air-liquide (IAL)

2. Questions à la recherche

ACHIM 6 - Modèles in vitro et in vivo chez l'animal et développement d'indicateurs globaux « d'effets cocktail » pour l'évaluation de la toxicité des mélanges de micropolluants en vue de l'évaluation d'une exposition chronique.

AIRR 1 - Evaluation de l'exposition et des risques afférents aux polluants chimiques dangereux, aux agents pathogènes et aux particules présents dans l'air :

- sur des lieux peu étudiés (commerces, bureaux, moyens de transport),
- sur des zones à proximité de grands axes routiers, de ports, d'aéroports.

AIRR 4 - Indicateurs pertinents pour l'évaluation des expositions chroniques et/ou cumulées à la pollution de l'air (intérieur / extérieur).

3. Résumé

Objectif détaillé

La qualité de l'air intérieur est une préoccupation majeure de santé publique et de coût socio-économique (estimé à près de 20 milliards €/an).

Les contaminants chimiques, physiques ou biologiques de l'air intérieur proviennent de multiples sources environnementales et anthropiques. Pour comprendre le lien entre l'exposition à ces mélanges complexes présents à de faibles concentrations, et le développement de pathologies chroniques respiratoires, il est nécessaire d'évaluer in vitro les mécanismes de toxicité dans des conditions les plus réalistes possibles (modèle cellulaire, mode et doses d'exposition).

Le projet ToxIALMix propose d'étudier (i) les effets d'expositions cumulées à de faibles doses d'un mélange représentatif de la pollution de l'air intérieur sur 2 modèles de cellules humaines en culture primaire différenciées (cellules pulmonaires et macrophages) et (ii) les interactions entre ces 2 types cellulaires au niveau de la réponse inflammatoire.

L'échantillon de référence sera le SRM2585 (certifié par le NIST) issu de poussières récoltées dans des habitats. Il contient 140 substances appartenant à 4 familles chimiques aux mécanismes d'action différents (HAP, PCB, pesticides organochlorés, PBDE) et 2,1% de moisissures. De par sa composition, cet échantillon contribuera également à la question PE3 « Etude des effets à faibles doses et/ou effets cocktails ».

La sélection de la fraction du SRM présentant une granulométrie inférieure à 10µm permettra d'être en adéquation avec le modèle de cellules épithéliales humaines d'origine bronchique/trachéale en culture primaire retenu (NHBE). L'identification de la flore fongique, le dosage des endotoxines et le potentiel mutagène complèteront la caractérisation du SRM2585.

Les effets biologiques seront évalués lors d'expositions quotidiennes des NHBE durant 5 jours à l'interface air-liquide (ALI) via un système d'exposition contrôlée. Les altérations morphologiques et fonctionnelles, la réponse inflammatoire, le stress oxydant et les altérations génotoxiques seront évalués jusqu'à 7 jours post-exposition.

En parallèle, une étude des caractéristiques phénotypiques et de la réponse inflammatoire de macrophages sera menée après expositions comparables à la même fraction du SRM.

Enfin, les mécanismes d'interactions entre les 2 modèles cellulaires seront abordés en exposant les NHBE aux surnageants des macrophages après exposition, dans le but de déterminer le rôle de la production de médiateurs de l'inflammation par les macrophages sur les cellules épithéliales.

Dans un second temps, les biomarqueurs les plus pertinents seront utilisés pour étudier la réponse des modèles cellulaires exposés à des échantillons de poussières prélevés dans des bureaux.

Argumentaire de l'originalité et/ou caractère novateur du projet

L'originalité de ToxIAlMix réside dans :

- le choix d'un mélange complexe certifié et représentatif de 4 grandes classes de contaminants présents en air intérieur,
- la répétition des expositions à faibles doses sur des cultures primaires de cellules pulmonaires en ALI et de macrophages afin de se rapprocher des conditions physiologiques,
- l'étude cinétique de la réponse cellulaire globale par la mesure de biomarqueurs d'effets toxiques précoces et tardifs.
- l'application à des échantillons prélevés sur sites peu documentés comme des bureaux.

