

## **Plan Écophyto II – Appel à projets de recherche PNRPE**

**Programme « 2016 »**

**PestR**

**Pesticides activation of human and zebrafish Pregnan X Receptor**

### **0 – Références au plan Ecophyto**

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

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

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

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)

Date de la demande : 17/02/2017

Mots clefs (5 au maximum) : Pesticides, PXR, métabolisme, prolifération cellulaire

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

Le bénéficiaire de la convention avec l'ONEMA :

Organisme employeur : INSERM

Représenté par *nom, prénom* : Balaguer Patrick

Adresse / Address: IRCM INSERM U1194 Parc Euromédecine 34090 Montpellier

Téléphone / Phone number: 04 67 61 24 09

Mail / E-mail address: [patrick.balaguer@inserm.fr](mailto:patrick.balaguer@inserm.fr)

Nom et coordonnées (mail, téléphone, dont portable) du coordinateur scientifique du projet :

Balaguer Patrick, [patrick.balaguer@inserm.fr](mailto:patrick.balaguer@inserm.fr), 04 67 61 24 09, 06 89 65 99 62

Nom et coordonnées (mail, téléphone) du correspondant au service juridique :

Jacques Cavaillé, [jacques.cavaillé@inserm.fr](mailto:jacques.cavaillé@inserm.fr), 04 67 63 61 31

Nom et coordonnées (mail, téléphone) du correspondant au service financier :

Vincent Boyer, [vincent.boyer@inserm.fr](mailto:vincent.boyer@inserm.fr), 04 67 63 61 4

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

William Bourguet, partenaire 2, CBS, INSERM 1053

Patrice Gonzalez, partenaire 3,

François Brion, partenaire 4, INERIS

Les modalités de reversement des subventions aux partenaires ci dessus désignés doivent être clairement indiquées dans le plan de financement.

L'ONEMA reverse à chaque partenaire sa part de budget

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.

Partenaire 1 et coordonateur : IRCM, INSERM U1194

Nom de l'organisme : INSERM Languedoc Roussillon

Adresse : 60 rue de navacelles 34090 Montpellier

Représenté par Monsieur Jacques Cavaillé (administrateur regional de l'INSERM)

Mail et téléphone : [Jacques.cavaillé@inserm.fr](mailto:Jacques.cavaillé@inserm.fr), 04 67 63 61 31

Mail et téléphone du responsable scientifique : Patrick Balaguer,  
[Patrick.balaguer@inserm.fr](mailto:Patrick.balaguer@inserm.fr), 04 67 61 24 09

Partenaire 2 : CBS INSERM U1054

Nom de l'organisme : INSERM Languedoc Roussillon

Adresse : 60 rue de navacelles 34090 Montpellier

Représenté par Monsieur Jacques Cavaillé (administrateur regional de l'INSERM)

Mail et téléphone : [Jacques.cavaillé@inserm.fr](mailto:Jacques.cavaillé@inserm.fr), 04 67 63 61 31

Mail et téléphone du responsable scientifique : William Bourguet,  
bourguet@cnrs.cbs.fr, 04 67 41 77 02

Partenaire 3 : Université de Bordeaux/laboratoire EPOC

Nom de l'organisme : Université de Bordeaux

adresse : 35 Place Pey Berland 33000 Bordeaux

représenté par Monsieur Manuel TUNON de LARA, Président de l'Université de Bordeaux (représentant légal), téléphone : 05 40 00 29 11, mail : pierrette.wyss@u-bordeaux.fr

Mail et téléphone du responsable scientifique : Patrice Gonzalez,  
patrice.gonzalez@u-bordeaux.fr, 05 56 22 39 26

Partenaire 4 : PARTENAIRE (INERIS, Direction des Risques Chroniques, Unvité d'écotoxicologie in vitro et in vivo)

Nom de l'organisme : Institut National de l'Environnement Industriels et Risques (INERIS)

adresse : Rue Jacques Taffanel, 60550 Verneuil-en-Halatte

représenté par Monsieur Raymond COINTE, Raymond COINTE, Directeur général de l'INERIS (représentant légal), téléphone : 05 44 55 69 20, mail : [raymond.cointe@ineris.fr](mailto:raymond.cointe@ineris.fr)

Mail et téléphone du responsable scientifique : François Brion,  
[francois.brion@ineris.fr](mailto:francois.brion@ineris.fr), 03 44 55 65 12

## **2 – En bref (résumé pédagogique en français en 5-10 lignes destiné au grand public)**

Le récepteur des xénobiotiques humain (hPXR) est un acteur clé de la régulation de la détoxification en contrôlant l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme et l'efflux. hPXR jouerait également un rôle important dans la résistance aux traitements anticancéreux et dans la prolifération de certains cancers. Comme hPXR est la cible de nombreux pesticides, nous nous proposons d'étudier l'effet de ces composés sur la résistance au traitement anti-cancéreux et la prolifération de lignées cellulaires de cancer du foie. Nous étudierons également l'effet de ces pesticides sur le PXR de poisson-zèbre (zfPXR) afin d'une part de mieux comprendre son rôle dans la régulation de la détoxification chez le poisson et d'autre part mieux appréhender la toxicité des

pesticides pour cette espèce.

### **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)**

Chez l'homme, le récepteur PXR (hPXR, NR1I2) est impliqué dans la biosynthèse, la distribution et le métabolisme des stéroïdes, des acides biliaires et des xénobiotiques dont de nombreux pesticides. PXR joue un rôle important dans la protection du système endocrinien en détectant une augmentation de la concentration d'une multitude de substances externes. Lors de l'activation par les xénobiotiques, hPXR forme un hétérodimère avec les récepteurs RXR et se lie dans les promoteurs de ces gènes cibles comme les principaux gènes de désintoxication tels que les enzymes de phase I (CYP3A4), de phase II (UGT1A1) ou de transport et d'efflux (MDR1). D'autre part, l'activation de hPXR est corrélée aux interactions médicamenteuses, à la dérégulation de l'homéostasie des stéroïdes, à la chimiorésistance, à la croissance et à l'agressivité des cancers du côlon et du foie (Planque et al, 2016; Wang et al., 2011; Kodama et al, 2015; Pondugula et al., 2016). hPXR étant la cible de nombreux pesticides, nous caractériserons l'effet de ces composés sur le métabolisme, la chimiorésistance, la croissance et l'agressivité du côlon et des cancers hépatiques.

