

Plan Écophyto II – Appede recherche PNRPE  
Programme « 2016 »  
Écophyto Plan II - Call for research projects PNRPE  
Program "2016"

« ACRONYME ET NOM COMPLET DU PROJET »  
"ACRONYM AND FULL NAME OF THE PROJECT"

**Neo-ITI-2017**

**The integrative study of the effects of neonicotinoides**

L'étude intégrative des effets des néonicotinoïdes

**0 – Références au plan Ecophyto Ecophyto plan references**

Numéro et libellé de l'action Écophyto II dans lequel s'inscrit le projet :

Number and description of the Écophyto II action the project refers to:

**Axe 2 AMELIORER LES CONNAISSANCES ET LES OUTILS POUR DEMAIN ET ENCOURAGER LA RECHERCHE ET L'INNOVATION**

**Axis 2 IMPROVING KNOWLEDGE AND TOOLS FOR TOMORROW AND ENCOURAGING RESEARCH AND INNOVATION**

**Action 8 SUSCITER, ORIENTER ET COORDONNER LES PROJETS DE RECHERCHE POUR FAVORISER LA PLURIDISCIPLINARITE ET LA COOPERATION ENTRE TOUS LES ACTEURS**

**Action 8 FOSTERING, ORIENTING AND COORDINATING RESEARCH PROJECTS TO PROMOTE COOPERATION BETWEEN MULTIDISCIPLINARITY AND COOPERATION BETWEEN ALL PLAYERS**

Responsables du suivi : Céline Couderc-Obert, MEEM/CGDD/SR/Mission risques environnement santé,  
[Sr1.Sr.Dri.Cgdd@developpement-durable.gouv.fr](mailto:Sr1.Sr.Dri.Cgdd@developpement-durable.gouv.fr)

Contact points: Céline Couderc-Obert, Ministry of environment / CGDD / SR / Environmental & health risks unit  
[Sr1.Sr.Dri.Cgdd@developpement-durable.gouv.fr](mailto:Sr1.Sr.Dri.Cgdd@developpement-durable.gouv.fr)

Date de la demande / Date of demand: **02.18.2017**

Mots clefs (5 au maximum) / Key words (5 maximum):

**neonicotinoides, development, transcriptomics, integrative study, endocrine disruption**

**néonicotinoïdes, développement, transcriptomics, étude intégrative, perturbateur endocrinienne**

**1 – Bénéficiaire de la subvention demandée – identité**

**Recipient of the requested grant - identity**

Le bénéficiaire de la convention avec l'ONEMA / Beneficiary from the agreement with ONEMA:

Organisme employeur / Employer organization: Inserm Irset U1085

Représenté par *nom, prénom* / Represented by name, first name: Jégou Bernard

Adresse / Address: 9av de Léon Bernard, Irset/U1085

Téléphone / [Phone number](#): 02 23 23 61 69

Mail / [E-mail address](#): [bernard.jegou@inserm.fr](mailto:bernard.jegou@inserm.fr)

Nom et coordonnées (mail, téléphone, dont portable) du coordinateur scientifique du projet / [Scientific coordinator of the project - contact information \(name, e-mail, phone numbers, including mobile phone number\)](#):

**Fatima Smagulova**, [fatima.smagulova@inserm.fr](mailto:fatima.smagulova@inserm.fr), tel work 0223233662, mobile 0678685603

Nom et coordonnées (mail, téléphone) du correspondant au service juridique / [Contact information of legal department \(name, e-mail, phone number\)](#):

**Marianne Desmedt**, [marianne.desmedt@inserm.fr](mailto:marianne.desmedt@inserm.fr), tel 02 40 35 06 69

Nom et coordonnées (mail, téléphone) du correspondant au service financier / [Contact information of financial service \(name, e-mail, phone number\)](#):

**Estelle Nocchi**, [estelle.nocchi@inserm.fr](mailto:estelle.nocchi@inserm.fr), tel 02 40 20 92 45

Les partenaires du projet (si reversement de tout ou une partie des subventions accordées) :

[Project partners \(if repayment of all or part of the grant\)](#):

Partenaire 1: Environmental Contaminants and Pulmonary Barrier, Irset Inserm U1085, Investigateur principal **Olivier Fardel**

Partenaire 2: Infection, Immunity and Environmental Factors in Liver, Irset Inserm U1085, Investigateur principal **Michel Samson**

Partenaire 3: "Meiosis, epigenetics, recombination" Investigateur principal **Fatima Smagulova**,

Partenaire 4: Transcription, Environment and Cancer, Investigateur principal **Farzad Pakdel**

Partenaire 5: Physiology and Physiopathology of the Urogenital Tract, and Reproduction, Irset Inserm U1085, Investigateur principal **Severine Mazaud-Guittot**

Partenaire 6 : Neuroendocrine effect of endocrine disruptors Irset Inserm U1085, Investigateur principal **Thierry Charlier**

Les modalités de reversement des subventions aux partenaires ci dessus désignés doivent être clairement indiquées dans le plan de financement. / [The terms of repayment of subsidies among the partners designated above must be clearly indicated in the financing plan.](#)

**Nous demandons 180 000 pour 3 ans. 60K par an. 30K par partenaire.**

Nom de l'organisme, adresse, téléphone / mail des structures partenaires faisant l'objet d'un reversement de subvention ONEMA et coordonnées (mail, téléphone) des responsables du projet pour chaque partenaire. / [Name of organization, address, phone number / email of each partner receiving part of the grant from ONEMA and contact information \(email, phone number\) of the project manager for each partner](#)

L'adresse est la même pour toutes les équipes: 9 av Léon Bernard, Rennes 35000

Coordinateur: **Fatima Smagulova**

Partenaire 1: Investigateur principal : **Olivier Fardel**, tel 02 23 23 48 80, e-mail [Olivier.Fardel@univ-rennes1.fr](mailto:Olivier.Fardel@univ-rennes1.fr)

Partenaire 2: Investigateur principal : **Michel Samson** tel 02 23 23 59 27, e-mail [Michel.Samson@univ-rennes1.fr](mailto:Michel.Samson@univ-rennes1.fr)

Partenaire 3: Investigateur principal : **Fatima Smagulova**, tel 02 23 23 36 62, e-mail [fatima.smagulova@inserm.fr](mailto:fatima.smagulova@inserm.fr)

Partenaire 4: Investigateur principal : **Farzad Pakdel** tel 02 23 23 51 32, e-mail [Farzad.Pakdel@univ-rennes1.fr](mailto:Farzad.Pakdel@univ-rennes1.fr)

Partenaire 5: Investigateur principal : **Severine Mazaud-Guittot**, tel 02 23 23 58 86, e-mail severine.mazaud@univ-rennes1.fr

Partenaire 6: Investigateur principal : **Thierry Charlier** tel 02 23 23 41 90, e-mail thierry.charlier@univ-rennes1.fr

## **2 – En bref (résumé pédagogique en français en 5-10 lignes destiné au grand public) / In a nutshell (simple summary in English in 5-10 lines for the general public)**

**Résumé pédagogique en français.** Au cours de la dernière décennie, les insecticides néonicotinoïdes (néonicotinoïdes) ont été utilisés intensivement dans de nombreux pays. Les études chez l'animal suggèrent que les néonicotinoïdes peuvent être toxiques pour le système nerveux et également l'exposition aux néonicotinoïdes favorise la croissance de tumeurs du foie et cause des défauts de reproduction. Puisque l'exposition aux néonicotinoïdes augmente dans de nombreux pays, il est important de révéler tous les effets négatifs possibles associés à l'exposition aux néonicotinoïdes. Précisément, il est important de révéler les capacités de perturbation du system endocrinien de tous les néonicotinoïdes. Dans ce projet, nous utiliserons le modèle de culture cellulaire et le modèle *in vivo* de souris pour déterminer les effets négatifs de l'exposition aux néonicotinoïdes. L'avantage de notre projet est l'étude intégrale avec plusieurs partenaires possédant une solide expertise dans différents domaines.

**Simple summary in English.** Over the past decade, neonicotinoid insecticides (neonics) have been used intensively in many countries. Animal studies suggest that neonics can be toxic for the nervous system and exposure to neonics promotes liver tumor growth and causes reproductive defects. Since the exposure to neonics is increasing in many countries, it is important to reveal all possible negative effects associated to neonics. Specifically, it is important to reveal the endocrine disrupting capacities of all neonics. In this project, we will use both cell culture and *in vivo* mouse model to determine the possible negative effects of neonics exposure. The advantage of our project is the integral study of several partners with strong expertise in different fields.

## **3 – Résumé court du projet (d'une ½ page à 1 page maximum permettant d'avoir une vision globale du projet, des problèmes posés, de ses objectifs, des résultats attendus et de son intérêt pour le plan Écophyto et des partenaires, dans un langage accessible) / Project short summary (half a page to one page maximum to give a global vision of the project, questions asked, objectives, expected results and relevance in the context of the Écophyto plan and for its partners, in a clear accessible language)**

### **Résumé court du projet**

**Contexte.** Les néonicotinoïdes une nouvelle classe d'insecticides, conçus pour remplacer les insecticides organophosphorés très toxiques. L'utilisation des néonicotinoïdes a considérablement augmenté au cours des dernières décennies. De nombreuses études ont identifié des quantités détectables de néonicotinoïdes dans l'environnement. Plusieurs études récentes sur des modèles animaux ont montré que les néonicotinoïdes pouvaient causer des effets indésirables sur de nombreux organes tels que le système nerveux, le foie et les organes de reproduction. En effet, l'exposition aux néonicotinoïdes est associée à des défauts neurologiques et à des malformations congénitales chez l'homme (1). À des doses élevées, les néonicotinoïdes causent des effets graves, semblables à ceux des pesticides organophosphorés, et peuvent même mener à la mort du patient. L'exposition aux néonicotinoïdes est également associée à la disparition de colonies d'abeilles (2). Questions ouvertes. Il est important de noter que le potentiel de perturbation endocrinienne des néonicotinoïdes n'est pas encore connu. Les données expérimentales chez l'animal manquent d'études mécanistiques sur le réseau transcriptionnel des gènes affectés par les néonicotinoïdes. Les données sur les effets spécifiques des néonicotinoïdes sur le cerveau, le foie et les organes reproducteurs, la glande mammaire, les testicules et l'ovaire ne sont pas bien comprises. Il manque également les données des effets de l'exposition pendant le développement embryonnaire. Cette étude est particulièrement importante car l'utilisation de néonicotinoïdes augmente très rapide, donc il y a un besoin immédiat d'évaluer les risques associés à l'exposition aux néonicotinoïdes. **Hypothèse.** Nous supposons que les néonicotinoïdes pourraient être les perturbateurs endocriniens. L'étude intégrative des néonicotinoïdes augmentera la compréhension du risque associé à l'exposition aux néonicotinoïdes et aidera à développer les approches préventives pour réduire leur toxicité. Objectif global. Dans ce projet, nous étudierons les effets des néonicotinoïdes en utilisant des systèmes *in vitro* et des modèles animaux *in vivo*. Notre objectif global est d'identifier la base moléculaire du mécanisme de l'action des néonicotinoïdes pour créer une vue intégrative des effets des

néonicotinoïdes. Dans ce travail, nous utiliserons l'avantage de la technologie de séquençage de l'ARN à haut débit. **Objectifs.** Nous avons plusieurs objectifs dans nos études pour évaluer les effets négatifs possibles des néonicotinoïdes: 1) Évaluer la toxicité relative et les propriétés perturbatrices endocriniennes de 7 néonicotinoïdes sur les lignées cellulaires et au niveau des organes en utilisant un système de culture organotypique de fœtus humains; 2) Évaluer l'impact phénotypique de l'exposition *in vivo* aux néonicotinoïdes au niveau de l'organe en utilisant un modèle de souris mettant l'accent sur les organes endocriniens, les organes de désintoxication et les organes sensibles aux hormones; et 3) évaluer l'impact moléculaire de l'exposition *in vivo* aux néonicotinoïdes sur des organes sélectionnés en utilisant une analyse à haut débit ARN. **Les résultats obtenus.** Nous allons révéler la capacité de perturbation endocrinienne de différents néonicotinoïdes, ce qui est très important pour l'évaluation des risques. L'étude approfondie de l'expression de l'ARN dans plusieurs tissus, le cerveau, le foie, les testicules et la glande mammaire, révélera les mécanismes communs de toxicité néonatale. Notre étude mettra en évidence le risque potentiel de l'utilisation des néonicotinoïdes sous leur forme actuelle dans l'agriculture. La dose quotidienne autorisée pour les néonicotinoïdes pourrait être reconsidérée sur la base de nos données. Nous fournirons nos données aux organismes autorisés pour prendre les bonnes décisions.