Argumentation du choix des questions

ToxIAlMix contribuera au développement de protocoles d'étude de la toxicité de mélanges complexes de polluants aériens sur des modèles in vitro physiologiquement proches de l'épithélium respiratoire, dans des conditions d'exposition pertinentes (ACHIM 6) et permettra d'identifier des indicateurs d'effets biologiques en lien avec les expositions chroniques et/ou cumulées à la pollution de l'air intérieur (AIRR 4), avec une application à des sites peu étudiés (AIRR1).

Description des méthodes mises en œuvre

1. Caractérisation biologique du SRM2585 (M1-3) et des poussières de bureaux (M16-M19)
Flore fongique (microscopie, PCR), dosage des endotoxines (test LAL), mutagénicité (Ames)
2. Cellules NHBE (M4-M12, M14-M20)
1 exposition/j pendant 5 j au SRM en ALI (n=2)
Biomarqueurs (jusqu'à 7 j post-exposition)
Cytotoxicité (LDH), différenciation, altérations morphologiques et fonctionnelles (ME, confocal), TEER, inflammation (cytokines CMF)
Stress oxydant : ERO (CMF/ Live-cell analysis), enzymes antioxydantes, GSH/GSSG, adduits à l'ADN (UHPLC-MS/MS, ELISA), expression de gènes d'intérêt (PCR Array)
Génotoxicité : gH2AX ou comètes
3. Macrophages (M4-M12)
1 exposition au SRM/j pendant 5 j (n > 6)
- Biomarqueurs (jusqu'à 7 j post-exposition) :
Cytotoxicité (WST-1), phénotypage (marqueurs membranaires CMF), inflammation (cyto- et chimiokines)
4. Interaction NHBE/macrophages (M14-M16)
Exposition aux surnageants de culture de macrophages exposés au SRM
Evaluation des biomarqueurs d'intérêt (selon les résultats obtenus en 2).
5. Application aux poussières de bureaux récoltées (M20-M32)
Selon démarche ci-dessus (points 1 à 4)
6. Biostatistiques, Valorisation (M30-M36)

4. Membres participants au projet

Equipe 1 : Université de Caen –Normandie, Centre François Baclesse, UFR Santé, composante Sciences pharmaceutiques, ABTE-ToxEMAC EA4651 - Caen

Responsable de l'équipe : Mme Véronique André

Equipe 2 : Université de Rennes 1, Faculté de pharmacie, UMR INSERM 1085- IRSET - Rennes

Responsable de l'équipe : Mme Valérie Lecreur

5. Budget

Subvention accordée (€ TTC) : 195 572 € TTC

Résumé ToxMining - 2019_1_164

Responsable scientifique : M. Fabien Jourdan
Organisme : Inra, UMR 1331 Toxalim - Toulouse

1. Titre	Projet complet	36 mois
-----------------	-----------------------	----------------

Approche de toxicologie prédictive pour la priorisation de l'évaluation des agents chimiques

2. Questions à la recherche

ACHIM 1 - Exposition aux contaminants et effets sur les écosystèmes et la santé humaine : milieux aquatiques, approche par compartiment (sol, air, eau...) et effets des mélanges.

PE 1 - Développement et test de méthodes permettant d'investiguer des mécanismes d'action, en vue de caractériser des modes d'action « perturbateurs endocriniens ».

PE 2 - Étude des modes d'action en vue d'identifier une éventuelle perturbation endocrinienne en rapport avec le développement de certaines pathologies, y compris sous l'angle des effets trans/intergénérationnels.

3. Résumé

Objectif détaillé

L'objectif de ce projet est de développer une nouvelle approche combinant phénotypage métabolique in vitro (métabolomique) et recherche d'information dans des grands corpus de données afin de prioriser et catégoriser les agents chimiques en fonction de leurs effets potentiels sur la santé humaine.

La métabolomique permet d'identifier sans a priori une liste de métabolites (empreinte) lorsqu'il existe une différence métabolique significative entre une condition contrôle et une condition d'exposition à un ou plusieurs xénobiotiques [1]. Cette approche a notamment permis de mettre en évidence des effets à faibles doses de plusieurs perturbateurs endocriniens [2]. L'empreinte métabolique ne permet toutefois pas de statuer directement sur les effets sanitaires qui peuvent être associés à cette liste de métabolites. Ce projet cherchera à lever ce verrou en fournissant une solution informatique permettant d'évaluer si une empreinte est le reflet d'une modulation qui peut être associée à un ou plusieurs risques sanitaires.