Chez le poisson, l'implication de PXR dans le métabolisme n'est pas entièrement élucidée. De plus, le PXR des poissons semble activé par un plus petit nombre de pesticides (Ekins et al, 2008; Krasowski et al., 2011; Milnes et al., 2008 et nos résultats personnels). L'objectif de notre projet est de caractériser l'interaction entre les pesticides et le zfPXR et de mieux caractériser son rôle dans le métabolisme des poissons. Pour cela, PestR utilisera des outils cellulaires, biophysiques, cristallographiques, in silico et in vivo (poisson zèbre) afin de caractériser les interactions entre les pesticides et hPXR et zfPXR et de mieux comprendre le rôle du PXR sur le métabolisme, la chimiorésistance, la prolifération chez l'Homme et le poisson-zèbre.

### **4 – Contexte général et enjeux scientifiques et techniques (domaine concerné, problème posé)**

Les perturbateurs endocriniens (PE) sont des composés dans l'environnement qui interfèrent avec l'action des hormones endogènes. La majorité des PE interagissent avec les récepteurs nucléaires (NR). Historiquement, la plupart des PE caractérisés

interagissent avec les récepteurs des œstrogènes (ER) et des androgènes (AR) et perturbent la fonction de reproduction. Les contaminants environnementaux tels que les pesticides, les détergents, les polychlorobiphényles ou les bisphénols sont estrogéniques mais la gamme des anomalies qu'ils génèrent et le type de récepteurs nucléaires qu'ils visent est beaucoup plus large que prévu (Diamanti-Kandarakis Et al., 2009; Hotchkiss et al., 2008). Plus récemment, des études ont montré que l'activité du récepteur PXR humain est également affectée par les EDC. Chez les humains, PXR est un récepteur nucléaire peu sélectif qui joue un rôle essentiel dans la régulation des enzymes de détoxification de phase I (CYP), de phase II (conjugaison) et de phase III (transport, efflux), régulant la clairance dans le foie et les intestins des stéroïdes, des médicaments et des xénobiotiques. En outre, des études récentes ont montré que l'activation de hPXR augmente la chimiorésistance, la croissance et l'agressivité des lignées cellulaires de cancer du côlon (LS174T) et du foie (HEPG2) (Kodama et al, 2015; Planque et al, 2016; Pondugula et al, 2013; Wang et al, 2011).

Contrairement à de nombreux récepteurs nucléaires (NR) qui ont tendance à ne lier que quelques ligands avec des homologies structurales et de bonne affinité, hPXR est capable d'interagir avec un grand nombre de pesticides structuralement diversifiés avec des affinités moyennes ( $K_{ds}$  entre 0,1 et 100  $\mu\text{M}$ ) (Delfosse et al, 2015 ; Lemaire et al, 2006; Mnif et al, 2007). Les ligands connus de hPXR comprennent de nombreux pesticides (Kojima et al, 2010; Lemaire et al, 2006). La cristallisation de hPXR a permis de comprendre sa capacité à lier de nombreux composés chimiques. Tout d'abord, hPXR possède un domaine de liaison du ligand (LBD) grand qui peut accueillir des composés de volume plus important que celui des ligands des autres NR, et deuxièmement, plusieurs boucles du LBD confèrent une forte plasticité permettant au récepteur d'adapter sa forme selon le ligand lié. Nous avons récemment démontré qu'un estrogène pharmaceutique (le 17 $\alpha$ -éthynylestradiol, EE2) et un pesticide organochloré persistant (trans-nonachlor, TNC), à faible activité PXR lorsqu'ils sont seuls, se lient de manière coopérative à hPXR et l'active de façon synergique (Delfosse et al, 2015). Les analyses biophysiques et cellulaires ont montré que chacun des 2 ligands améliore l'affinité de l'autre ligand, de sorte que le mélange binaire se lie avec 100 fois plus d'affinité à hPXR que TNC et EE2 seuls et induit une réponse biologique à des doses auxquelles chaque produit chimique est individuellement inactif. Les structures cristallines à haute résolution ont montré que individuellement EE2 et TNC ne réalisent pas toutes les interactions nécessaires assurant une forte affinité de liaison et une stabilisation efficace de la conformation active du récepteur. En revanche,

quand ils sont associés, EE2 et TNC remplissent une plus grande partie du LBD de hPXR. De plus, huit contacts van der Waals peuvent être mesurés entre EE2 et TNC. Ces contacts inter-ligands stabilisent mutuellement les composés dans le LBD et expliquent l'affinité de liaison améliorée du mélange binaire. Sur la base de ces observations, nous souhaitons développer une analyse plus approfondie des effets de l'exposition de hPXR aux pesticides seuls ou en combinaison.

La sélectivité de liaison de PXR varie nettement parmi les espèces. hPXR est activée par la rifampicine, le SR12813 et le clotrimazole, mais pas la prégnénone-16a-carbonitrile (PCN), alors que le PZR de zèbre (zfPXR) est activé par le PCN et le clotrimazole et non par la rifampicine et le SR12813 (Jones et al, 2000; Moore et al, 2002 ). De même, le clotrimazole est un agoniste plus puissant pour zPXR que pour hPXR (P Balaguer, communication personnelle). Enfin, le prochloraz et l'éconazole sont des agonistes hPXR et des antagonistes de ZfPXR (P Balaguer, communication personnelle). De telles différences inter-espèces dans l'activation de PXR ont des implications importantes pour comprendre les effets des agonistes en physiologie comparative et pour l'utilisation de modèles de poissons pour prédire le risque humain. Dans ce projet, nous proposons d'évaluer différents pesticides actuellement présents dans l'alimentation humaine pour leur capacité à interagir avec hPXR et mPXR. Nous allons caractériser les effets de ces pesticides sur le métabolisme, la chimiorésistance, la croissance et l'agressivité du cancer du colon humain et hépatique.

Comme la fonction de zfPXR dans les poissons est encore mal comprise, nous étudierons également dans in cellulo (cellules ZFL) et in vivo (hépatocytes du poisson zèbre) le rôle du zfPXR sur le métabolisme, la chimiorésistance et la croissance du poisson zèbre. Enfin, nous établirons de nouvelles lignes transgéniques de poissons zèbres, y compris les poissons transgéniques humanisés. Dans l'ensemble, le projet permettra de i) mieux caractériser l'interaction des pesticides autorisés avec hPXR et zfPXR ii) mesurer les effets de ces pesticides sur l'activation des gènes de la hPXR et la prolifération iii) d'identifier les gènes identifiés activés par zfPXR dans le foie iv) générer des poissons transgéniques pour étudier l'activité hPXR et zfPXR in vivo de pesticides.

### **Bibliographie.**

Delfosse V, Dendele B, Huet T, Grimaldi M, Boulahtouf A, Gerbal-Chaloin S, Beucher B, Roecklin D, Muller C, Rahmani R, Cavallès V, Daujat-Chavanieu M, Vivat V, Pascussi JM, Balaguer P, Bourguet W. [Synergistic activation of human pregnane X receptor by binary cocktails of pharmaceutical and environmental](#)

[compounds](#). Nat Commun. 2015 Sep 3;6:8089.

Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon JP, Giudice LC, Hauser R, Prins GS, Soto AM, Zoeller RT, Gore AC. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr Rev.* 2009 Jun;30(4):293-342.

Ekins S, Reschly EJ, Hagey LR, Krasowski MD. Evolution of pharmacologic specificity in the pregnane X receptor. *BMC Evol Biol.* 2008 Apr 2;8:103.

Hotchkiss AK, Rider CV, Blystone CR, Wilson VS, Hartig PC, Ankley GT, Foster PM, Gray CL, Gray LE. Fifteen years after "Wingspread"--environmental endocrine disrupters and human and wildlife health: where we are today and where we need to go. *Toxicol Sci.* 2008 Oct;105(2):235-59.

Jones SA, Moore LB, Shenk JL, Wisely GB, Hamilton GA, McKee DD, Tomkinson NC, LeCluyse EL, Lambert MH, Willson TM, Kliewer SA, Moore JT. The pregnane X receptor: a promiscuous xenobiotic receptor that has diverged during evolution. *Mol Endocrinol.* 2000 Jan;14(1):27-39.

Kodama S, Yamazaki Y, Negishi M. Pregnane X Receptor Represses HNF4 $\alpha$  Gene to Induce Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein IGFBP1 that Alters Morphology of and Migrates HepG2 Cells. *Mol Pharmacol.* 2015 Oct;88(4):746-57.

Kojima H, Sata F, Takeuchi S, Sueyoshi T, Nagai T. Comparative study of human and mouse pregnane X receptor agonistic activity in 200 pesticides using in vitro reporter gene assays. *Toxicology.* 2011 Feb 27;280(3):77-87.

Kubota A, Goldstone JV, Lemaire B, Takata M, Woodin BR, Stegeman JJ. Role of pregnane X receptor and aryl hydrocarbon receptor in transcriptional regulation of p<sub>xr</sub>, CYP2, and CYP3 genes in developing zebrafish. *Toxicol Sci.* 2015 Feb;143(2):398-407.

Krasowski MD, Ai N, Hagey LR, Kollitz EM, Kullman SW, Reschly EJ, Ekins S. The evolution of farnesoid X, vitamin D, and pregnane X receptors: insights from the green-spotted pufferfish (*Tetraodon nigriviridis*) and other non-mammalian species. *BMC Biochem.* 2011 Feb 3;12:5.

Lemaire G1, Mnif W, Pascussi JM, Pillon A, Rabenoelina F, Fenet H, Gomez E, Casellas C, Nicolas JC, Cavailles V, Duchesne MJ, Balaguer P. Identification of new human pregnane X receptor ligands among pesticides using a stable reporter cell system. *Toxicol Sci.* 2006 Jun;91(2):501-9.

Milnes MR1, Garcia A, Grossman E, Grün F, Shiotsugu J, Tabb MM, Kawashima Y, Katsu Y, Watanabe H, Iguchi T, Blumberg B. Activation of steroid and xenobiotic receptor (SXR, NR1I2) and its orthologs in laboratory, toxicologic, and genome model species. *Environ Health Perspect.* 2008 Jul;116(7):880-5.

Mnif W, Pascussi JM, Pillon A, Escande A, Bartegi A, Nicolas JC, Cavaillès V, Duchesne MJ, Balaguer P. Estrogens and antiestrogens activate hPXR. *Toxicol Lett.* 2007 Apr 5;170(1):19-29.

Moore LB, Maglich JM, McKee DD, Wisely B, Willson TM, Kliewer SA, Lambert MH, Moore JT. Pregnane X receptor (PXR), constitutive androstane receptor (CAR), and benzoate X receptor (BXR) define three pharmacologically distinct classes of nuclear receptors. *Mol Endocrinol.* 2002 May;16(5):977-86.

Planque C, Rajabi F, Grillet F, Finetti P, Bertucci F, Gironella M, Lozano JJ, Beucher B, Giraud J, Garambois V, Vincent C, Brown D, Caillo L, Kantar J, Pelegrin A, Prudhomme M, Ripoche J, Bourgaux JF, Ginestier C, Castells A, Hollande F, Pannequin J, Pascussi JM. Pregnane X-receptor promotes stem cell-mediated colon cancer relapse. *Oncotarget.* 2016 Aug 30;7(35):56558-56573.

Pondugula SR, Pavek P, Mani S. Pregnane X Receptor and Cancer: Context-Specificity is Key. *Nucl Receptor Res.* 2016 Jun 12;3. pii: 101198.

Wang H, Venkatesh M, Li H, Goetz R, Mukherjee S, Biswas A, Zhu L, Kaubisch A, Wang L, Pullman J, Whitney K, Kuro-o M, Roig AI, Shay JW, Mohammadi M, Mani S. Pregnane X receptor activation induces FGF19-dependent tumor aggressiveness in humans and mice. *J Clin Invest.* 2011 Aug;121(8):3220-32.

## **5 – Le projet concerné (descriptif du contenu du projet)**

### Description détaillée des objectifs poursuivis

L'identification de pesticides avec un potentiel perturbateur endocrinien parmi tous ceux qui sont utilisés dans le monde est un défi majeur dans la lutte contre les effets néfastes de ces composés. L'objectif de ce projet est de tester un certain nombre de pesticides trouvés dans l'alimentation humaine, afin d'identifier ceux qui ont des activités hPXR et zfPXR en utilisant des outils d'analyse cellulo, in silico et in vivo. Les effets toxicologiques de ces pesticides seront évalués pour leur capacité à activer hPXR et zfPXR à la fois in vitro et in vivo. Le choix des pesticides à étudier a été effectué sur la base du rapport ANSES sur l'étude du régime alimentaire total (EAT2). Nous évaluerons 39 pesticides (tableau I ci-dessous) pour leur capacité à activer hPXR et zfPXR seul ou en combinaison.