#### Short resume in English

**Background.** Neonics are a new class of insecticides, designed to replace the highly toxic organophosphate insecticides. The use of neonics has grown dramatically over the past decades. Many studies have identified detectable levels of neonics in the environment. Several recent studies in animal models showed that neonics could promote adverse effects on many organs such as the nervous system, liver, blood system and reproductive organs. Indeed, exposure to neonics is associated with neurological defects and congenital malformations in human (1). At high doses, neonics cause severe effects, similar to organophosphate pesticides poisoning, and could even lead to patient's death. The exposure of neonics also associates with bee colonies decline (2). **Open questions and missing information.** Importantly, the endocrine disrupting potential of neonicotinoids is not yet known. Animal data are lacking mechanistic studies such as finding the transcriptional network of genes affected by neonics. The data of the specific effects of neonics on brain, liver and reproductive organs, mammary gland, testis and ovary are not well understood. It is also missing the data of the effects of embryonic development exposure of neonics. This study is particularly important, as the use of neonics is increasing extremely fast, so there is immediate urge to assess the risks associated with neonics exposure. **Hypothesis.** We hypothesize that neonics could behave as endocrine disrupting compounds (EDCs). The integrative study of neonics will greatly increase the understanding the risk associated with neonics and will help to develop the preventive approaches to reduce the neonics toxicity. **Goal.** In this project we will investigate the effects of neonicotinoides using *in vitro* and animal model systems. Our global aim is to identify the molecular basis of mechanism of neonics action to create an integrative view of the effects of neonics. In this work we will use the advantage of high throughput RNA-sequencing technology.

**Objectives.** We have several objectives in our studies to assess the possible negative effects of neonics: 1) Evaluate/screen the relative toxicity and endocrine disrupting properties of 7 neonics on cell lines, and at the organ level by using a system of organotypic culture of human fetal testes; 2) Evaluate the phenotypic impact of *in vivo* exposure to neonics at the organ level by using mouse model with a focus on endocrine organs, organs of detoxification and organs sensitive to hormones; and 3) Evaluate the molecular impact of *in vitro* and *in vivo* exposure to neonics on selected organs by using high throughput RNA analysis. **The obtained results.** We will reveal the endocrine disrupting capacity of different neonics, which is very important for a risk assessment. The deep study of RNA expression in several tissue, brain, liver, testis and mammary gland will reveal the common mechanisms of neonics toxicity. Our study will reveal the potential risk of the neonicotinoides use at the present form in agriculture. The current daily authorized dose for neonicotinoides could be reconsidered based on our data. We will provide our data to authorized organs to make the correct decisions.

#### 4 – Contexte général et enjeux scientifiques et techniques (domaine concerné, problème posé) / Background and scientific and technical issues (nature of the scientific field and the question asked by the project)

##### Introduction

Bien que les pesticides persistent dans l'environnement, leur application augmente constamment

chaque année dans le monde entier. L'exposition continue aux pesticides présente des effets néfastes sur les systèmes physiologiques du corps humain et crée des menaces pour le système écologique. **Les néonicotinoïdes constituent une classe relativement nouvelle de pesticides**, conçue pour remplacer les pesticides organophosphorés hautement toxiques. Ils sont maintenant enregistrés dans plus de 120 pays et sont largement utilisés pour le traitement des semences, des sols et des plantes (3). La famille des néonicotinoïdes comprend 7 composés, incluant *l'acétamipride*, la *clothianidine*, *l'imidaclopride*, le *nitentpyram*, la *nithiazine*, le *thiaclopride* et le *thiaméthoxame*. *L'imidaclopride* et le *thiaméthoxame* sont les néonicotinoïdes les plus utilisés. Les néonicotinoïdes ont été trouvés dans le sol, la poussière, les eaux souterraines et les aliments. Une étude quantitative récente de la mesure des néonicotinoïdes aux États-Unis a montré que presque tous les échantillons de fruits et de légumes étaient positifs pour au moins un néonicotinoïde, *l'imidaclopride* ayant le taux de détection le plus élevé parmi tous les échantillons (4). Les néonicotinoïdes ne peuvent pas être facilement éliminés, de sorte que les humains sont exposés aux néonicotinoïdes à chaque fois qu'ils consomment des légumes ou des fruits. Dans les expériences utilisant un modèle animal, il a été démontré que les néonicotinoïdes, tels que *l'imidaclopride*, la *clothianidine* et le *dinoteruran*, ont une demi-vie biologique courte et peuvent être excrétés dans l'urine (5). Une certaine quantité de néonicotinoïdes est excrétée non métabolisée (de 19 à 55%) (5). Les métabolites et les composés parentaux sont détectables dans des échantillons urinaires en chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse. Il existe une grande diversité de sites de biodégradation et de multiples voies de métabolisme des néonicotinoïdes. Les métabolites peuvent être aussi actifs que les agonistes nicotiques et pourraient servir d'inhibiteurs inductibles de l'oxyde nitrique synthase (5) et affecter ainsi de nombreux processus cellulaires.

**Détection des néonicotinoïdes chez l'Homme.** La Commission japonaise de la sécurité alimentaire a estimé que les japonais consommaient environ 1050 µg / jour d'*acétamipride*, 206 µg / jour de *clothianidine*, 713 µg / jour de *dinoterurane*, 307 µg / jour d'*imidaclopride* et 265 µg / jour de *thiaméthoxame* (6). Ce sont d'énormes quantités de pesticides!

Normalement, les néonicotinoïdes et leurs métabolites sont excrétés dans l'urine chez l'Homme. Dans des expériences d'absorption volontaire de néonicotinoïdes, il a été montré que la *clothianidine* est récupérée inchangée, alors que 90% de *l'imidaclopride* sont métabolisés chez l'Homme, puisque seulement 10% de *l'imidaclopride* consommée est détectée dans les urines.

**Toxicité et perturbation endocrinienne des néonicotinoïdes chez les animaux.** Les néonicotinoïdes sont conçus pour agir sur les récepteurs nicotiques chez les insectes et ne sont pas supposés être toxiques pour les vertébrés. Cependant, les néonicotinoïdes sont capables de se lier aux récepteurs cholinergiques chez les mammifères, notamment  $\alpha 2\beta 4$ . Les effets des néonicotinoïdes sont semblables aux effets causés par la nicotine, mais à des concentrations plus élevées. Ces effets comprennent la tachycardie, l'hypertension, l'hypotension, la nausée, les vomissements, les maux de tête, les douleurs abdominales, la diarrhée, les étourdissements, la faiblesse musculaire et la fièvre (7,8). À fortes doses, des effets plus graves, comme l'insuffisance respiratoire, la sédation, des attaques et le décès ont été signalés (9-11). Les récepteurs cholinergiques ont une importance cruciale pour la fonction du cerveau humain. La dérégulation de la fonction de ce récepteur joue un rôle dans plusieurs troubles du système nerveux central, y compris la maladie d'Alzheimer (12), la maladie de Parkinson (13) et la dépression (14). Chez les mammifères, les récepteurs nicotiques de l'acétylcholine sont situés dans les systèmes nerveux central et périphérique. En plus du système nerveux, les néonicotinoïdes affectent également la fonction de reproduction. Par exemple, les rats exposés par voie orale à *l'imidaclopride* à une dose de 1 mg / kg / jour pendant 65 jours présentent des anomalies graves dans la morphologie des spermatozoïdes et un déséquilibre des hormones sexuelles, ce qui suggère des effets perturbateurs endocriniens possibles de *l'imidaclopride* (15). L'exposition à *l'imidaclopride* provoque également des dommages à l'ADN dans les testicules (15). Chez les animaux exposés, l'activité des gènes de la voie de la stéroïgénèse (sous-famille des récepteurs nucléaires 5, groupe A, membre 1 et  $3\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase) est diminuée dans les testicules, suggérant que les néonicotinoïdes peuvent modifier la fonction endocrinienne (15). Les effets néfastes des néonicotinoïdes sur la reproduction ont aussi été détectés chez les oiseaux: les cailles mâles exposées à la *clothianidine* ont de l'ADN fragmenté dans les tubules séminifères (16). Les œufs d'oiseaux exposés ne parviennent pas à se développer (16). En utilisant l'exposition directe des spermatozoïdes, il a été démontré que la capacité de fertilisation des spermatozoïdes traités est diminuée (17). Les néonicotinoïdes affectent le système sanguin: l'exposition chronique de souris à *l'imidaclopride* pendant 28 jours conduit à des effets immunosuppresseurs (18). L'exposition aux néonicotinoïdes est toxique pour le foie chez la souris: l'exposition chronique (18 mois) de souris au *thiaméthoxame* provoque une augmentation de l'incidence des tumeurs hépatiques à une concentration de 500 à 2500 ppm (19). Les dommages au niveau du foie pourraient conduire à une

diminution de la fonction de détoxification et conduire à la toxicité des néonicotinoïdes sur d'autres organes. Les mêmes auteurs ont suggéré que la raison de la toxicité du *thiaméthoxame* pourrait être due à la formation de formaldéhyde dans le métabolisme du *thiaméthoxame* (20). L'exposition aux néonicotinoïdes affecte également le métabolisme du glucose. Chez les souris consanguines, un traitement à l'*imidaclopride* combiné avec un régime alimentaire à forte teneur en matière grasse a entraîné un gain de poids corporel, une adiposité et un métabolisme amoindri du glucose (21). Contrairement aux études chez les adultes, les données sur l'exposition embryonnaire sont très limitées. Une étude récente a montré des effets négatifs de l'exposition à l'*imidaclopride* sur le développement de l'embryon de poulet. Les embryons de poulet exposés à l'*imidaclopride* développent un risque accru de défauts de tube neural et de dysplasie neurale (22).