Le principal défi méthodologique consistera à créer un modèle mathématique permettant d'évaluer automatiquement si une empreinte observée correspond de manière significative à une empreinte pouvant être retrouvée lors de l'étude d'une maladie ou d'un effet physiologique lié à une perturbation endocrinienne. Pour cela, nous exploiterons deux sources de données publiques 1) la littérature scientifique via des approches d'analyse automatique du texte [3] 2) les bases de données internationales d'empreintes (e.g. MetaboLights, Metabolomics workbench). A partir de ces données, nous construirons le modèle en utilisant les données métabolomiques déjà obtenues in vitro par les membres du consortium. Après cette étape de validation, nous étudierons l'effet de contaminants d'intérêts en évaluation du risque tels que les composés perfluorés ou composés perfluoroalkylés (PFAS). Ces études de métabolomiques in vitro seront menées sur des modèles cellulaires choisis pour leurs capacités métaboliques ainsi que leur proximité physiologique avec les cellules humaines, en particulier hépatiques (cellules HepaRG en culture 2D et 3D, hépatocytes primaires humains) [4].

Argumentaire de l'originalité et/ou caractère novateur du projet

Le partenaire 1 a réalisé des études métabolomiques in vitro sur plusieurs agents chimiques (BPA, BPS ...). Durant la seconde phase du projet, d'autres composés vont être étudiés enrichissant ainsi les connaissances sur les effets métaboliques observés pour un nombre plus large de composés chimiques.

L'approche de fouille de texte et d'extraction de connaissance (P2) sur des données de métabolomique peut apporter des informations complémentaires dans le cadre d'études cliniques où la maladie ou le syndrome était connu. Toutefois, ce type d'approche n'a jamais été utilisé pour des agents chimiques dont on ne connaît à priori pas l'effet sanitaire.

Ce projet fournira une solution originale et complémentaire des autres approches de screening utilisées en toxicologie. En combinant approches moléculaires et informatiques, elle permettra de prioriser plus rapidement les agents chimiques suivant leurs effets. L'outil bioinformatique développé sera mis à disposition des laboratoires et des agences d'évaluation (expertise P1 [5]).

Argumentation du choix des questions

La métabolomique combinée à une approche de fouille de données va permettre d'améliorer la caractérisation des modes d'action métaboliques des agents chimiques.

Afin de respecter le cadre (temps et budget) de l'appel à projet, l'effet cocktail ne sera pas étudié. Mais l'approche développée, étant générique, pourra à moyen terme contribuer à établir un lien entre mélanges complexes et effets potentiels sur la santé.

La fouille de texte et l'extraction de connaissances dans des bases de données publiques vont permettre de mieux interpréter les empreintes métaboliques. Mais cette approche peut aussi apporter des compléments d'informations sur les métabolites qui pourraient être considérés comme des biomarqueurs potentiels. Ainsi, il sera possible d'étudier à nouveau les données de métabolomique afin de rechercher de manière plus ciblée des biomarqueurs mentionnés dans la littérature ou dans les bases de données.

Description des méthodes mises en œuvre

M0-12 Constitution de la base de connaissance

- Architecture de la BD
- Méthode et outils pour l'extraction et la standardisation des données :
 - o liant empreintes et pathologies
 - o liant empreintes et substances chimiques

M12-30 Mise au point et validation de la méthode prédictive

- Mise au point des méthodes de classification et de priorisation
- Production de données (MS et RMN) sur cellules HepaRG (2D-3D) et sur des hépatocytes primaires pour une sélection de PFAs.

• Analyse des prédictions et études complémentaires (approches ciblées) afin de corroborer les hypothèses.

M18-36 Implémentation et diffusion

- Implémentation du serveur web donnant accès à la méthode
- Valorisation des résultats et communication auprès des utilisateurs

4. Membres participants au projet

Equipe 1 : Inra, UMR 1331 Toxalim - Toulouse

Responsable de l'équipe : M. Fabien Jourdan

Equipe 2 : Université Paul Sabatier, IRIT/IRIS UMR 5505- Toulouse

Responsable de l'équipe : M. Gilles Hubert

Equipe 3 : Université de Rennes 1, UMR Inserm 1085 Irset - Rennes

Responsable de l'équipe : M. Georges Baffet

5. Budget

Subvention accordée (€ TTC) : 197 097 € TTC

Résumé ToxPARK - 2019_1_025

Responsable scientifique : M. Julien Dairou

Organisme : Université Paris Descartes, Laboratoire de Chimie et Biochimie Pharmacologique et Toxicologiques, Equipe Chimie Bio-inorganique - Paris