La première partie de ce projet (réalisée par P Balaguer, partenaire 1) vise à tester les pesticides pour leur activité hPXR et zfPXR dans les lignées de cellules rapporteurs humains et de poissons zèbres. La capacité des pesticides à induire l'expression de la luciférase et gènes cibles endogènes de PXR sera comparée à celle du SR12813 pour lhPXR et du clotrimazol pour zfPXR. La deuxième partie du

projet (réalisée par W Bourguet, partenaire 2) consiste à comprendre structurellement l'interaction différentielle de ces pesticides avec hPXR et zfPXR. La troisième partie (réalisée par P Gonzalez, partenaire 3) tentera d'identifier les différentes voies moléculaires activées par zfPXR dans les hépatocytes adultes et les cellules cancéreuses hépatiques ZFL. Enfin, la dernière partie du projet (réalisée F Brion, partenaire 4) consistera à tester in vivo sur des poissons-zèbre l'effet des pesticides sur les gènes cibles de PXR, car la biodisponibilité et la pharmacodynamique de certains pesticides peuvent influencer les réponses in vivo. Ce consortium comprend quatre partenaires qui apportent des compétences complémentaires à ce projet. L'originalité et la force du consortium reposent sur l'expertise des partenaires dans leurs domaines respectifs et leur niveau élevé de complémentarité. Tous les partenaires ont une grande expertise dans l'étude des perturbateurs endocriniens et de leurs interactions avec les récepteurs nucléaires humains et de poisson zèbre ainsi que le développement de pathologies associées. Patrick Balaguer (équipe 1) sera le coordinateur. La coordination sera très facilitée en raison de la qualité du consortium et des relations de collaborations amicales de longue date existantes entre les partenaires (31 articles réunissant de 2 à 3 des partenaires).

#### Originalité et caractère novateur du projet

L'effet perturbateur endocrinien des pesticides a été bien documenté pour la fonction reproductrice. L'effet des pesticides sur hPXR a également été étudié, mais peu de travaux ont porté sur la résistance aux médicaments anticancéreux et à la prolifération tumorale. Dans le projet, nous proposons d'étudier les effets des pesticides (seul ou en combinaison) sur l'expression des gènes, la résistance aux médicaments anticancéreux et la prolifération des cellules de cancer du côlon et du foie. Comme le rôle du PXR n'est pas parfaitement compris chez le poisson zèbre, nous proposons également de caractériser l'interaction entre les pesticides et le zfPXR et d'étudier l'action de zfPXR sur la régulation des enzymes de détoxification de phase I, de phase II et de transport. En associant des technologies de pointe, test d'activité dans des lignées cellulaires bioluminescentes, tests de viabilité et prolifération, cristallographie aux rayons X, l'analyse génomique et expériences in vivo sur des poissons transgéniques, le projet PestR devrait permettre de mieux comprendre les effets des pesticides sur PXR chez l'homme et le poisson.

#### Intérêt pour le plan Écophyto

Ce projet fait partie de l'axe 2 du plan Ecophyto II visant à accroître la connaissance des risques associés aux produits phytopharmaceutiques et leur impact sur la santé des humains et des poissons. Il vise à mieux caractériser les risques associés à l'exposition à ces produits sur la santé humaine, en particulier en ce qui concerne la résistance aux médicaments anticancéreux du cancer du côlon et du foie. Ce projet vise également à mieux comprendre l'action des pesticides sur le PXR humain et de poisson. Les résultats que nous obtiendrons fourniront des données utiles aux organismes d'évaluation des risques et fourniront des tests pertinents pour l'évaluation de l'effet toxique des produits phytopharmaceutiques à la fois in vitro et in vivo chez les humains et les poissons. Le projet vise également à valider différentes approches complémentaires pour détecter les pesticides soupçonnés d'être actifs sur les récepteurs nucléaires. Le projet est axé sur un seul récepteur (PXR), mais la stratégie développée dans PestR pourrait être appliquée à d'autres cibles NR des pesticides (récepteurs des œstrogènes, des androgènes, des hormones thyroïdiennes et récepteur CAR).

Structuration du projet et méthodologie mise en œuvre : *Présentation des tâches à mettre en œuvre*

**Tâche 1. Coordination du projet. Responsable P. Balaguer. Participants, tout les autres partenaires.**

Une réunion de démarrage sera organisée au début du projet avec tous les participants à Montpellier (emplacement de l'équipe 1-2). Des rencontres annuelles auront lieu à Paris (équipe 4), à Bordeaux (équipe 3) et à Montpellier, respectivement. Des visioconférences (au moins une par an) seront organisées sur demande de partenaires. Des rapports seront écrits suite de la réunion concernant et noteront la progression du projet et les problèmes rencontrés. Les rapports écrits seront adressés au PNRPE sur demande

**Tâche 2. Caractérisation de l'activité hPXR et zfPXR des pesticides. Responsable P Balaguer (IRCM). Participant S Aït-Aïssa (INERIS).**

Cette tâche sera consacrée à l'identification des pesticides actifs sur hPXR et zfPXR. 39 pesticides, 3 ligands agonistes de hPXR et 5 fongicides agonistes ou antagonistes de zfPXR (tableau II) seront testés pour leur capacité à moduler l'expression de la luciférase dans quatre lignées de cellules rapporteurs (Tableau I).

La première étude sera réalisée avec les cellules HG5LN hPXR (Creusot et al, 2010; Delfosse et al, 2015; Lemaire et al., 2006, Mnif et al., 2007) et zfPXR (cellules Hela exprimant Gal4 (DBD)-PXR (LBD) et exprimant GALRE-luciférase) qui permettent de mesurer l'activité des ligands de PXR sur l'expression de la luciférase. L'efficacité et la potentialité des pesticides seuls ou en combinaison binaire seront déterminées par comparaison avec le SR12813, la rifampicine et le T0901317 (composés de référence pour hPXR) et le clotrimazol, le fenbuconazol et le propiconazole (composés de référence pour zfPXR).

Les pesticides seront également testés pour leur activité hPXR dans les cellules LS174T (cellule de cancer du colon humain) et HEPG2 (cellules cellulaires du cancer du foie humain) transfectées de manière stable avec un plasmide d'expression de hPXR et un plasmide contenant le gène de la luciférase sous le contrôle d'une partie du promoteur CYP3A4 humain (région -7800/ -7200 fusionnée à la région -53/ +11) (Delfosse et al, 2015). Ces cellules permettent de mesurer l'activité de hPXR dans un contexte cellulaire différent et où le métabolisme est plus important que dans les cellules HeLa. Dans ces cellules, les pesticides les plus actifs seront également testés pour leur effet sur l'expression de gènes cibles de PXR (CYP3A4, CYP2B6, ABCG2, UGT1A1, MDR1 et FGF19) par RT-PCR. Nous étudierons également l'action des pesticides les plus actifs sur la résistance aux agents anticancéreux et la prolifération cellulaire, l'agressivité et l'invasivité in vitro (comme en témoignent les tests de viabilité, l'analyse du cycle cellulaire par cytométrie de flux, tests de migration). Encore une fois, l'efficacité et la potentialité des pesticides seront comparées aux composés de référence de hPXR.