**Toxicité des néonicotinoïdes chez l'homme.** Une revue récente a résumé 3 études d'exposition aiguë et 4 études chroniques (1). Dans une plus grande cohorte d'exposition aiguë aux néonicotinoïdes, Forrester (8) a montré que dans une cohorte de 1142 personnes, 77% ont été exposés à l'*imidaclopride*. De toutes les personnes exposées, 3% (32 patients) ont des résultats médicaux graves comme l'irritation oculaire, l'érythème, l'éruption cutanée, l'engourdissement et les étourdissements. Les enfants nés de femmes enceintes chroniquement exposées aux néonicotinoïdes ont un taux accru d'incidence de Tétralogie de Fallot (2,4%). La tétralogie de Fallot est un syndrome combinant de multiples défauts cardiaques, y compris les défauts de l'aorte et de septum. Une corrélation entre la présence de métabolites urinaires de l'*imidaclopride* et les symptômes neurologiques chez les patients a également été soulignée (23). A notre connaissance, aucune information sur le potentiel de perturbation endocrinienne des néonicotinoïdes n'a été décrite chez l'Homme, que ce soit des évidences de modification du risque d'hypospadias, de cryptorchidie ou de modification de la distance anogénitale (AGD).

**Questions ouvertes.** Il est important de noter que le potentiel perturbateur endocrinien des néonicotinoïdes n'est pas encore connu. Les données sur les modèles animaux ont montré que les néonicotinoïdes pourraient cibler de nombreux tissus. Ces constatations soulèvent la question de la sécurité de l'utilisation des néonicotinoïdes. En dépit de certains progrès, il existe encore un manque d'informations sur les mécanismes moléculaires impliqués dans la toxicité des néonicotinoïdes. Les données sur les réseaux de transcription des gènes affectés par les néonicotinoïdes ne sont pas identifiées. Des études récentes ont montré que le développement embryonnaire est particulièrement vulnérable à l'exposition aux pesticides, car elle pourrait entraîner de graves problèmes à l'âge adulte. Le développement embryonnaire nécessite une reprogrammation globale du génome, de sorte que l'exposition à tout stade de développement pourrait conduire à un changement global du réseau d'expression des gènes. L'exposition au cours du développement pourrait affecter les gènes contrôlant la fonction endocrinienne, tels que la synthèse hormonale, le métabolisme et la régulation, et contribuer ainsi à la perturbation endocrinienne chez les adultes. **Hypothèse de travail.** Nous formulons l'hypothèse que les néonicotinoïdes pourraient se comporter comme des perturbateurs endocriniens (PE). Nous proposons une étude intégrative de l'effet des néonicotinoïdes qui devrait augmenter grandement la compréhension du risque associé aux néonicotinoïdes et aider à développer les approches préventives pour réduire leur éventuelle toxicité. **Objectif.** Dans ce projet, nous étudierons les effets des néonicotinoïdes en utilisant des systèmes *in vitro* et des modèles animaux. Notre objectif global est d'identifier les bases moléculaires du mécanisme de l'action des néonicotinoïdes pour créer une vision intégrée de leurs effets. Afin d'évaluer les possibles effets délétères des néonicotinoïdes, nous avons plusieurs sous-objectifs : 1) Évaluer / tester la toxicité relative et les propriétés de perturbation endocrinienne de 7 néonicotinoïdes sur des lignées cellulaires et au niveau des organes en utilisant un système de culture organotypique de testicules fœtaux humains; 2) Évaluer l'impact phénotypique de l'exposition *in vivo* aux néonicotinoïdes au niveau des organes en utilisant un modèle de souris, en mettant l'accent sur les organes endocrines, les organes de désintoxication et les organes sensibles aux hormones; et 3) Évaluer l'impact moléculaire de l'exposition *in vitro* et *in vivo* aux néonicotinoïdes sur certains organes en utilisant des analyses d'ARN à haut débit.

## 5 – Le projet concerné (descriptif du contenu du projet) / The project (content description)

Description détaillée des objectifs poursuivis (1 page maxi) / Detailed description of the objectives (max 1 page)

**1) Évaluer / détecter la toxicité relative et / ou les propriétés de perturbation endocrinienne de 7 néonicotinoïdes sur les lignées cellulaires et au niveau de l'organe en utilisant un modèle de culture organotypique de testicules fœtaux humains.**

Tout d'abord, nous chercherons à dépister les effets toxiques et de perturbation endocrinienne des néonicotinoïdes sur des systèmes cellulaires ou organiques simples. Nous allons évaluer le potentiel de perturbation endocrinienne de chaque néonicotinoïde en utilisant une lignée cellulaire stéroïdogène. Étant donné que plusieurs PE sont connus pour influencer la viabilité cellulaire, et modifier ainsi leur sensibilité aux hormones ou leurs capacités endocrines, nous souhaitons déterminer si les néonicotinoïdes pourraient influencer la croissance cellulaire, la différenciation, le métabolisme xénobiotique et le stress oxydatif sur les lignées cellulaires. Les PE peuvent exercer leur perturbation endocrinienne grâce à leur capacité à imiter les activités hormonales (œstrogènes, androgènes ou autres) et à exercer des effets indésirables grâce à la liaison et à l'activation des récepteurs des hormones stéroïdiennes (ER, AR) ou des hydrocarbures aryliques, AhR. L'inhibition de l'activité des transporteurs de médicaments membranaires qui manipulent des hormones est également susceptible de contribuer aux effets des PE. Nous prévoyons de déterminer la capacité des néonicotinoïdes à lier et à activer les récepteurs hormonaux. En outre, étant donné que plusieurs PE agissent en modifiant la capacité des cellules ou de l'organe à produire des hormones, il est pertinent d'examiner la capacité des néonicotinoïdes à modifier la sécrétion d'hormones en utilisant des lignées cellulaires stéroïdogènes et également au niveau d'organes stéroïdogènes, en utilisant la culture de testicules fœtaux humains. Enfin, nous analyserons les effets inhibiteurs potentiels des néonicotinoïdes sur les principaux transporteurs de médicaments (ATP-binding cassette/ABC and solute carrier/SLC transporters) impliqués dans des passages hormonaux à travers les membranes. Des conséquences sur la pharmacocinétique cellulaire et l'activité d'hormones seront par conséquent déterminées.

**2) Évaluer l'impact phénotypique d'une exposition *in vivo* aux néonicotinoïdes au niveau des organes en utilisant un modèle de souris, en mettant l'accent sur les organes endocrines, les organes de désintoxication et les organes sensibles aux hormones.**

Dans le modèle animal, nous utiliserons les méthodes classiques d'analyse des effets des PE tels que les coupes histologiques avec l'analyse de marqueurs spécifiques. Nous intégrerons toutes nos données sur plusieurs organes clés après exposition *in vivo* de souris aux néonicotinoïdes pour enquêter sur les voies communes ou les connexions entre l'exposition dans un organe et les effets et la pathologie dans un autre. Les organes examinés comprendront les organes impliqués dans la détoxification xénobiotique (foie), ainsi que les organes endocriniens (testicules et ovaires) et les organes ciblés par les hormones (cerveau, glandes mammaires). Nous effectuerons l'analyse des protéines essentielles associées aux lésions de l'ADN et au cycle cellulaire dans chaque organe. L'expression des gènes impliqués dans le réseau de transcription du récepteur de l'acétylcholine sera vérifiée dans tous les tissus étudiés.

**3) Évaluer l'impact moléculaire de l'exposition *in vivo* aux néonicotinoïdes sur plusieurs organes en utilisant l'analyse de l'ARN à haut débit.**

Nous effectuerons l'analyse de l'expression de l'ARN à l'échelle du génome à l'aide de techniques de séquençage des ARNs. Pour ce faire, l'analyse sera effectuée dans le foie, les testicules, les cerveaux et les glandes mammaires. Cette étude nous permettra de révéler les changements du mécanisme moléculaire chez les souris adultes exposées aux néonicotinoïdes pendant leur développement et révéler les voies potentielles et le réseau de gènes altéré par les néonicotinoïdes.

Nous utiliserons l'avantage des technologies de séquençage pour l'analyse de l'expression de l'ARN. Les gènes identifiés différemment exprimés seront annotés fonctionnellement et les voies communes et les réseaux de transcription affectés par les néonicotinoïdes seront découverts. Nous analyserons également le niveau d'expression de certains gènes essentiels: plusieurs tissus pour révéler le mécanisme commun, imposé par l'exposition des néonicotinoïdes.

Originalité et caractère novateur du projet (0.5 page maxi) / [Originality and innovative / pionnering nature of the project \(max 0.5 page\)](#)

L'objectif du présent projet est de construire une vision intégrée de l'exposition aux néonicotinoïdes avec un accent mis sur le potentiel de perturbateur endocrinien des néonicotinoïdes. L'étude phénotypique de l'action des néonicotinoïdes sera complétée par l'analyse séquentielle de l'ARN à haut débit. Cette démarche intégrative de l'évaluation de la toxicité des néonicotinoïdes sera importante et critique pour l'évaluation des risques. L'étude de l'exposition au cours de phases critiques du développement embryonnaire est essentielle en raison du manque d'information dans la littérature et du besoin immédiat de ces connaissances. Ce projet tire sa richesse de la combinaison entre différentes expertises combinées d'analyse des effets phénotypiques avec l'étude mécanistique des effets cellulaires de différents systèmes corporels majeurs. Nous utiliserons l'opportunité unique de la coopération de nombreuses équipes de premier plan de l'Institut national de la santé et de la recherche médicale de santé français pour conduire cette nouvelle étude. L'étude approfondie du phénotype cellulaire et de la morphologie au niveau moléculaire de l'analyse transcriptomique de l'ARN dans plusieurs tissus sera novatrice et ouvrira d'autres possibilités pour une collaboration fructueuse entre plusieurs équipes afin d'investiguer les impacts des facteurs environnementaux sur la santé humaine. De plus, l'utilisation des tissus murins par plusieurs équipes permet de réduire le coût des expériences et de synchroniser les efforts pour atteindre l'objectif scientifique.

Intérêt pour le plan Écophyto (0.5 page maxi) / [Interest in view of the Écophyto Plan \(0.5 page maximum\)](#)

*Une vigilance particulière doit être portée à la rédaction de cette partie pour montrer l'intérêt et les apports prévisibles du projet de recherche pour les acteurs du plan Écophyto II et notamment pour ses objectifs de réduction de l'usage des produits phytopharmaceutiques et des risques liés. Cette partie intégrera une analyse des enjeux et intérêts du projet pour le plan Écophyto II et ses objectifs de réduction de l'usage des produits phytopharmaceutiques et des risques liés, et/ou le lien éventuel avec les enjeux réglementaires. / Particular attention must be paid to the drafting of this part to show the interest and expected contributions of the research project for the Écophyto II plan stakeholders, including its use to reduce the use and associated risks of plant protection products. This part will include an analysis of the issues and interests of the project for the Écophyto II plan and its objectives of reducing the use of associated risks of plant protection products and / or a possible link with regulatory issues.*

L'objectif global de notre projet est d'analyser l'impact des néonicotinoïdes sur plusieurs organes. Nous évaluerons les effets dose-dépendants des néonicotinoïdes et nous évaluerons les risques potentiels. Nous chercherons à identifier les éventuels problèmes de santé et nous informerons les agriculteurs et les travailleurs afin d'optimiser leur protection et limiter l'utilisation des néonicotinoïdes par les femmes enceintes et estimeront ce risque pour le programme de développement fœtal.