1. Titre

Projet complet

36 mois

Evaluation de l'impact des pesticides de la famille des carbamates sur l'activité de la protéine PARK7 et sur la voie de glycation

2. Questions à la recherche

PHYTO 2.1 - Dans les conditions réelles d'utilisation des substances : renforcer les connaissances sur les liens avec certaines pathologies, insuffisamment investiguées, notamment les pathologies neuro-développementales telles que l'autisme, les pathologies hormonales en lien avec l'effet perturbateur endocrinien, les effets sur la reproduction de manière générale, les maladies métaboliques, les troubles respiratoires et certains cancers.

ACHIM 1 - Exposition aux contaminants et effets sur les écosystèmes et la santé humaine : milieux aquatiques, approche par compartiment (sol, air, eau...) et effets des mélanges.

3. Résumé

Objectif détaillé

En 2013, la maladie de Parkinson a été officiellement reconnue en France comme une pathologie professionnelle pour les agriculteurs en raison de leur exposition majeure aux produits phytosanitaires. Bien que l'association entre l'exposition à des pesticides agricoles et la maladie de Parkinson a longtemps été un sujet d'étude dans le domaine de la santé environnementale, les données bibliographiques actuelles, ne permettent pas d'identifier clairement les mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu dans ce lien. Une étude épidémiologique récente a estimé l'exposition à 157 pesticides chez la population néerlandaise. Parmi ces pesticides, quatre ont été jugés a priori pertinents quant à un lien de causalité vis à vis de la maladie de Parkinson: le paraquat, le manèbe, le lindane et le bénomyl. Deux d'entre eux (manèbe/bénomyl) sont des carbamates qui sont des composés électrophiles hautement réactifs qui peuvent réagir par modification covalente avec les macromolécules biologiques notamment les résidus cystéines. De plus, le paraquat cible également les résidus cystéines en raison de son activité rédox.

Notre équipe a découvert un nouveau système universel de réparation de la glycation qui repose sur l'enzyme DJ-1 ou PARK7. La glycation est la formation d'une liaison covalente inévitable entre des réducteurs endogènes dérivés du glucose (comme le méthylglyoxal) et certains constituants des protéines et de l'ADN. PARK7 est une déglycase ayant la capacité de réparer les protéines et l'ADN « glyqués » en agissant sur les premiers intermédiaires de glycation et en libérant les protéines et ADN sous forme native. PARK7 joue ainsi un rôle majeur dans les processus d'anti-glycation et dans la prévention de la formation des produits de glycation avancés. Ces produits favorisent l'agrégation de plusieurs protéines dont la protéine α -synucléine dont l'étendue de la glycation est corrélée aux degrés d'atteinte des patients. De plus, PARK7 tire son nom de son implication dans le développement de la maladie de Parkinson car les variants naturels invalidant l'activité PARK7 entraînent une augmentation significative du risque de développer la maladie de Parkinson.

Nos résultats préliminaires montrent que l'exposition à tous les pesticides de la famille des carbamates inhibe de façon irréversible l'activité de PARK7 probablement en agissant sur un résidu cystéine de l'enzyme. Cette inhibition conduit à une forte dérégulation de l'homéostasie de la glycation pouvant permettre le développement de cette affection neurodégénératives.

Notre projet a donc pour but de caractériser la régulation de l'activité de PARK7 par les pesticides de la famille des carbamates et d'en déterminer les mécanismes moléculaires et cellulaires. Ces études permettront

de mieux comprendre les effets biologiques de certains pesticides sur la perturbation de la voie de glycation dont la régulation est déterminante dans la maladie de Parkinson.