Pour tester les pesticides pour leur activité zfPXR dans un contexte cellulaire différent et un métabolisme plus important, nous transfecterons de manière stable les cellules ZFL (lignées cellulaires de cancer du foie de poisson zèbre) avec le plasmide d'expression de zfPXR et le plasmide hCYP3A4-luciférase. Nous avons déjà vérifié par transfection transitoire que zfPXR est capable d'activer le promoteur CYP3A4 humain dans le contexte cellulaire ZFL. Dans ces cellules, les composés les plus actifs seront également testés pour leur effet sur l'expression naturelle des gènes (CYP3A65, ABCB4). Encore une fois, l'efficacité et la puissance des pesticides seront comparées aux composés de référence de zfPXR.

Pesticide	Nom	hPXR	Référence	zfPXR	Référence	Class
herbicide	Oxadiazon	agonist	Lemaire et al, 2006			Oxadiazole
herbicide	Cypermethryn	agonist	Lemaire et al, 2006			Pyrethroid
herbicide	Terbutylazine	agonist	Creusot et al, 2010			Triazine
herbicide	Linuron	agonist	Creusot et al, 2010			Urea
herbicide	Diuron	agonist	Lemaire et al, 2006			Urea
herbicide	Chlorotoluron	agonist	Creusot et al, 2010			Urea
herbicide	Chlorsulfuron	agonist	Creusot et al, 2010			Urea
herbicide	Nicosulfuron	agonist	Creusot et al, 2010			Urea
herbicide	azimsulfuron	agonist	Lemaire et al, 2006			Urea
herbicide	Mecoprop	agonist	Lemaire et al, 2006			Azyloxyacide
herbicide	Bifenox	agonist	Kojima et al. 2010			diphenyl ether
herbicide	Oxyfluorfen	agonist	Kojima et al. 2010			diphenyl ether
herbicide	Fenamiphos	agonist	Kojima et al. 2010			Organophosphorus
herbicide	Chlorpyrifos	agonist	Kojima et al. 2010	agonist	*	Organophosphorus
herbicide	Toldofos-methyl	agonist	Kojima et al. 2010			Organophosphorus
herbicide	Pirimiphos-methyl		Kojima et al. 2010			Organophosphorus
herbicide	Ethoprophos		Kojima et al. 2010			Organophosphorus
herbicide	Pyrethrin	agonist	Kojima et al. 2010			Pyrethroid
herbicide	Deltamethryn	agonist	Kojima et al. 2010			Pyrethroid
herbicide	Fluvalinate	agonist	Kojima et al. 2010			Pyrethroid
herbicide	Terfuthrin	agonist	Kojima et al. 2010			Pyrethroid
herbicide	Etofenprox	agonist	Kojima et al. 2010			Pyrethroid
herbicide	Diethofencarb	agonist	Kojima et al. 2010			Carbamate
herbicide	Chlorpropham	agonist	Kojima et al. 2010			Carbamate
herbicide	Flutolanil	agonist	Kojima et al. 2010			Carbamate
herbicide	Propyzamide	agonist	Kojima et al. 2010			Carbamate
herbicide	Metalaxyl	agonist	Kojima et al. 2010			Carbamate
herbicide	Pencycuron	agonist	Kojima et al. 2010			Urea
herbicide	Pendimethalin	agonist	Kojima et al. 2010			Urea
herbicide	2-Phenylphenol	agonist	Kojima et al. 2010			Urea
herbicide	Triflumizole	agonist	Kojima et al. 2010			Urea
herbicide	Cyproconazole					Azole
herbicide	Tebuconazole					Azole
herbicide	Epoxiconazole	agonist	*	agonist	*	Azole
herbicide	Penconazole					Azole
herbicide	Difenoconazole	agonist	*			Azole
insecticide	Fipronil	agonist	Lemaire et al, 2006			Pyrazole
insecticide	Diflubenzuron	agonist	Lemaire et al, 2006			Urea
insecticide	Thiabendazole	agonist	Lemaire et al, 2006			Thiazole
<b>Composés de référence hPXR</b>						
Cholesterol lowering drug	SR12813	agonist	Delfosse et al, 2015			
antibiotic	Rifampicine	agonist	Delfosse et al, 2015			
synthetic compound	T0901317	agonist	Delfosse et al, 2017			
<b>Composés de référence zfPXR</b>						
fungicide	Econazole	agonist	*	antagonist	*	Azole
fungicide	Propiconazole	agonist	Lemaire et al, 2006,	agonist	*	Azole
fungicide	Fenbuconazole	agonist	Lemaire et al. 2006	agonist	*	Azole
fungicide	Prochloraz	agonist	Lemaire et al. 2006	antagonist	*	Azole
fungicide	Clotrimazole	agonist	Creusot et al, 2010	agonist	Moore et al, 2002	Azole

Table I (\* communication personnelle)

Nom de la cellule rapporteur	Origine cellulaire	Récepteur Nucléaire	Gène rapporteur	Statut de la lignée cellulaire
HG5LN hPXR	HeLa (humaine, utérus)	GAL4(DBD)- hPXR(LBD)	GAL4RE <sub>5</sub> - βGlobine- Luciférase	Etablie et validée (Lemaire et al 2006; Delfosse et al, 2015)
HG5LN zfPXR	HeLa (human, utérus)	GAL4(DBD)- zfPXR(LBD)	GAL4RE <sub>5</sub> - βGlobin- Luciférase	Etablie et non validée
LS174T hPXR	LS174T (humain, colon)	hPXR WT	hCYP3A4- Luciférase	Etablie et validée (Delfosse et al, 2015)
HEPG2 hPXR	HepG2 (humain, foie)	hPXR WT	hCYP3A4- Luciférase	Etablie et validée (Delfosse et al, 2015)
ZFL zfPXR	ZFL (poisson-zèbre, foie)	zfPXR WT	hCYP3A4- Luciférase	Non établie

Table II

### **Tâche 3. Analyses structurales des interactions des pesticides avec hPXR et zfPXR. Responsable W Bourguet (CBS). Participant P Balaguer (IRCM).**

Les objectifs de cette tâche sont (i) de caractériser les interactions entre zfPXR et les pesticides identifiés dans la Tâche 2 et (ii) de déterminer les différences de structure qui entre le récepteurs humain et d poisson zèbre. Cette tâche sera effectuée par le partenaire 2 en collaboration avec le partenaire 1.

Ces expériences seront réalisées en utilisant des LBD de hPXR et zfPXR purifiés. Les procédures d'expression et de purification de hPXR LBD sont bien établies pour le récepteur humain mais restent à déterminer pour le zfPXR. La procédure de préparation générale de hPXR LBD est la suivante: (i) expression dans *Escherichia coli* BL21 (DE3), (ii) lyse des cellules (ultrasons) et centrifugation, (iii) chromatographie d'affinité, (iv) chromatographie à échange d'ions et (v) Filtration sur gel.