Notre volonté est d'informer, le cas échéant, les personnes impliquées dans la distribution des néonicotinoïdes, mais aussi les fabricants à qui nous enverrons une lettre présentant une analyse détaillée de nos recherches. Il est important d'éviter que les travailleurs ne soient continuellement exposés aux risques potentiels. Cette étude fournira également des données sur le potentiel perturbateur endocrinien des néonicotinoïdes afin de pouvoir prendre des décisions appropriées et éclairées en matière d'utilisation des néonicotinoïdes en France. Les résultats obtenus aideront si nécessaire à reconsidérer la dose autorisée journalière actuelle pour les pigments de néon. Nous fournirons nos données aux autorités gouvernementales pour prendre les bonnes décisions.

Structuration du projet et méthodologie mise en œuvre : / [Project structure and methodology:](#)

*Présentation des tâches à mettre en œuvre / [Different tasks to implement](#)*

*Il comprendra un tableau synthétique représentant l'échéancier de l'action de recherche et un tableau de synthèse des tâches : présentation de l'articulation entre les différentes tâches et livrables si possible sous la forme d'un diagramme de Gantt indiquant le cas échéant par tâche le nom du responsable de l'opération, la structure dont il dépend et les partenaires impliqués. L'échéancier inclut notamment un point d'étape de remise d'un rapport intermédiaire (sauf pour les projets exploratoires) et un point de*



remise du rapport scientifique ou technique final. L'évaluation de ces rapports est faite par le CSO RI en lien avec le responsable de suivi Écophyto II pour l'administration. / This part will include a summary table showing the timing of the actions and a summary table of tasks showing the articulation between the different deliverables (if possible in the form of a Gantt chart, indicating for each the name of the head of the operation, the structure in charge and the partners involved). The schedule will include the submission of a middle-way report (except for exploratory projects) and of a final scientific or technical report. The evaluation of these reports will be handled by the CSO R&I in connection with the person in charge of the Écophyto II plan follow-up for the ministry.

Coordinateur	Partenaire impliqué	Tâche	1 <sup>ère</sup> année (1-6m) (7-12m)		2 <sup>ème</sup> année (13-18m) (19-24m)		3 <sup>ème</sup> année (25-30m) (31-36m)	
Farzad Pakdel	1, 4	Tâche 1. Evaluation de la toxicité relative et des propriétés endocrines des néonicotinoïdes vitro et ex vivo	→					
Fatima Smagulova	2,3,4,5,6	Tâche 2. Evaluation de l'impact d'une exposition embryonnaire aux néonicotinoïdes sur les souris prépubaire et adultes		→				
Fatima Smagulova	2,3,4,5,6	Tâche 3. Evaluation de l'impact des néonicotinoïdes sur les niveaux de transcription			→			

Notre projet est subdivisé en 4 tâches de recherche:

#### Tâche 0. Direction du projet

**Objectifs:** F. Smagulova (CR1 Inserm, chef d'équipe Atip-Avenir) coordonnera le programme de travail, identifiera les problèmes et encouragera la communication entre les membres, sera impliquée dans la gestion des autorisations légales pour les expériences sur les échantillons d'animaux, sera responsable de l'organisation des réunions et assurera la communication régulière entre les membres de l'équipe du projet.

**Méthodes:** La coordination sera basée sur les discussions entre le coordinateur du projet et les chercheurs au moins mensuellement. En outre, le coordinateur du projet organisera des réunions trimestrielles rassemblant les chercheurs du projet. Ces réunions auront pour but de discuter de l'avancement des travaux, d'aborder les résultats et les étapes marquantes, et d'aider à prendre des décisions tout au long du projet.

## Tâche 1. Evaluation de la toxicité relative et des propriétés endocrines des néonicotinoïdes in vitro et in vivo.

Coordinateur de tâche: Farzad Pakdel

### Objectifs spécifiques:

Nous étudierons les effets de perturbation endocrinienne des néonicotinoïdes. Pour cela, nous analyserons différents points, notamment la possibilité pour les néonicotinoïdes d'avoir des activités hormones-like (activités estrogéniques, androgéniques ou autre) et d'exercer des effets délétères en se liant et activant des récepteurs pour les hormones stéroïdiennes (ER, AR) ou aux hydrocarbures aromatiques polycycliques (AhR). Nous déterminerons si les néonicotinoïdes peuvent altérer le fonctionnement des cellules endocriniennes en modifiant l'activité des transporteurs membranaires prenant en charge les hormones. Nous analyserons aussi les effets indirects de perturbation endocrinienne, notamment en étudiant l'expression de gènes hormono-sensibles impliqués dans la prolifération et la différenciation cellulaire. L'activité d'enzymes (cytochromes P-450) intervenant dans la biosynthèse et le métabolisme du cholestérol sera également caractérisée, en tant que reflet du fonctionnement normal du système endocrinien. Nous évaluerons enfin les effets potentiels de perturbation endocrinienne des néonicotinoïdes sur le testicule foetal humain.

Tâche 1a. Impact des propriétés de perturbation endocriniennes des néonicotinoïdes et de leur toxicité au niveau cellulaire. neonic endocrine disrupting potential and toxicity at the cellular level

Partenaires impliqués: F. Pakdel, O. Fardel:

### Stratégie expérimentale/matériels et méthodes

Nous examinerons les effets endocriniens des composés néonicotinoïdes en utilisant une lignée cellulaire stéroïdogène (H295R). Nous évaluerons le potentiel de perturbation endocrinienne de 7 composés différents en mesurant le niveau hormonal. En outre, nous vérifierons la capacité des composés néonicotinoïdes à mimer les activités hormonales (œstrogènes, androgènes ou autres) et à exercer des effets néfastes à travers la liaison et l'activation des récepteurs des hormones stéroïdiennes (ER, AR) ou des récepteurs des hydrocarbures aromatiques (AhR). Nous utiliserons des lignées cellulaires mammaires humaines (MCF-7, T47D, MCF-10A) pour analyser les effets des néonicotinoïdes sur le phénotypiques cellulaire et sur l'expression des gènes impliqués dans la croissance cellulaire, la différenciation, le métabolisme des xénobiotiques et le stress oxydatif. À cette fin, nous analyserons les capacités de liaison de ces composés aux différents récepteurs par des expériences de déplacement de liaison de ligands tritiés et nous étudierons leur impact sur les fonctions de transactivation de ER, AR ou AhR à l'aide de gènes rapporteurs de type luciférase sous le contrôle d'éléments de réponse aux androgènes, aux œstrogènes ou à la dioxine (ARE-Luc, ERE-Luc, XRE). Ces expériences seront réalisées dans des cellules exprimant AR et ER. Par ailleurs, nous analyserons l'impact des néonicotinoïdes sur l'expression des gènes endogènes cibles de AR et ER, impliqués dans la prolifération cellulaire, la différenciation et l'apoptose. En utilisant ces modèles cellulaires, l'activité transcriptionnelle de plusieurs gènes cibles des androgènes, de l'oestradiol et de la dioxine sera examinée. Nous réaliserons également des approches cellulaires classiques telles que la microscopie photonique et à d'épifluorescence, des tests MTT (3,4,5-diméthylthiazol-2-yl) -2,5-diphényltétrazolium) ou d'incorporation du BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine) afin de mesurer la différenciation cellulaire, la prolifération et l'apoptose. Par des expériences de RT-PCR en temps réel et d'immunoblot, nous évaluerons les effets des néonicotinoïdes sur l'expression de gènes endogènes impliqués dans la croissance cellulaire (FOXM1, cycline D1, PCNA), la détoxification cellulaire (CYPA1 et CYPB1) ainsi que les gènes répondant au stress oxydatif (NRF2, HO-1, SOD, GPX).

Nous analyserons également le transport des néonicotinoïdes à travers la membrane plasmique à l'aide de drogues spécifiques de transporteurs. Pour ce faire, nous utiliserons des lignées cellulaires surexprimant les transporteurs de drogue suivants: les transporteurs ABC comme la glycoprotéine P10, la protéine de résistance aux multidrogues 2 et la protéine de résistance au cancer du sein, et les transporteurs SLC comme les transporteurs de cations organiques 1, 2 et 3, les transporteurs d'extrusion de multidrogues et de toxine 1 et 2K, le polypeptide transporteurs d'anions organiques 1B1, 1B3 et 2A1 et les transporteurs d'anions organiques 1 et 3. Un effet dose des néonicotinoïdes sur le transport des substrats de référence du transporteur testé sera réalisé et étudié (valeur IC50, mécanisme d'inhibition entre autres) en utilisant des analyses radiométriques et de fluorescences, comme précédemment décrit pour l'étude des interactions des pesticides pyréthroïdes et les bisphénols EDC avec les transporteurs de drogues (24,25). Les conséquences sur la pharmacocinétique cellulaire et les effets des hormones (l'estrone-3-sulfate sera

utilisé comme référence pour les hormones stéroïdiennes et de la dopamine en tant que catécholamine de référence) seront ensuite analysées en utilisant notamment des cellules sensibles aux hormones (lignées cellulaires mammaires pour les œstrogènes et la lignée SH-SY5Y pour la dopamine). Ces études mécanistiques dans différents modèles cellulaires permettront de clarifier si les effets des néonicotinoïdes sont directement médiés par la signalisation de type ER / AR / AhR ou, par d'autres cibles cellulaires qui devraient être identifiées par une analyse globale à l'échelle du génome.

#### Tâche 1b. Impact de néonicotinoïdes sélectionnés sur les capacités endocrines d'explants testiculaires fœtaux humains.

Partenaires impliqués: Partenaire 5 S. Mazaud Guittot

##### Stratégie expérimentale / matériel et méthodes

Afin d'évaluer l'impact des néonicotinoïdes sur les capacités endocrines à l'échelle de l'organe, nous profiterons de notre expertise en culture organotypique de testicules foetaux humains qui ont déjà été utilisés pour l'étude des effets de médicaments (paracétamol et anti-inflammatoires non stéroïdiens) (Mazaud-Guittot et al. 2013) ainsi que du bisphénol A (Ben Maamar et al. 2015).

Les produits d'avortement humains du premier trimestre de grossesse seront collectés régulièrement grâce à une collaboration avec l'hôpital de Rennes avec le consentement éclairé et écrit des mères (autorisation de l'Agence de la Biomédecine n° PFS09-011). Les testicules récupérés des produits d'aspiration de l'avortement à l'aide d'une loupe binoculaire (Olympus SZX7, Lille, France) seront immédiatement placés dans un tampon phosphate (PBS) refroidi. Les testicules seront coupés en explants inférieurs à 1 mm<sup>3</sup> selon un protocole standardisé, comme précédemment décrit (Mazaud-Guittot et al., 2013, Ben Maamar et al., 2015). Les explants seront cultivés dans des inserts (0,4 µm pores, Falcon, Becton-Dickinson, Le Pont de Claix, France) placés dans des plaques de culture de 24 puits (Becton-Dickinson). L'hormone chorionique gonadotrophique humaine (hCG, Sigma Aldrich, Saint-Quentin, France) sera ajoutée à une concentration de 0,1 UI / ml pour maintenir la production de stéroïdes et les cultures seront incubées à 37 ° C pendant 96 h dans une atmosphère humidifiée de 95% d'air et 5 % de CO<sub>2</sub>. Les testicules seront cultivés dans un milieu complet pendant 24h et ensuite exposés aux traitements pendant 3 jours consécutifs, avec un changement du milieu toutes les 24h. Le milieu sera enlevé toutes les 24 h et divisé en au moins 2 aliquotes qui seront immédiatement congelées sur de la glace carbonique et conservées à -80°C. Les explants seront cultivés avec différentes concentrations de néonicotinoïdes ou de leur solvant comme contrôle. L'intégrité du testicule après les traitements sera évaluée par des outils classiques d'histologie et d'immunohistochimie et les capacités endocriniennes par la mesure des niveaux de testostérone, du facteur 3 de l'insuline (INSL3) et de l'hormone anti-müllerienne (AMH), reflétant les capacités endocrines des cellules de Leydig et de Sertoli.