Argumentaire de l'originalité et/ou caractère novateur du projet

Dans le développement de la maladie de Parkinson, le stress oxydatif joue un rôle majeur. Le rôle de ce stress dans l'apparition de dommages à l'ADN et/ou de perturbations de certaines voies de signalisation pouvant conduire à une dérégulation de la prolifération ou de la mort cellulaire, ou des altérations du système immunitaire, sont autant de mécanismes susceptibles de sous-tendre les effets des pesticides sur la santé des populations exposées. En revanche, aucuns travaux n'ont porté sur l'étude de la glycation dans un contexte d'exposition aux pesticides or celui-ci peut provoquer les mêmes effets qu'un stress oxydatif. Ce point est un des aspects clés originaux du projet en regard des récentes découvertes sur l'activité PARK7.

Argumentation du choix des questions

Nous proposons l'étude in vitro et ex vivo de la glycation et de l'activité PARK7 dans un contexte d'exposition à des pesticides (mélange relevant sur le plan environnemental). De nombreux paramètres cellulaires seront étudiés en parallèle pour caractériser ceux qui sont le plus dépendants des processus de glycation à l'aide des outils de la plateforme de biologie moléculaire de l'équipe 2. Les résultats préliminaires que nous avons obtenus, montrent une inhibition de l'activité PARK7 avec des concentrations en pesticides du même ordre de grandeur que celles auxquelles les populations sont exposées. Une démarche mécanistique sera entreprise, notamment par des approches structurales.

Description des méthodes mises en œuvre

Le projet repose sur l'utilisation d'approches moléculaires et cellulaires mise en œuvre par les trois partenaires dans le cadre de leurs activités de recherche.

L'équipe 1 qui a mise en évidence l'activité anti-glycation de PARK7 dispose de tous les outils et l'expertise afin de doser PARK7 in vitro et in vivo (cellulaire et tissulaire). Elle fera l'étude de l'inhibition de PARK7 par les pesticides.

L'équipe 2 dont une des expertises reconnues est la toxicologie cellulaire déterminera sur des lignées cellulaires (notamment SHS55Y neuroblastomique d'origine humaine) les effets des pesticides (sélectionnés à partir des résultats in vitro de l'équipe 1) sur la voie de glycation.

En parallèle, l'équipe 3, experte dans la détermination de structures tridimensionnelles par la cristallographie aux rayons X, étudiera à l'échelle moléculaire l'interaction des pesticides avec PARK7 dont nous avons déjà la structure native à 1.6 Å de résolution.

4. Membres participants au projet

Equipe 1 : Université Paris Descartes, Laboratoire de Chimie et Biochimie Pharmacologique et Toxicologiques, Equipe Chimie Bio-inorganique - Paris

Responsable de l'équipe : M. Julien Dairou

Equipe 2 : Université Paris Descartes, T3S-1124 - UMR-S 1124 - Paris

Responsable de l'équipe : M. Xavier Coumoul

Equipe 3 : Université Paris Descartes, T3S-1124 - UMR-S 1124 - Paris

Responsable de l'équipe : M. Pierre Nioche

5. Budget

Subvention accordée (€ TTC) : 199 992 € TTC

Résumé ToxTEM - 2019_1_174

Responsable scientifique : M. Yann Landkocz

Organisme : Université du Littoral Côte d'opale, LPCA – EA 4493, MREI 2, UCEIV-CTEA - Dunkerque

1. Titre

Projet complet

36 mois

Toxicité des particules atmosphériques issues de zones rurale, urbano-industrielle et portuaire et impact sur la transition épithélio-mésenchymateuse des cellules pulmonaires.

2. Questions à la recherche

CANC 5 - Identification et/ou validation de biomarqueurs pour évaluer les risques dans des situations d'exposition environnementales ou professionnelles.

AIRR 1 - Evaluation de l'exposition et des risques afférents aux polluants chimiques dangereux, aux agents pathogènes et aux particules présents dans l'air :

- sur des lieux peu étudiés (commerces, bureaux, moyens de transport),
- sur des zones à proximité de grands axes routiers, de ports, d'aéroports.

3. Résumé

Objectif détaillé

La pollution atmosphérique et les particules fines (PM2.5) ont été classées cancérigène par le Centre International de Recherche sur le Cancer en 2013. Plusieurs mécanismes potentiels ont été proposés pour interpréter les effets néfastes des PM2.5 sur les poumons, parmi lesquels le stress oxydant, les dommages à l'ADN ou la mutagénicité. Cependant, peu d'études mettent l'accent sur la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) en lien avec l'exposition de cellules pulmonaires aux PM2.5. Ce mécanisme, notamment retrouvé lors des processus de progression métastatique observés dans les carcinomes pulmonaires, est caractérisé par une perte de l'adhérence cellule-cellule, une acquisition des marqueurs mésenchymateux et une augmentation de la capacité à dégrader les composants de la matrice extracellulaire.