Les LBD de hPXR et de zfPXR seront concentrés et soumis à une série d'analyses biophysiques pour caractériser leur interaction avec les pesticides. Cette tâche comprend la détermination des affinités de liaison à l'aide de techniques de FRET (TR-FRET, Invitrogen) et de calorimétrie (ITC).

En parallèle, nous résoudrons les structures cristallines des LBD de hPXR et de zfPXR en complexe avec les pesticides. Les conditions de cristallisation pour les complexes hPXR ont déjà été déterminées par le partenaire 2 qui a mis au point

l'expression et la purification en grande quantité du LBD de PXR (Delfosse et al, 2015). Les conditions de cristallisation des complexes zfPXR devront par contre être déterminées. Après la dernière étape de purification, les pesticides seront incorporés dans les échantillons de protéines purifiées et les complexes PXR/pesticides seront concentrés. Les essais de cristallisation seront faits à l'aide de robots de cristallisation disponibles au sein du laboratoire du Partenaire 2 (robots de cristallisation nano X8, système de visualisation automatique MDL CrystalPro). Les tests préliminaires de diffraction aux rayons X et la collecte des données seront réalisés avec notre équipement interne. Des données de diffraction à haute résolution seront collectées au Centre européen de rayonnement synchrotron (ESRF, Grenoble). Les structures seront résolues par remplacement moléculaire en utilisant les structures connues de hPXR.

**Tâche 4. Identification des voies de signalisation actives par les pesticides dans le contexte hépatique. Responsable P Gonzalez (EPOC), Partenaires S Aït-Aïssa and F Brion (INERIS).**

L'objectif principal de cette tâche consistera à déterminer les différentes voies de signalisation activées par PXR dans un modèle de poisson. En effet, alors que l'interaction de PXR de nombreux xénobiotiques est bien connue, la plupart des gènes réglementés par PXR sont encore mal connus, en particulier chez les poissons. En outre, des outils spécifiques de criblage de zfPXR manquent encore. Le deuxième objectif est de comparer l'approche cellulaire et l'approche in vivo. Dans ce contexte, le poisson-zèbre adulte sera exposé à trois conditions différentes; contrôle, prochloraz (un antagoniste de zfPXR) et clotrimazole (un agoniste de zfPXR) pendant une semaine. Les partenaires bénéficieront des installations et du savoir-faire de l'INERIS pour la réalisation de cette expérience. Après l'exposition, le foie sera récolté et l'ARN total de chaque condition sera extrait et soumis à une analyse par séquençage à haut débit (RNAseq) à l'aide de technologies NGS (illumina). Pour chaque condition, quatre analyses différentes seront effectuées pour tenir compte de la variabilité inter-individuelle. La comparaison des trois bases de données obtenues sera très intéressante pour avoir une vue d'ensemble des impacts cellulaires des pesticides. Il permettra également une meilleure compréhension des différentes voies de signalisation sous le contrôle de zfPXR et si d'autres mécanismes d'activation sont impliqués (à travers AhR, par exemple). Des logiciels de recherche et de visualisation de réseaux d'interactions moléculaires comme Ingenuity seront utilisés. Une telle approche pourrait identifier des gènes

cibles de zfPXR et devenir des biomarqueurs pour démontrer l'exposition aux pesticides. D'une seconde façon, une expérience en cellulo sera effectuée. En effet, les cellules ZFL-zfPXR du foie du poisson zèbre seront exposées aux mêmes conditions que celles in vivo. Par la suite, la technologie RNAseq sera également utilisée avec 4 réplicats par condition. Comme décrit précédemment, les gènes activés par le zfPXR seront également déterminés. La comparaison entre les bases de données in vivo et in cellulo permettra de déterminer si des différences existent et indiquera la pertinence et la précision des résultats en utilisant l'approches in vitro çà l'aide de cellules ZFL.

**Tâche 5. Etablissement de lignées de poisson-zèbre transgéniques et leur utilisation pour mesurer l'activité hPXR et zfPXR de pesticides. Responsable F Brion (INERIS) et F Sohm (UMS Amagen) sous-contractant.**

Comme mentionné ci-dessus, PestR fournira de nouvelles connaissances au niveau structural et moléculaire des interactions entre le PXR humain et le poisson zèbre et les pesticides en se basant des techniques in silico et cellulaires (lignées rapporteurs) (tâche 1 et tâche 2). L'objectif de cette tâche 5 est d'étudier ces interactions au niveau de l'organisme entier et leur effet sur les gènes régulés par PXR, car la biodisponibilité et la pharmacodynamique de certains pesticides doivent modifier les réponses in vivo.

Le développement de modèles pertinents in vivo pour étudier les interactions entre le PXR humain et le poisson zèbre et les pesticides est un défi d'actualité. Cela est particulièrement vrai pour le PXR humain car les modèles de mammifères tels que le rat et la souris ne sont pas adaptés pour prédire les effets des xénobiotiques sur l'homme humain (Kubota et al, 2015) en raison des différences importantes inter-espèces pour ce récepteur. Chez les poissons, la plupart des gènes régulés par PXR sont encore méconnus, bien que certains gènes appartenant à la famille des cyp3a (CYP3A65) ont été identifiés comme étant régulés, au moins en partie, par PXR.

Pour surmonter ces difficultés, notre stratégie sera basée sur la mise en place de nouveaux modèles de poissons génétiquement modifiés pour identifier les effets des médicaments et des pesticides dans le poisson zèbre (*Danio rerio*), un modèle de vertébré qui est maintenant largement utilisé en écotoxicologie et en pharmacologie. Les organismes modèles à base de poissons zèbres comme le poisson zèbre transgénique sont des systèmes puissants pour étudier les effets des

produits chimiques sur l'expression des gènes à des stades précoces et sensibles du développement. L'utilisation d'embryons transparents permet l'observation directe et la quantification de protéines fluorescentes sous le contrôle du promoteur de gènes ciblés (p. Ex. Brion Et al, 2012).

Dans le cadre de PestR, plusieurs lignes transgéniques de poissons zèbres seront établies, y compris des poissons transgéniques humanisés.