#### Task 1 deliverables

October 2017-October2018

#### Tâche 2. Évaluation de l'impact de l'exposition embryonnaire sur les néonicotinoïdes sur les souris prépubertaires

Coordinateur de tâche : F. Smagulova

##### Objectives spécifiques:

L'étude in vivo vise à déterminer l'action des néonicotinoïdes sur un organisme complet où tous les organes sont connectés et les effets peuvent être plus complexes que dans un système simplifié invitro. Dans les études toxicologiques, il existe deux modèles classiques, souris et rat. La comparaison des principales voies métaboliques du néonicotinoïde à l'aide des extraits de souris, de rat et de foie humain a montré que les niveaux métaboliques chez l'homme et la souris sont plus faibles que chez le rat, suggérant que le modèle de souris pourrait mieux refléter les effets des néonicotinoïdes (26). Par conséquent, le modèle de la souris sera préféré au rat. Toutes les procédures animales seront effectuées conformément au «Guide pour le soin et l'utilisation des animaux de laboratoire» et le protocole sera soumis pour approbation par MESR avant que les expériences ne commencent. Des études sur les animaux seront réalisées avec des souris exogames CD 1. En effet, cette souche est largement utilisée dans les études toxicologiques, de sorte que le grand nombre de données, y compris les études de séquençage à l'échelle

du génome, sont disponibles. En plus, les souris exogames sont un meilleur modèle pour les humains par rapport aux modèles consanguins en raison de leur diversité génomique.

## Task 2a. Détermination de la dose minimale avec effet observable

*artenaire*s impliqués: F. Smagulova, S. Farzad Pakdel, S. Mazaud Guittot, M Samson, T. Charlier

### Stratégie expérimentale / matériel et méthodes

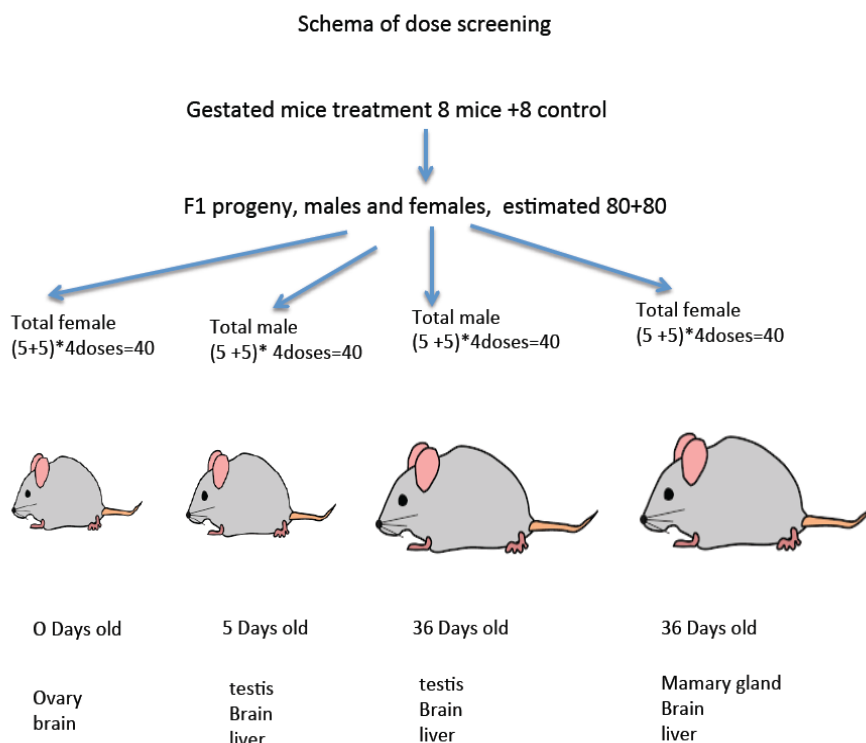
Nous traiterons les souris en gestation depuis fécondation jusqu'à la naissance (21 jours) et les organes reproducteurs, le foie, le cerveau et le sang provenant des descendants mâles et femelles de souris traitées seront collectés pour l'analyse.

#### Le choix du composé pour l'étude chez la souris

Pour une étude des effets des néonicotinoïdes dans le système modèle souris, nous choisirons le composé avec le potentiel de perturbation endocrinien le plus fort, qui se déterminera par l'étude en système cellulaire in vitro. Les souris témoins seront traitées avec une quantité égale de véhicule.

#### The dose screening

Nous utiliserons la dose la plus faible possible, pertinente pour la dose quotidienne autorisée de néonicotinoïdes. L'ANSES (saisine n2014-SA-1081) a déterminé que la dose journalière autorisée pour l'imidaclopride est de 0,06 mg / kg, ce qui suggère qu'une personne moyenne de 70 kg de poids pourrait consommer environ 0,42 mg d'imidaclopride par jour sans subir de problèmes de santé. Dans notre étude, nous utiliserons cette dose comme point de départ. Nous utiliserons les doses 5 et 10 fois plus élevées (0,3 et 0,6 mg / kg / jour, respectivement) en plus de cette dose initiale. Donc, la dose de 0 - 0,06 - 0,3 et 0,6 mg / kg / jour sera testée pour sept composés. Pour le dépistage initial de la dose, nous effectuerons diverses analyses du phénotype des organes et nous mesurerons plusieurs hormones dans le sérum. La dose minimale à laquelle les effets seront observés, sera réexaminée dans des études plus approfondies. Les pesticides seront administrés par voie orale par gavage aux animaux. L'équipe du Dr Smagulova (partenaire 3) a utilisé cette méthode de distribution toxique dans de nombreuses expériences de traitement (26,27). Le traitement sera effectué à partir du jour de la fécondation jusqu'à la naissance de la descendance. Les bouchons vaginaux copulatoires seront vérifiés quotidiennement et les souris possédant ce bouchon seront traitées..



La descendance juvénile et adulte des souris (mâles et femelles) sera analysée pour les changements dans la morphologie des organes. Pour chaque organe, nous effectuerons une analyse quantitative des principaux types de cellules en utilisant des marqueurs spécifiques (voir schéma). La progéniture femelle des souris traitées sera sacrifiée à plusieurs moments et les organes seront disséqués et utilisés pour l'analyse, au lendemain du jour 0

(ovaire, étude du cerveau), au jour 5 (foie, étude du cerveau), à 35 (foie, Cerveau, glande mammaire study). La progéniture mâle des souris traitées sera sacrifiée au jour 5 post-natal (testicule, cerveau) et 35

(testicule et cerveau). Le sang provenant de souris de 36 jours sera utilisé pour analyser les niveaux hormonaux.

#### Tâche 2b. Impact des néonicotinoïdes sur les organes reproducteurs, testicules et ovaires.

Partenaires impliqués : F. Smagulova, Partenaire 5: S. Mazaud-Guittot

##### Stratégie expérimentale / matériel et méthodes

Des souris CD1 gestantes seront traitées pendant la période embryonnaire et l'analyse de la fonction reproductrice chez les mâles sera effectuée après la naissance chez les souris jeunes. Les souris seront sacrifiées à l'âge de 5 semaines pour évaluer la fonction reproductrice. Les souris seront euthanasiées et le sang sera recueilli, les organes reproducteurs seront fixés ou congelés à  $-80^{\circ}\text{C}$ . **Pour les testicules**, les nombres de cellules germinales et de cellules de Sertoli seront analysés à l'aide de marqueurs spécifiques de ces types cellulaires. Nous évaluerons également la progression méiotique en utilisant la préparation d'étalements cellulaires des testicules et le co-immunomarquage des marqueurs spécifiques de chaque étape méiotique tels que  $\gamma\text{H2AX}$ , SYCP3, DMC1 (stade précoce), MLH1 et SYCP3, SYCP1 (stade tardif). Pour évaluer la transition importante histone-protamine qui survient au cours de la spermiogenèse, nous mesurerons le niveau relatif de protamine 2 par Western Blot quantitatif. Nous effectuerons l'analyse des marques épigénétiques d'histones associées aux dommages à l'ADN et à la persistance des ruptures de l'ADN double brin, telles que les marques d'histones acétylées et ubiquitinées. Nous effectuerons l'analyse de l'expression des gènes associés à la méiose, à la recombinaison de l'ADN et au cycle cellulaire. Nous comptons le nombre de spermatozoïdes, car c'est un paramètre physiologique important de la gamétogenèse masculine.

**Les ovaires** provenant de femelles aux cycles synchronisés seront analysés au niveau histologique pour leur stock de follicules grâce au marquage spécifique des ovocytes pour aider au comptage, et au niveau transcriptionnel pour les gènes généralement dysrégulés au cours du vieillissement (*Atm*, *Brcal*, *Xrcc1*, *Nthl1*, etc ...). Le sang sera recueilli après le sacrifice par ponction cardiaque pour mesurer les niveaux d'hormones gonadiques et hypophysaires.

#### Tâche 2c. Impact des néoniques sur le foie

Partenaires impliqués : Partenaire 2, Investigateur principal M. Samson

##### Stratégie expérimentale / matériel et méthodes

Concernant l'analyse du foie, après le traitement des souris comme décrit ci-dessous, le sang sera recueilli par ponction rétro-orbitale de chaque souris avant leur sacrifice pour une analyse des transaminases hépatiques : alanine aminotransférase (ALAT) et aspartate aminotransférase (ASAT) (28-30). ALAT et ASAT seront mesurés par le Département de Biochimie, Hôpital Pontchaillou Rennes. Pour évaluer l'impact des néonicotinoïdes sur le tissu hépatique, des foies seront prélevés et seront intégrés soit dans la paraffine (l'évaluation des lésions hépatiques sera faite par coloration HES et celle de la fibrose hépatique par coloration au Rouge Sirius), soit directement congelées dans l'azote. L'analyse quantitative de la fibrose hépatique sera également réalisée par une technique de génération de deuxième harmonique. Nous effectuerons les études immunohistologiques pour observer l'apparition de CHC par coloration Ki67 et d'autres marqueurs de prolifération du CHC. Nous extrairons l'ARN pour analyser par PCR quantitative, l'expression de gènes connus pour être impliqués dans la synthèse ou la dégradation de la matrice extracellulaire (IL-8,  $\text{TGF}\beta$ ,  $\text{IFN}\gamma$ , CCL2, Mmp-8,  $\text{TNF}\alpha$ , Mmp-13, Mmp-2, IL-10, collagène type 1  $\alpha 1$  (Colla1),  $\alpha$ -actine muscle lisse ( $\alpha\text{Sma}$ )) ou comme indicateur de l'activation des cellules stellaires hépatiques et nous étudierons les caractéristiques moléculaires de l'inflammation et de la fibrose à différents stades de la fibrose chez ces souris. Enfin, les populations de cellules immunitaires du foie (cellules B, cellules T CD4 et CD8, macrophages, neutrophiles, cellules NK, cellules NKT, cellules Treg, cellules dendritiques) seront analysées par cytométrie en flux comme réalisées de façon routinière (28). Les sections du lobe gauche seront incorporées dans le composé OCT Tissue-Tek, congelées dans de l'azote liquide et stockées à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Les sections seront coupées ( $5\ \mu\text{m}$ ), séchées à l'air et fixées dans de l'acétone. Les sections de foie seront colorées par l'hématoxyline et l'éosine. Pour visualiser la graisse macro et micro-vésiculeuse, les sections fixées avec 4% de PFA-PBS seront colorées avec de l'huile rouge O (Sigma). Pour détecter l'hépatocyte prolifératif, l'immunocoloration pour BrdU et Ki-67 sera effectuée sur des sections de foie de souris normales ( $n = 6$ ) ou traitées ( $n = 7-8$ ), ce qui a été injecté à  $100\ \text{mg / kg}$  de BrdU par voie intraveineuse à 1 h avant d'être sacrifiée. En outre, afin d'identifier de nouveaux biomarqueurs de type cytokinique (c'est-à-dire des molécules exprimées en nombre de copies élevé et