Les PM2.5 renferment une multitude d'espèces chimiques incluant notamment des espèces ioniques, des éléments métalliques et des composés organiques. Parmi ces derniers, certains sont peu étudiés alors qu'ils pourraient être impliqués dans les effets néfastes observés. Par exemple, les HAP de haut poids moléculaire, les phtalates ou les bisphénols peuvent être retrouvés sur les PM2.5 et sont connus pour leur effet cancérigène et leurs actions sur le système immunitaire ou endocrinien.

Enfin, cette étude s'effectuera dans la région Hauts-de-France, face à l'espace Manche-Mer du Nord qui concentre 20% du trafic maritime mondial et qui est bordée par 2 axes autoroutiers importants.

Ce projet de recherche aura pour objectif de contribuer à une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la toxicité des polluants atmosphériques, notamment ceux faisant intervenir la TEM des cellules pulmonaires exposés à de façon aiguë ou subaiguë, en lien avec une exposition environnementale aux PM2.5 en zone rurale, urbaine, industrielle et sous influence du trafic routier ou maritime.

Argumentaire de l'originalité et/ou caractère novateur du projet

Cette étude permettra la mise en évidence des effets induits par les PM2.5 sur les cellules pulmonaires humaines, en étudiant d'un point de vue mécanistique la TEM rencontrée dans le cancer du poumon. L'analyse aiguë et subaiguë permettra d'identifier des biomarqueurs précoces de risque de cancer. L'originalité réside également dans la considération de composés organiques peu étudiés dans les études de toxicité des PM2.5.

Argumentation du choix des questions

Ce projet, en lien avec l'exposition aux particules fines PM2.5 contribuera à l'évaluation de l'exposition en zone urbano-portuaire et sous influence du trafic routier (AIRR 1). L'étude des effets liés à l'exposition environnementale aux PM2.5 pourra contribuer à l'identification de biomarqueurs permettant d'évaluer les risques (CANC 5).

Description des méthodes mises en œuvre

OBJECTIF 1 : Prélèvement et caractérisation des PM2.5 collectées sous influence rurale, urbaine, industrielle et du trafic maritime ou routier. (années 1 et 2)

1. Prélèvement et caractérisation des PM2.5 (CCM, UCEIV)

Les PM2.5 seront prélevées en région Hauts-de-France. Une caractérisation physico-chimique étendue sera ensuite réalisée. L'analyse de la fraction organique portera notamment sur les composés organiques peu étudiés comme les HAP de haut poids moléculaires, les phtalates et les bisphénols.

2. Conditions d'exposition (UCEIV, P3Cell)

Les conditions d'exposition des cellules bronchiques (HBEC, 16HBE et Beas-2B) et alvéolaires (HSAEC et A549) aux PM2.5 seront définies à partir de test de cytotoxicité, par l'étude de la métabolisation/biotransformation et de la réponse inflammatoire.

OBJECTIF 2 : Etude des effets des PM2.5 sur la transition épithélio-mésenchymateuse (années 2 et 3)

3. Effets aigus des PM2.5 sur la TEM (UCEIV, P3Cell, GHICL)

Exposition des cellules bronchiques et alvéolaires pendant 24 à 72 heures aux PM2.5 dans la gamme non cytotoxique définie précédemment. Des molécules connues pour induire la TEM comme le b(a)p ou la bléomycine seront également utilisées comme contrôles positifs. Les marqueurs épithéliaux et mésenchymateux décrits dans les études sur la TEM seront étudiés au niveau transcriptomique (RT-qPCR) et protéique (western-blot). Une étude en immunohistochimie sera également réalisée ainsi qu'une étude sur la migration et l'invasion cellulaires.

4. Effets subaigus des PM2.5 sur la TEM (UCEIV, P3Cell, GHICL)

Exposition des cellules bronchiques et alvéolaires jusqu'à 28 jours à des doses très faibles de PM2.5 (0 à 0,2 µg/cm²) et mesure des rapports de marqueurs épithéliaux et mésenchymateux précédemment décrits par RT-qPCR, western-blot et immunohistochimie. Une étude de la migration et de l'invasion cellulaires sera également réalisée.