Le premier modèle transgénique exprimera un PXR humain chimérique contenant le domaine de liaison du ligand hPXR fusionné au domaine de liaison de l'ADN de la protéine Gal4 de levure ainsi que la GFP sous le contrôle du promoteur de Gal4 (GAL4RE-GFP). Cette construction devrait nous permettre d'étudier des composés qui interagiront avec le LBD de la hPXR sans aucune interférence avec la le zfPXR endogène. Une deuxième lignée transgénique exprimera GFP sous le contrôle du promoteur Cyp3A4 humain génétiquement modifié et nous permettra d'étudier l'activation du gène hCyp3A4 par des ligands zfPXR. Enfin, deux lignées transgéniques exprimant la GFP sous le contrôle du promoteur du gène Cyp3a65 seront établies. La première contiendra le promoteur du CYP3A65 avec tous les éléments de réponse putatifs de PXR ainsi que l'élément de réponse à la dioxine identifié dans la région du promoteur. Dans la deuxième lignée, le DRE sera muté dans le promoteur du CYP3A65 (Cyp3a65 (DREmut) GFP). La comparaison du profil d'expression de la GFP entre le Cyp3a65-GFP transgénique et le Cyp3a65 (DREmut)-GFP permettra de déterminer les rôles respectifs de zfPXR et zfAhR sur la régulation de l'expression du gène Cyp3a65.

La caractérisation de chaque ligne de poisson zèbre transgénique (F2 +) sera réalisée par imagerie de fluorescence in vivo dans des embryons et larves de poissons zèbres exposés à des ligands antagonistes et agonistes spécifiques de hPXR et de zfPXR (identifiés dans la tâche 1). Cette tâche nous permettra de déterminer la spécificité et la fiabilité des réponses GFP dans les poissons transgéniques exposés aux ligands PXR et de définir les conditions d'exposition optimales pour étudier l'interaction et l'effet des pesticides sur les récepteurs hPXR et zfPXR.

We expect to establish new approaches based on in vivo fluorescence imaging in zebrafish embryos to screen the activity of pesticides. Such approaches could be extended to any other pharmacological compounds or xenobiotics to predict effect on human and fish in a human and an environmental hazard and risk assessment perspective.

Dans l'ensemble, les objectifs de cette tâche au sein de PestR sont de développer de nouvelles lignes transgéniques de poissons zèbres in vivo dont un modèle humanisé pour tester les effets des pesticides sur hPXR et zfPXR. Il s'agit d'établir de nouvelles approches basées sur l'imagerie de fluorescence in vivo dans des embryons de poisson-zèbres pour étudier l'activité des pesticides. De telles approches pourront être généralisées à d'autres composés pharmacologiques ou à xénobiotiques pour prédire l'effet sur l'homme et le poisson dans une perspective d'évaluation des risques pour l'homme et l'environnement.

### **Tableau résumé des tâches**

Mois 0

Tâche 1. Réunion de début de projet. Coordinateur P Balaguer Partner I (INSERM-IRCM). Participants : tous les partenaires.

Mois 3:

Tâche 2. Fin du criblage des pesticides avec les lignées cellulaires HG5LN hPXR et zfPXR. P Balaguer, partenaire 1, INSERM-IRCM.

Tâche 5. Fin de l'établissement des vecteurs d'expression de poisson-zèbre. François Brion, partenaire 4 INERIS.

Mois 7 :

Tâche 2. Fin du criblage des pesticides avec les lignées cellulaires LS-174T et HEPG2 hPXR 3A4-luciferase. P Balaguer, partenaire 1, INSERM-IRCM.

Tâche 3. Fin de l'expression et de la purification du LBD de PXR humain et poisson-zèbre. W Bourguet (INSERM-CBS). partenaire 2.

Tâche 5. Fin de la sélection des meilleurs poissons-zèbres zebrafish pour la transgénèse. F Sohm Amagen sub-contractant of François Brion, partenaire 4 INERIS.

Mois 9 :

Tâche 2. Fin de l'établissement de la lignée cellulaires ZFL zfPXR 3A4-luciferase. P Balaguer, partenaire 1, INSERM-IRCM.

Tâche 5. Obtention de poissons transgéniques prêts pour la reproduction. F Sohm Amagen sous-contractant de François Brion, partenaire 4 INERIS.

Mois 13 :

Tâche 1. Réunion annuelle à Paris. Participants : tous les partenaires.

Tâche 2. Fin du criblage des pesticides avec les lignées cellulaires ZFL zfPXR 3A4-. P Balaguer, partenaire 1, INSERM-IRCM.

Tâche 2. Fin des expériences de RT-PCR, de prolifération cellulaire, de criblage des pesticides dans les lignées cellulaires LS-174T and HEPG2 hPXR 3A4-luciferase. P Balaguer, partenaire 1, INSERM-IRCM.

Tâche 3. Fin des mesures d'affinité par les techniques d'ITC et de TR-FRET des pesticides pour les LBD de hPXR and zfPXR. W Bourguet (INSERM-CBS). partenaire 2.

Mois 19

Tâche 1. Rapport intermédiaire. Responsable P Balaguer, partenaire 1 (INSERM-IRCM), participants : tous les partenaires.

Tâche 4. Détermination des différentes voies d'activation chez le poisson-zèbre adulte. W Gonzalez (EPOC). Partenaire 3.

Task 5. Obtention des générations F1 et F2 de poissons transgéniques. F Sohm Amagen sous-contractant of François Brion, partenaire 4 INERIS.

Mois 25

Tâche 1. Réunion annuelle à Bordeaux. Participants : tous les partenaires.

Tâche 2. Fin des expériences de RT-PCR avec les pesticides dans la lignée cellulaire ZFL zfPXR 3A4-luciferase cells. S Aït-Aïssa, partenaire 4, INERIS.

Tâche 3. Fin des expériences de cristallisation et détermination des structures des complexes hPXR/pesticides. W Bourguet (INSERM-CBS). partenaire 2.

Tâche 4. Détermination des différentes voies d'activation de zfPXR dans les lignées cellulaires ZFL-zfPXR. W Gonzalez (EPOC). partenaire 3.

Tâche 5. Fin de la caractérisation des lignées transgéniques de poisson-zèbre en utilisant l'imagerie in vivo dans des larves traitées avec les différents ligands agonists et antagonists de hPXR et de zfPXR. F Sohm Amagen sub-contractant of François Brion, partenaire 4 INERIS.

Mois 31

Tâche 3. Fin des expériences de cristallisation et détermination des structures des complexes zfPXR/pesticides. W Bourguet (INSERM-CBS). partenaire 2.

Mois 35

Tâche 3. Fin de l'analyse structurale et rédaction d'article. W Bourguet (INSERM-CBS). partenaire 2.

Tâche 5. Fin de l'étude in vivo des pesticides agissant à travers hPXR et zfPXR. Les pesticides les plus intéressants seront sélectionnés selon les résultats obtenus dans les tâches 1 et 2 (études in vitro et in silico des interactions entre pesticides et hPXR et zf PXR). F Sohm Amagen sous-contractant de François Brion, partenaire 4 INERIS.