sécrétés dans des fluides biologiques), nous procéderons à l'analyse de plus de 400 cytokines ou de gènes impliqués dans l'inflammation, par PCR quantitative (ensemble de Amorces maison). L'ARN total sera extrait du foie de souris en utilisant le réactif TRIzol (Invitrogen). L'ADNc sera synthétisé en utilisant la transcriptase inverse SuperScript™ II (Invitrogen). L'amplification de l'ADNc ou de la RT sera encore vérifiée par amplification par PCR à l'aide du gène de ménage, GAPDH. Le protocole et les conditions de la RT-PCR et du qPCR seront les mêmes que ceux effectués habituellement par notre laboratoire en utilisant des amorces spécifiques pour 18S et des gènes d'intérêt (28-30).

Pour analyser l'inflammation du foie chez la souris, les cellules immunitaires du foie seront isolées comme décrit précédemment (28,29) avec une viabilité de > 95%. Les cellules seront ré-suspendues dans le tampon (PBS avec 10% de FCS) et pré-incubées avec un anti-CD16 / 32 (BD Pharmingen) pour bloquer la liaison non spécifique. Les cellules seront ensuite étiquetées avec des anticorps / réactifs conjugués au fluorochrome appropriés (BD Pharmingen, mdbioproducts et ebioscience): anti-CD3-V500 (clone 500-A2), anti-CD4-PE-Cy7 (clone RM4-5), anti-CD4-PE-Cy7 -CD8-APC-Cy7 (clone 53-6.7), anti-NK1.1-PerCP-Cy-5.5 (clone PK136), CD45-V500 (clone 30-F11), anti-CD11b-PE Cy7 (clone M1 / M70), CD11c-APC (clone HL3), anti-Gr1-V450-Ly.6G / C (clone RB6-8C5), CD25-FITC (7D4), Foxp3-PE (clone MF23), TCRβ-V450 (clone H57- 597) et anti-CD69-PE (clone H1.2F3). Les cellules colorées seront analysées sur le cytomètre de flux Fortessa (BD Bioscience) et les données seront analysées par un logiciel adhoc. Les cellules mortes et les cellules présentant des doublets seront exclues sur la base de la dispersion directe et latérale. Parmi les cellules immunitaires du foie, nous nous concentrerons plus spécifiquement sur les macrophages résidents (cellules de Kupffer) qui jouent un rôle clé dans le développement de la fibrose.

#### **Tâche 2d. Impact des néonicotinoïdes sur le cerveau (et le comportement)**

*Partenaire impliqués: Investigateur Principal T. Charlier*

##### *Stratégie expérimentale / matériel et méthodes*

L'action potentielle des néonicotinoïde chez les vertébrés est probablement due à leur modulation du système cholinergique. Ce système fait partie du système neuroendocrine modulant de nombreuses fonctions reproductives sexuellement dimorphiques, y compris la copulation, les comportements sociaux et parentaux ainsi que le stress. Les souris mâles et femelles prépubères seront traitées comme indiqué ci-dessus. Après le traitement, les souris seront testées pour l'activité locomotrice et le comportement de type anxieux (champ ouvert, le labyrinthe en plus élevé, ...) en utilisant le système de suivi Noldus Ethovision. Les mâles et les femelles seront également testés pour les interactions sociales (préférences olfactives, comportement sexuel). Après les tests comportementaux, les souris seront anesthésiées puis euthanasiées par perfusion intracardiaque d'une solution saline froide suivie d'une solution de fixation (Somogyi). Le cerveau extrait puis cryoprotecté, congelé puis coupé (30 µm) à l'aide d'un cryostat. De nombreux paramètres biologiques seront analysés par immunohistochimie, pour mettre en évidence notamment le récepteur des œstrogènes alpha, le récepteur aux androgènes, des marqueurs de neuroplasticité (Ki67, doublecortine, synaptophysine et PSD95) et des marqueurs de la production de neurotransmetteurs (tyrosine hydroxylase et tryptophane hydroxylase). Nous étudierons l'expression de ces marqueurs dans de nombreuses régions cérébrales sexuellement dimorphes, y compris la zone préoptique médiane, le noyau de lit de la strie terminale, la région septale, l'amygdale, le noyau périventriculaire et l'hippocampe, en utilisant le logiciel NIH ImageJ comme décrit précédemment dans notre laboratoire.

#### **Tâche 2e. Impact des néoniques sur la glande mammaire**

*Partenaire impliqués: Investigateur Principal F. Pakdel*

##### *Stratégie expérimentale / matériel et méthodes*

Afin de tester les effets in vivo des néonicotinoïdes sur la croissance des glandes mammaires, nous évaluerons les changements d'organisation du tissu mammaire en comparant la croissance des canaux galactophores entre des souris témoins et exposées aux néonicotinoïdes. Nous utiliserons des animaux âgés de 35 à 36 jours, ce qui nous permettra de travailler avec des animaux prépubères présentant des canaux galactophores et une ramification bien développés. Cela permettra également un meilleur suivi des effets hormonaux après l'exposition aux néonicotinoïdes. Dans un premier temps, le tissu mammaire sera étalé le plus finement possible sur une lame de verre et fixés dans du paraformaldéhyde à 4%. Les glandes mammaires seront colorées pendant une nuit dans du alum carmin (0,2% de carmin, 0,5% de sulfate de potassium d'aluminium), déshydratées dans un gradient d'éthanol et clarifiées pendant une nuit

dans du xylène. Les tissus seront ensuite photographiés sous un microscope SteREO Discovery V8 (Zeiss, grossissement x1). La longueur des conduits galactophores sera mesurée autour du ganglion lymphatique sur une surface représentant près de 25% de la surface totale de la glande mammaire. Dans un second temps, des expériences d'immunofluorescence seront effectuées à l'aide de marqueurs spécifiques tels que Epcam, Ki-67, Esr1 ou PR. Pour ce faire, les canaux galactophores seront enveloppés dans un support de type Tissue Tek (Sakura) et tranchés avec un cryostat. L'immunofluorescence sera effectuée sur des tranches prises autour du ganglion lymphatique. Les sections seront ensuite incubées à température ambiante avec les différents anticorps pendant 1 h dans du PBS additionné de 0,3% Triton X100 et 0,5% lait. Une incubation avec un anticorps secondaire conjugué sera ensuite réalisée à température ambiante pendant 1 h dans du PBS additionné de 0,3% Triton X100 et 0,5% lait. Les images seront obtenues à l'aide d'un microscope à épifluorescence Impair.Z1 ApoTome AxioCam (Zeiss) et traitées grâce au logiciel Axio Vision. Le pourcentage de cellules Ki-67-, Esr1 et PR-positives sera déterminé en comptant le nombre de cellules marquées et le nombre total de cellules épithéliales à l'aide du logiciel ImageJ. Le nombre total de cellules des conduits galactophores sera déterminé grâce au marquage avec un anticorps anti-Epcam. L'immuno-marquage de Epcam permettra de vérifier que l'expression de Ki-67 est restreinte aux cellules épithéliales mammaires.

#### Task 2 deliverables

Octobre 2018-Mars 2020

#### Tâche 3. Évaluation de l'impact des néonicotinoïdes au niveau de la transcription

Coordinateur de tâche : F. Smagulova

Partenaires impliqués: tous

Objectives spécifiques:

Déterminer la voie et le mécanisme impliqués dans la toxicité des néons

Stratégie expérimentale / matériel et méthodes

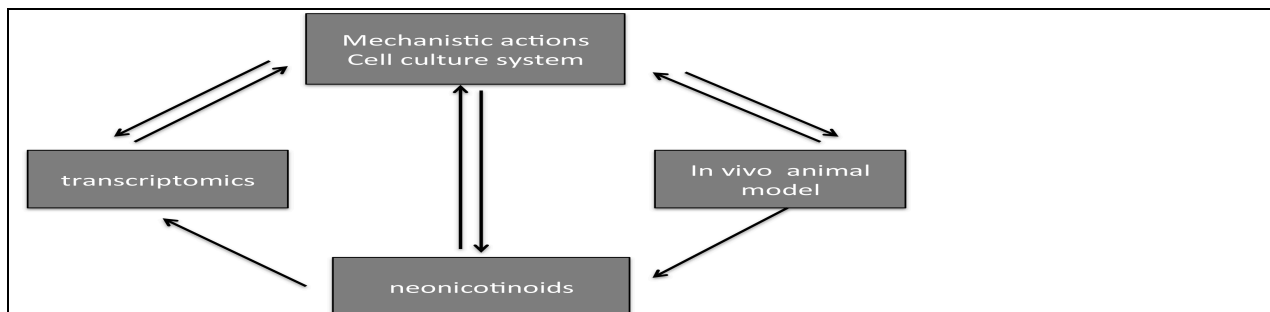
Nous effectuerons une analyse de l'ARN transcriptomique dans le cerveau, les testicules et le tissu hépatique en raison des effets toxiques connus des néonicotinoïdes dans ces tissus et nous analyserons également la glande mammaire en raison des effets potentiels sur ces tissus dépendants de l'hormone. Nous utiliserons trois échantillons biologiques pour l'analyse de RNA-seq. Le séquençage et la première analyse seront effectués sur la plate-forme Genomic à Strasbourg. Les gènes exprimés différemment seront analysés plus en détail pour révéler la voie moléculaire impliquée dans la toxicité des néonicotinoïdes. À cette fin, nous effectuerons une annotation fonctionnelle de gènes exprimés différemment en utilisant le programme d'ontologie DAVID et Gene Ontology et nous effectuerons une analyse en intégrative en utilisant des données RNA-seq des trois tissus. Les données seront déposées dans le dépôt GEO de Gene Bank.

Tâches 3, deliverables

Février 2018- Octobre 2019

#### Les analyses statistiques

Les données seront exprimées en valeurs moyennes  $\pm$  SEM ou valeurs médianes avec un percentile minimal et maximal. Le test de Student ou de Mann-Whitney sera utilisé pour la comparaison des paramètres du groupe de contrôle avec le groupe de traitement. L'analyse par groupe multiple a été effectuée par ANOVA à sens unique. La corrélation entre les variables continues sera analysée en utilisant le logiciel GraphPad Prism5. Pour toutes les analyses statistiques, la valeur est considérée comme significative si, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  et \*\*\*  $p < 0,001$ .