5. Etude des promoteurs et de la régulation épigénétique de la TEM (UCEIV, GENOM'IC)

Etude de l'activation des promoteurs des voies de signalisation de la TEM (TGF-β, AhR, Wnt...) et analyse transcriptomique globale des miARN. Les analyses fonctionnelles seront réalisées grâce au logiciel IPA (Ingenuity Pathway Analysis, Qiagen).

6. Analyses statistiques (UCEIV)

L'analyse statistique permettra de contrôler et valider les résultats expérimentaux. Une analyse multivariée des paramètres mesurés sur différents échantillons de PM2.5 permettra d'identifier les relations existant entre la nature des polluants atmosphériques et les réponses biologiques dont l'induction de la TEM.

4. Membres participants au projet

Equipe 1 : Université du Littoral Côte d'opale, LPCA - EA 4493, MREI 2, UCEIV-CTEA - Dunkerque

Responsable de l'équipe : M. Yann Landkocz

Equipe 2 : Université de Reims Champagne-Ardenne, CHU Maison-Blanche, Inserm UMR-S 1250 - P3Cell - Reims

Responsable de l'équipe : Mme Myriam Polette

Equipe 3 : Université du Littoral Côte d'Opale, Centre Commun de Mesures, MREI1 - Dunkerque

Responsable de l'équipe : M. Fabrice Cazier

Equipe 4 : Institut Pasteur de Lille, Laboratoire de Toxicologie Génétique - Lille

Responsable de l'équipe : M. Pierre Gosset

5. Budget

Subvention accordée (€ TTC) : 199 659 € TTC

Résumé Z-MENACE - 2019_1_128

Responsable scientifique : M. Normand Podechard

Organisme : Université de Rennes 1, Irset - Inserm UMR 1085, Service de Biologie Cellulaire - Rennes

1. Titre

Etude de faisabilité

24 mois

La larve de poisson-zèbre comme modèle d'étude in vivo pour évaluer les effets cocktail de perturbateurs endocriniens sur la progression pathologique des NAFLD

2. Questions à la recherche

ACHIM 6 - Modèles in vitro et in vivo chez l'animal et développement d'indicateurs globaux « d'effets cocktail » pour l'évaluation de la toxicité des mélanges de micropolluants en vue de l'évaluation d'une exposition chronique.

PE 2 - Étude des modes d'action en vue d'identifier une éventuelle perturbation endocrinienne en rapport avec le développement de certaines pathologies, y compris sous l'angle des effets trans/intergénérationnels.

PE 3 - Étude des effets à faibles doses et/ou des effets cocktails.

3. Résumé

Objectif détaillé

Les maladies non-alcooliques du foie (i.e. NAFLD: non-alcoholic fatty liver disease) sont devenues une priorité de santé publique à cause de leur prévalence grandissante (20% de la population générale et plus 70% des personnes obèses). Elles débutent avec la stéatose hépatique (foie gras), stade bénin, qui peut progresser vers la stéatohépatite ou NASH (non-alcoholic steatohepatitis), propice au développement des cirroses et cancers du foie.

Bien que les causes/mécanismes de cette progression pathologique restent à clarifier, l'exposition aux perturbateurs endocriniens (PE) seuls ou mélange, est suspectée. Il apparaît donc urgent de développer de nouveaux modèles permettant de mieux évaluer l'impact des PE sur la santé, en particulier dans les NAFLD.

Etant donné la nature complexe de ces pathologies qui dépendent des interactions étroites entre différents organes et types cellulaires, il est indispensable d'avoir une approche intégrative uniquement retrouvée dans les modèles in vivo. Ainsi, nous mettrons en place une stratégie en deux temps : d'abord un criblage de l'impact sur le foie de l'exposition chronique à des mélanges de PE dans notre modèle de larve de poisson-zèbre avec stéatose (NAFL-ZF) suivi de la confirmation de ces effets dans un modèle murin pertinent. Concrètement, il s'agira d'étudier l'impact sur le foie de 4 PE couramment détectés dans l'air ambiant et l'alimentation : une dioxine (2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine [TCDD]) ; deux plastifiants (bisphénol A [BPA], phtalate de bis(2-éthylhexyle) [DEHP]) ; un pesticide (carbendazime). Ainsi, nous chercherons : 1) à évaluer les effets de chaque PE sur la progression de la stéatose dans la larve de poisson-zèbre; 2) à étudier les effets cocktail d'un mélange à faibles doses; 3) à identifier des marqueurs précoces d'exposition ou d'atteintes du foie (ARNm, remodelage membranaire, métabolisme énergétique) ; 4) à valider ces résultats dans un modèle murin de NASH.