Mois 36

Tâche 1. Réunion de fin de projet à Montpellier.

Tâche 2. Rapport final. Responsable: P Balaguer, partenaire 1 (INSERM-IRCM), participants : tous les partenaires.

#### Principales difficultés qui pourraient être rencontrées et moyens d'y répondre (solutions de repli).

Ce projet est basé sur la mise en œuvre de tests de gènes rapporteurs in vitro et in vivo. Si la plupart des modèles in vitro sont déjà disponibles, l'établissement de modèles transgéniques in vivo sera plus difficile. En fait, quatre modèles seront développés dans ce projet. En particulier, l'établissement de poissons zèbres humanisés exprimant le récepteur PXR humain présente un risque élevé car à notre connaissance aucun poisson zébré humanisé n'a été établi à ce jour. Néanmoins, l'expérience et l'habitude de collaborer ensemble du partenaire 4 et d'Amagen permet d'être optimiste quand aux chances de succès.

#### Modalités de pilotage et de suivi du projet : partenaires, compétences et moyens humains

##### **Partenaire 1 and coordinateur du projet.**

##### **Team 1. IRCM/INSERM.**

Patrick Balaguer DR2 INSERM 16,7%, A Boulahtouf IE ICM 16,7%, M Grimaldi IE ICM 16,7%. L'équipe est spécialisée dans l'étude des PE au niveau moléculaire et cellulaire. Les publications récentes en lien avec la proposition actuelle concernent la liaison des PE (comme BPA) à ER et une analyse de la base moléculaire des effets synergiques de différents PE (dans Toxicol Appl Pharmacol, Toxicol Sci, Environ Health Perspect, PNAS, Nature Commun).

### **Team 2. CBS/INSERM.**

William Bourguet DR1 INSERM 16,7%, Vanessa Delfosse CR2 CNRS 16,7%. William Bourguet et Vanessa Delfosse apportent une solide expertise dans la détermination de la structure des NR à l'aide de la cristallographie aux rayons X. Ils mèneront les aspects de biologie structurale du projet. William Bourguet a publié plus de 50 papiers originaux (dans Nature, Science, Nat. Commun, Mol. Cell, Nat. Struct. Mol. Biol., PNAS), 13 revues (Nat Rev Drug Discov, Cell Mol Life Science, Methods Enzymol) et 9 chapitres de livres.

### **Partner 3:**

Patrice Gonzalez CR1 CNRS 16,7% est un écotoxicologue spécialisé en biologie moléculaire qui a développé une analyse de séquençage à haut débit des gènes dans divers modèles aquatiques (invertébrés, poissons) pour étudier les voies moléculaires à travers lesquelles les polluants aquatiques agissent. Il a de solides compétences et expertises dans l'analyse des réseaux d'interactions moléculaires dans les organismes vivants.

### **Partner 4: INERIS.**

Dr. François Brion 8,33%, Sélim Aït-Aïssa 8,33%. Domaine de compétence : endocrinologie des poissons et physiologie de la reproduction, développement et validation de méthodes in vivo (poisson-zèbre) pour l'étude des PE. Biologie cellulaire, développement de modèles cellulaires in vitro, élaboration d'une analyse dirigée par l'effet pour identifier les PE dans les matrices environnementales. L'INERIS est équipé d'installations à la pointe de la technologie pour l'entretien et l'élevage de poisson-zèbres sauvages et transgéniques. L'unité est équipée de laboratoires de culture cellulaire, biochimique et moléculaire et de postes de travail robotiques. L'unité dispose d'une plate-forme d'imagerie comprenant des microscopes et des systèmes fluorescents et confocaux pour l'imagerie fluorescente et bioluminescente in vivo.

### Résultats attendus, notamment en termes de réduction de l'utilisation des produits phytopharmaceutiques, et des risques et des impacts associés

L'un des principaux résultats du projet est l'établissement de nouveaux outils in vitro et in vivo qui serviront à étudier l'interaction des pesticides avec le PXR humain et

de poisson zèbre ainsi que l'acquisition de nouvelles connaissances concernant l'effet potentiel des pesticides sur ce récepteur chez les vertébrés en tenant compte des différences inter-espèces. Ceci permettra de mieux caractériser le danger de ces pesticides pour la vie humaine et sauvage. Les approches combinant des outils de criblage in vitro et in vivo que nous avons développé pour PXR pourront être étendues à tout autre pesticide ou xénobiotique pour l'évaluation des risques pour les humains et les poissons.

#### Livrables attendus et valorisation des résultats au bénéfice d'Écophyto

Les résultats du projet seront diffusés sous forme de publications scientifiques à comité de lecture (rang A) et de posters et de communications orales lors de congrès. Les publications dans les journaux à accès libre et/ou à fort facteur d'impact seront fortement encouragées afin d'atteindre le plus large public possible. Les sujets des publications seront l'établissement et la validation de nouvelles lignées cellulaires et la différence inter-espèces de PXR. En ce qui concerne l'évaluation des dangers des pesticides étudiés, les résultats seront mis en ligne sur des bases de données telles que les "substances" d'INERIS Ou «EMPODAT» de NORMAN et seront donc librement disponibles pour les scientifiques et le grand public. Les livrables du projet seront remis au rapport intermédiaire (à 18 mois) et un rapport final à la fin du projet.

*N.B. Le rapport final ainsi que toute valorisation publique du projet seront accessibles librement 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...)**

Le coût total du projet "Activation du récepteur PXR PestR humain et de poisson zèbre par des pesticides" est de 470609,80 € dont 95180,60 € sont admissibles à une subvention.

## **7 – Le calendrier prévisionnel de réalisation**

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** : 01 novembre 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 : 36 mois.

Période de remise du rapport scientifique ou technique intermédiaire (sauf pour les projets d'un an) : 01 mai 2019.

- au référent Écophyto II : à mi-projet en partant de la signature de la convention : 01 mai 2019.

- et à l'Onema (rapport validé) : à mi-projet +6 mois après la signature de la convention. demi-point + 6 mois après la signature de l'accord : 01 novembre 2019.

Période de remise du rapport scientifique ou technique final : 31 octobre 2020

- au référent Écophyto II à l'issue de la durée du projet : 31 octobre 2020

- et à l'Onema (rapport validé) au plus tard à la durée du projet + 12 mois : 31 octobre 2021

**8 – Une annexe financière par partenaire (cf. format joint) + un récapitulatif = annexe financière du projet au format Excel.**

Chaque partenaire signe sa propre fiche. Le coordinateur (et le service financier d'appui) signe la fiche récapitulative.