Les tâches et son rôle dans les études de néonicotinoïdes

[Principales difficultés qui pourraient être rencontrées et moyens d'y répondre \(solutions de repli\) / Main expected difficulties and how to meet them \(fallback\)](#)

La principale difficulté sera de trouver la dose minimale à utiliser dans notre étude. Pour surmonter ce problème, nous utiliserons plusieurs doses. Étant donné que le projet est intégratif et nécessite l'effort de nombreuses équipes, la synchronisation de notre projet en fin de projet pourrait s'avérer problématique. Nous projetons plusieurs rencontres aux périodes charnières où nous discuterons pour résoudre les problèmes et trouver les solutions appropriées.

[Modalités de pilotage et de suivi du projet : partenaires, compétences et moyens humains / control and monitoring rules of the project: partners, skills and human resources](#)

**Partenaire 1**, Irset Inserm U1085, investigateur principal **Olivier Fardel**. Cette équipe a une solide expérience sur diverses lignées cellulaires humaines et une excellente expérience en toxicologie et en pharmacocinétique cellulaire, y compris sur les transporteurs et les pesticides. L'équipe dispose de tous les équipements et méthodes requis pour l'analyse.

**Partenaire 2**, Irset Inserm U1085, investigateur principal **Michel Samson**. Equipe experte dans le domaine de la toxicologie et des pathologies du foie. Le partenaire 2 possède une expertise très élevée dans les chimiokines, les cytokines et leurs récepteurs, en particulier le clonage de CCR5, CCR8 et deux autres récepteurs de chimiokines. Au cours des sept dernières années, Partner 2 a acquis une grande expertise dans le domaine de l'hépatite avec plus de 40 publications récentes publiées. Ces études ont conduit à 5 brevets. Plus généralement, le partenaire 2 possède une expertise dans: RT-PCR quantitative, Western blot et quantification de cytokines et d'enzymes, histologie des lésions hépatiques, modèles de rongeurs de l'hépatite, hépatocytes et biologie des cellules stellaires hépatiques (modèles de culture), études cliniques sur hépatite

**Partenaire 3**, Irset Inserm U1085, Investigateur principal **Fatima Smagulova**. Ce groupe possède une expérience solide sur la reproduction et en toxicologie, le membre de son équipe a de solides antécédents en séquençage et en épigénétique de nouvelle génération. F. Smagulova travaille sur le développement de la souris et sur la recombinaison méiotique chez la souris et l'humain depuis 2006 (Smagulova et al., Nature 2011; Brick, Smagulova et al., Nature 2012, Smagulova et al., Genes and Dev, 2016). F. Smagulova a récemment créé une équipe Avenir. L'expertise de sa recherche comprend l'étude du changement de réseau transcriptionnel, notamment via modification des histones, plus particulièrement axés sur la méiose et la reproduction. Son équipe a récemment publié deux articles (BMC Genomics, 2015 et Nucleic Acids Res, 2016) et deux articles ont été publiés en collaborations (Petit et al Biol Reprod. 2015, Lardenois et al., Nucleic Acid Res, 2016). Le membre de son équipe, Aurore Gely-Pernot (MCU, EHESP / U1085, équipe 4) a été formé à IGBMC, où elle a étudié la différenciation de la spermatogonie. Elle a été embauchée comme chercheuse postdoctorante dans l'équipe Avenir en 2013 et, en 2016, a obtenu MCU chez EHESP. Elle a une bonne expérience sur la reproduction et l'épigénétique (Gely-Pernot et al., Plos Genetics, 2015, Gely-Pernot et al., BMC Genomics, 2015 et Hao, Gely-Pernot et al., Nucleic Acids Res, 2016).

**Partenaire 4**, Irset Inserm U1085, Investigateur principal **Farzad Pakdel**, a plus de 20 ans d'expérience en recherche et qui compte plus de 90 publications et revues dans des journaux scientifiques internationaux. L'équipe possède une expertise solide en recherche fondamentale sur la signalisation des récepteurs aux œstrogènes et les mécanismes moléculaires liés du cancer du sein. L'équipe a concentré ses



recherches sur l'analyse des effets de divers perturbateurs endocriniens et sur l'étude de la signalisation cellulaire et des voies épigénétiques impliquées dans le développement et la progression du cancer du sein. En outre, l'équipe a développé des essais biologiques in vivo et in vitro pour dépister l'activité hormonale et les mécanismes d'action des produits chimiques environnementaux.

**Partenaire 5**, Irset Inserm U1085, investigateur principal **Severine Mazaud**, a une expérience solide dans l'analyse des ovaires adultes et embryonnaires exposés aux composés toxiques. En outre, l'équipe a développé un axe de recherche fondamentale ainsi que des études toxicologiques sur les gonades du fœtus humain depuis plus de 6 ans.

**Partenaire 6**, Irset Inserm U1085, Investigateur principal **Thierry Charlier**, possède une solide expertise dans le domaine de la neuroendocrinologie du comportement. Plus particulièrement, son expertise s'étend de la biologie moléculaire, biochimie, immunohistochimie jusqu'à l'analyse comportementale. Son groupe s'intéresse à définir comment l'environnement, chimique ou social, peut façonner le développement du cerveau, et plus particulièrement la région impliquée dans le contrôle de la fonction de reproduction. Il a publié plus de 50 articles et chapitres de livres.

Résultats attendus, notamment en termes de réduction de l'utilisation des produits phytopharmaceutiques, et des risques et des impacts associés / [expected results, particularly in terms of reducing the use, associated impacts and risks from plant protection products](#)

Les résultats obtenus permettront de définir les risques potentiels de l'utilisation des néonicotinoïdes sous leur forme actuelle dans l'agriculture. La dose journalière autorisée actuelle pour néonicotinoïdes sera reconsidérée en fonction de nos données. Nous fournirons nos données aux organismes régionaux, nationaux et internationaux afin d'aider à la prise de décision quant à l'utilisation de ces molécules

Livrables attendus et valorisation des résultats au bénéfice d'Écophyto / [expected deliverables and optimization of results for the benefit of Écophyto](#)

*Notamment l'utilisation potentielle des outils développés et des résultats obtenus (guides, etc.) par le public cible (organismes de recherche, instituts techniques, conseillers agricoles, agriculteurs...). Ces documents comprennent notamment a minima un rapport scientifique intermédiaire (pour les projets de plus d'un an) et un rapport scientifique final (pour tous les projets). Ces rapports sont remis au responsable de suivi Écophyto II pour l'administration. / Including the potential use of developed tools and obtained results (guides) by the target audience (research institutes, technical institutes, agricultural counsellors, farmers ...). This includes at least an middle-way scientific report (for projects longer than one year) and a final scientific report (for all projects). These reports are submitted to the person responsible for the Écophyto II plan follow-up at the ministry.*

Dans cette étude, nous utiliserons une approche combinée utilisant des études in vitro, in vivo et ex vivo. Nous allons déterminer les biomarqueurs potentiels, qui pourraient être utilisés pour évaluer la toxicité des néonicotinoïdes. Les rapports scientifiques seront soumis à PNPRES chaque année. F. Smagulova coordonnera le projet et sera responsable du rapport, qui sera rédigé par tous les partenaires et sera soumis à la personne responsable du plan Écophyto II.

*N.B. Le rapport final ainsi que toute valorisation publique du projet seront accessibles librement sur le [portail EcophytoPIC](#) / N.B. The final report and any public promotion of the project will be freely accessible on the [portal EcophytoPIC](#)*

Après approbation par tous les auteurs, nous soumettrons ce rapport final sur le portail EcophytoPIC

**6 – Les caractéristiques financières (montant global du projet, phasage technique éventuel ...) et proposition d'aide motivée (dépenses éligibles, taux et montant de l'aide, conditions particulières...) / [Financial characteristics \(total amount of the project, possible technical phasing...\) and motivated grant proposal \(eligible expenditure, grant rate and amount, special conditions...\)](#)**

**La demande totale est de 180.000 euros**

Le coût total du projet « inscrire le nom du projet » est de « montant total du projet » €, dont « montant éligible » € sont éligibles à une subvention. / The total cost of the project "Register the project name" is "total project" € including "eligible amount" € are eligible for a grant.

Le coût du projet est estimé dans les marges requises. Le service de sous-traitance requis est le séquençage de l'ARN qui coûtera 15 000€. Tous les partenaires utiliseront le financement pour les consommables. Il n'est pas prévu de dépense d'équipement ou salaire.

Le montant global de la subvention attribuée par l'ONEMA ne peut dépasser 75% du coût complet net de taxe du projet sauf décision expresse de la Direction générale de l'ONEMA (le coût complet d'un projet reprend l'ensemble des charges rattachables à ce projet, à l'exclusion de toute marge bénéficiaire ; il est composé de charges directes et de charges indirectes qu'il est nécessaire de détailler). / The total amount of the subsidy granted by ONEMA can not exceed 75% of the net (free of fees) total cost of the project unless expressly decided of ONEMA General directorate (the full cost of the project includes all the expenses relating to this project, excluding any profit margin ; it is made of direct and indirect costs it is necessary to detail).

Lors du versement du solde, le ou la chargé(e) de gestion de l'ONEMA effectue le contrôle financier en comparant le plan de financement aux dépenses réelles. Le plan de financement doit donc être rempli très soigneusement. / When the balance is paid, the person in charge of the project management at ONEMA makes financial control by comparing the financing plan to actual expenditures. The financing plan must then be completed very carefully.

Le plan financier sera effectué selon l'exigence, et les rapports pour les dépenses seront soumis.

## 7 – Le calendrier prévisionnel de réalisation / Planned implementation schedule

### Oct -2017 the Project initiation

Time table

Coordinateur	Partenaire impliqué	Tâche	1 <sup>ère</sup> année (1-6m) (7-12m)		2 <sup>ème</sup> année (13-18m) (19-24m)		3 <sup>ème</sup> année (25-30m) (31-36m)	
Farzad Pakdel	1, 4	Tâche 1. Evaluation de la toxicité relative et des propriétés endocrines des néonicotinoïdes vitro et ex vivo						
Fatima Smagulova	2,3,4,5,	Tâche 2. Evaluation de l'impact d'une exposition embryonnaire aux néonicotinoïdes sur les souris prépubaire et adultes						
Fatima Smagulova	2,3,4,5	Tâche 3. Evaluation de l'impact des néonicotinoïdes sur les niveaux de transcription						

Date de démarrage du projet : Les conventions démarrent toujours au plus tôt à la date de signature par le Directeur général de l'ONEMA. C'est également la date à partir de laquelle est prise en compte

***l'éligibilité des dépenses. / Date of project start: The conventions always start at the earliest on the date of signature by the General Director of ONEMA. This is also the date from which is taken into account the eligibility of expenditure.***

**Oct -2017**

***Durée prévisionnelle du projet :*** Elle ne doit pas dépasser 36 mois (12 mois pour les projets innovants exploratoires) (y compris délai de remise des rapports au responsable de suivi Écophyto II identifié pour l'administration centrale pour l'appel) et doit être ferme car elle détermine la date de fin d'éligibilité des dépenses. La convention dure 12 mois de plus afin de laisser le temps nécessaire aux échanges entre l'instance de validation scientifique et technique du rapport et le porteur. Le porteur s'engage à transmettre dès validation du rapport final validé (au plus tard à l'issue de ces 12 mois supplémentaires) les éléments justificatifs à l'Onema. / ***Expected duration of the project:*** It must not exceed 36 months (12 months for exploratory innovative projects) (including time for submission of reports to the person in charge of the Écophyto II call follow-up at the ministry) and this dead-line should be strictly respected because it determines the end of eligibility for expenditure. The agreement lasts for 12 more months to allow time for technical validation of the report (which may require discussions between scientific committee and project manager). The project manager commits himself to give any proof of expenditure to Onema as soon as the final report is approved (at the end of the additional 12 months the latest).