Argumentaire de l'originalité et/ou caractère novateur du projet

Le caractère novateur de ce projet repose sur le choix du modèle pour répondre aux enjeux de la recherche sur les PE notamment dans des populations dites à risque. En effet, la larve de zebrafish a de nombreux avantages : faible coût financier, mise en place rapide des processus physiopathologiques sur organisme entier, sensibilité aux agents chimiques (meilleure prédiction de l'hépatotoxicité que des modèles in vitro humain), criblage moyen/haut débit. De plus, la taille et la transparence des larves seront mises à profit pour identifier des perturbations précoces mitochondriales ou membranaires. Enfin, l'emploi de ce modèle, en accord avec la règle des 3R, peut être une alternative ou un préquel à l'emploi des modèles in vivo de mammifères classiquement utilisés.

Argumentation du choix des questions

Cette étude de faisabilité a pour but de proposer un nouveau modèle in vivo visant à mieux caractériser les effets des PE en mélange sur la progression des NAFLD et ainsi de répondre aux préoccupations concernant leurs potentiels effets cocktails. Pour cela, 4 PE ont été choisis car la population y est couramment exposée et pour garantir les chances de démontrer un effet cocktail. En effet, chacune des molécules (TCDD, BPA, DEHP et carbendazime) est reconnue pour son implication dans les NAFLD. En outre, ces molécules sont issues de familles différentes (polluants organiques persistants, plastifiants et pesticides) impliquant l'activation de mécanismes variés (activation de différents récepteurs nucléaires, stress oxydant...), ce qui pourrait ainsi potentialiser leurs effets lors de mélange. Enfin, le choix du modèle s'est porté sur la larve de poisson-zèbre, dont la sensibilité aux PE a été démontrée et pour lequel nous maîtrisons un modèle développant une stéatose comme l'attestent nos publications sur la mise en évidence d'une transition vers la NASH après exposition à un mélange d'agents hépatotoxiques à faibles doses.

Description des méthodes mises en œuvre

Tout d'abord, des études de survie seront menées dans la larve de poisson-zèbre afin de sélectionner pour chaque PE, deux doses non-létales: une dose forte correspondant aux concentrations décrites pour leurs implications dans les NAFLD, et une dose faible, non-décrite dans les NAFLD mais proche de celle retrouvée chez l'Homme.

Dans un second temps, les effets de l'exposition à ces molécules, seules ou en mélange à faibles doses, sur la transition vers la NASH seront étudiés en évaluant : a) la surcharge hépatique en acides gras (marquage à l'huile rouge), b) les dommages hépatiques en histologie, c) l'expression de gènes de l'inflammation et/ou marqueurs d'hépatotoxicité, d) la mort cellulaire au niveau du foie.

L'étape suivante consistera à identifier des marqueurs précoces d'apparitions de maladies du foie en étudiant 3 axes : a) le métabolisme énergétique (reprogrammation mitochondriale) en utilisant in vivo la technologie « Seahorse », b) le remodelage membranaire par microscopie confocale, c) l'expression de gènes par analyse transcriptomique.

Enfin, la dernière étape visera à confirmer l'impact du mélange choisi dans un modèle murin de NASH. Cela validera l'emploi de la larve de zebrafish comme modèle in vivo sensible et prédictif des effets au niveau du foie d'une exposition à un cocktail de PE.

4. Membres participants au projet

Equipe 1 : Université de Rennes 1, Irset - Inserm UMR 1085, Service de Biologie Cellulaire - Rennes

Responsable de l'équipe : M. Normand Podechard

Equipe 2 : Université de Rennes 1, Irset - Inserm UMR 1085, Service de Biologie Cellulaire - Rennes

Responsable de l'équipe : M. Michel Samson

5. Budget

Subvention accordée (€ TTC) : 49 998 € TTC