**Nous prévoyons d'accomplir toutes les tâches dans les 36 mois.**

***Période de remise du rapport scientifique ou technique intermédiaire (sauf pour les projets d'un an) : / Dead-line for the middle-way scientific or technical report (except for the one year long projects):***

La date limite pour le rapport scientifique à mi-chemin est octobre 2018

- au référent Écophyto II : à mi-projet en partant de la signature de la convention / to the Écophyto II contact point for the ministry: after signing the agreement

**Fatima Smagulova, fatima.smagulova@inserm.fr**

- et à l'Onema (rapport validé) : à mi-projet +6 mois après la signature de la convention. / to Onema (validated report): half-point + 6 months after signing the agreement

La date butoir de remise du rapport scientifique à mi-parcours est octobre 2018.

***Période de remise du rapport scientifique ou technique final : / Dead-line for the final scientific or technical report***

**Date limite de remise du rapport scientifique final: Sept 2019.**

- au référent Écophyto II à l'issue de la durée du projet / to the Écophyto II contact point for the ministry at the end of the project

**Fatima Smagulova, fatima.smagulova@inserm.fr**

- et à l'Onema (rapport validé) au plus tard à la durée du projet + 12 mois / to Onema (validated report) no later than the project duration + 12 months

**La date limite de remise du rapport final validé à l'Onema est septembre 2020.**

**8 – Une annexe financière par partenaire (cf. format joint) + un récapitulatif = annexe financière du projet au format Excel. / A financial annex by partner (see attached format) + a summary financial annex of the project in Excel format**

**Chaque partenaire signe sa propre fiche. Le coordinateur (et le service financier d'appui) signe la fiche récapitulative. / Each partner signs his own record. The coordinator (and the supporting financial service) signs the summary sheet.**

#### References

1. Cimino, A.M., Boyles, A.L., Thayer, K.A. and Perry, M.J. (2016) Effects of Neonicotinoid Pesticide Exposure on Human Health: A Systematic Review. *Environmental health perspectives*.
2. Domenica, A., Maria, A., Stefania, B., Alessio, I., Alberto, L., Tunde, M., Rachel, S., Csaba, S., Benedicte, V. and Alessia, V. (2017) Neonicotinoids and bees: The case of the European regulatory risk assessment. *The Science of the total environment*, **579**, 966-971.
3. Elbert, A., Haas, M., Springer, B., Thielert, W. and Nauen, R. (2008) Applied aspects of neonicotinoid uses in crop protection. *Pest management science*, **64**, 1099-1105.
4. Chen, M., Tao, L., McLean, J. and Lu, C. (2014) Quantitative analysis of neonicotinoid insecticide residues in foods: implication for dietary exposures. *Journal of agricultural and food chemistry*, **62**, 6082-6090.
5. Ford, K.A. and Casida, J.E. (2006) Unique and common metabolites of thiamethoxam, clothianidin, and dinotefuran in mice. *Chemical research in toxicology*, **19**, 1549-1556.
6. Harada, K.H., Tanaka, K., Sakamoto, H., Imanaka, M., Niisoe, T., Hitomi, T., Kobayashi, H., Okuda, H., Inoue, S., Kusakawa, K. *et al.* (2016) Biological Monitoring of Human Exposure to Neonicotinoids Using Urine Samples, and Neonicotinoid Excretion Kinetics. *PloS one*, **11**, e0146335.
7. Mohamed, F., Gawarammana, I., Robertson, T.A., Roberts, M.S., Palangasinghe, C., Zawahir, S., Jayamanne, S., Kandasamy, J., Eddleston, M., Buckley, N.A. *et al.* (2009) Acute human self-poisoning with imidacloprid compound: a neonicotinoid insecticide. *PloS one*, **4**, e5127.
8. Forrester, M.B. (2014) Neonicotinoid insecticide exposures reported to six poison centers in Texas. *Human & experimental toxicology*, **33**, 568-573.
9. Vinod, K.V., Srikant, S., Thiruvikramaprakash, G. and Dutta, T.K. (2015) A fatal case of thiacloprid poisoning. *The American journal of emergency medicine*, **33**, 310 e315-316.
10. Karatas, A.D. (2009) Severe central nervous system depression in a patient with acute imidacloprid poisoning. *The American journal of emergency medicine*, **27**, 1171 e1175-1177.
11. Shadnia, S. and Moghaddam, H.H. (2008) Fatal intoxication with imidacloprid insecticide. *The American journal of emergency medicine*, **26**, 634 e631-634.
12. Ferreira-Vieira, T.H., Guimaraes, I.M., Silva, F.R. and Ribeiro, F.M. (2016) Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System. *Current neuropharmacology*, **14**, 101-115.
13. Jurado-Coronel, J.C., Avila-Rodriguez, M., Capani, F., Gonzalez, J., Moran, V.E. and Barreto, G.E. (2016) Targeting the Nicotinic Acetylcholine Receptors (nAChRs) in Astrocytes as a Potential Therapeutic Target in Parkinson's Disease. *Current pharmaceutical design*, **22**, 1305-1311.
14. Hurst, R., Rollema, H. and Bertrand, D. (2013) Nicotinic acetylcholine receptors: from basic science to therapeutics. *Pharmacology & therapeutics*, **137**, 22-54.
15. Abdel-Rahman Mohamed, A., Mohamed, W.A. and Khater, S.I. (2017) Imidacloprid induces various toxicological effects related to the expression of 3beta-HSD, NR5A1, and OGG1 genes in mature and immature rats. *Environmental pollution*, **221**, 15-25.
16. Hoshi, N., Hirano, T., Omotehara, T., Tokumoto, J., Umemura, Y., Mantani, Y., Tanida, T., Warita, K., Tabuchi, Y., Yokoyama, T. *et al.* (2014) Insight into the mechanism of reproductive dysfunction caused by neonicotinoid pesticides. *Biological & pharmaceutical bulletin*, **37**, 1439-1443.
17. Gu, Y.H., Li, Y., Huang, X.F., Zheng, J.F., Yang, J., Diao, H., Yuan, Y., Xu, Y., Liu, M., Shi, H.J. *et al.* (2013) Reproductive effects of two neonicotinoid insecticides on mouse sperm function and early embryonic development in vitro. *PloS one*, **8**, e70112.

18. Badgujar, P.C., Jain, S.K., Singh, A., Punia, J.S., Gupta, R.P. and Chandratre, G.A. (2013) Immunotoxic effects of imidacloprid following 28 days of oral exposure in BALB/c mice. *Environmental toxicology and pharmacology*, **35**, 408-418.
19. Green, T., Toghiani, A., Lee, R., Waechter, F., Weber, E. and Noakes, J. (2005) Thiamethoxam induced mouse liver tumors and their relevance to humans. Part 1: mode of action studies in the mouse. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, **86**, 36-47.
20. Swenson, T.L. and Casida, J.E. (2013) Neonicotinoid formaldehyde generators: possible mechanism of mouse-specific hepatotoxicity/hepatocarcinogenicity of thiamethoxam. *Toxicology letters*, **216**, 139-145.
21. Sun, Q., Xiao, X., Kim, Y., Kim, D., Yoon, K.S., Clark, J.M. and Park, Y. (2016) Imidacloprid Promotes High Fat Diet-Induced Adiposity and Insulin Resistance in Male C57BL/6J Mice. *Journal of agricultural and food chemistry*, **64**, 9293-9306.
22. Liu, M., Wang, G., Zhang, S.Y., Zhong, S., Qi, G.L., Wang, C.J., Chuai, M., Lee, K.K., Lu, D.X. and Yang, X. (2016) From the Cover: Exposing Imidacloprid Interferes With Neurogenesis Through Impacting on Chick Neural Tube Cell Survival. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, **153**, 137-148.
23. Marfo, J.T., Fujioka, K., Ikenaka, Y., Nakayama, S.M., Mizukawa, H., Aoyama, Y., Ishizuka, M. and Taira, K. (2015) Relationship between Urinary N-Desmethyl-Acetamiprid and Typical Symptoms including Neurological Findings: A Prevalence Case-Control Study. *PloS one*, **10**, e0142172.
24. Chedik, L., Bruyere, A., Le Vee, M., Stieger, B., Denizot, C., Parmentier, Y., Potin, S. and Fardel, O. (2017) Inhibition of Human Drug Transporter Activities by the Pyrethroid Pesticides Allethrin and Tetramethrin. *PloS one*, **12**, e0169480.
25. Bruyere, A., Hubert, C., Le Vee, M., Chedik, L., Sayyed, K., Stieger, B., Denizot, C., Parmentier, Y. and Fardel, O. (2016) Inhibition of SLC drug transporter activities by environmental bisphenols. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, **40**, 34-44.
26. Gely-Pernot, A., Hao, C., Becker, E., Stuparevic, I., Kervarrec, C., Chalmel, F., Primig, M., Jegou, B. and Smagulova, F. (2015) The epigenetic processes of meiosis in male mice are broadly affected by the widely used herbicide atrazine. *BMC genomics*, **16**, 885.
27. Hao, C., Gely-Pernot, A., Kervarrec, C., Boudjema, M., Becker, E., Khil, P., Tevosian, S., Jegou, B. and Smagulova, F. (2016) Exposure to the widely used herbicide atrazine results in deregulation of global tissue-specific RNA transcription in the third generation and is associated with a global decrease of histone trimethylation in mice. *Nucleic acids research*.
28. Arshad, M.I., Piquet-Pellorce, C., L'Helgoualc'h, A., Rauch, M., Patrat-Delon, S., Ezan, F., Lucas-Clerc, C., Nabti, S., Lehuen, A., Cubero, F.J. *et al.* (2012) TRAIL but not FasL and TNFalpha, regulates IL-33 expression in murine hepatocytes during acute hepatitis. *Hepatology (Baltimore, Md)*, **56**, 2353-2362.
29. Arshad, M.I., Rauch, M., L'Helgoualc'h, A., Julia, V., Leite-de-Moraes, M.C., Lucas-Clerc, C., Piquet-Pellorce, C. and Samson, M. (2011) NKT cells are required to induce high IL-33 expression in hepatocytes during ConA-induced acute hepatitis. *European journal of immunology*, **41**, 2341-2348.
30. Marvie, P., Lisbonne, M., L'Helgoualc'h, A., Rauch, M., Turlin, B., Preisser, L., Bourd-Boittin, K., Theret, N., Gascan, H., Piquet-Pellorce, C. *et al.* (2010) Interleukin-33 overexpression is associated with liver fibrosis in mice and humans. *Journal of cellular and molecular medicine*, **14**, 1726-1739.