

Plan Écophyto II – Appel à projets de recherche PNRPE
Programme « 2016 »
Écophyto Plan II - Call for research projects PNRPE
Program "2016"

« ACRONYME ET NOM COMPLET DU PROJET »

SYNEPEST : Criblage de pesticides perturbateurs métaboliques, activation synergique *in vitro* et *in vivo* des récepteurs nucléaires CAR et PXR

"ACRONYM AND FULL NAME OF THE PROJECT"

SYNEPEST : Screening of metabolic disrupting pesticides, *in vitro* and *in vivo* synergistic activation of CAR and PXR xenosensors

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

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

Date de la demande: 18 février

Date of demand: February 18th

Mots clefs (5 au maximum) : Perturbateur métabolique, Récepteurs nucléaires, pesticides, NAFLD/NASH

Key words (5 maximum): metabolic disruptor, nuclear receptors, pesticides, NAFLD/NASH

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: Laila LAKHAL

Organisme employeur / **Employer organization:** INRA

Représenté par *nom, prénom* / **Represented by name, first name:** Stéphanie Bréhin

Adresse / **Address:** chemin de Borde-Rouge, Auzeville BP 52627, 31326 Castanet-Tolosan cedex

Téléphone / **Phone number:** 05 61 28 50 28

Mail / **E-mail address:** Stepanie.Brehinnra.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):**

LAKHAL Laila Unité INRA/Toxalim

180 chemin de Tournefeuille

31027 Toulouse

Laila.lakhal@inra.fr

0582066335

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

Bernard Salles, Bernard.salles@inra.fr, 0582066402

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

Lebret Joelle, Joelle.Lebret@inra.fr, 0582066323

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 (Coordinateur)

Equipe Toxicologie Intégrative et Métabolisme, UM1331 Toxalim, Toulouse.

Partenaire 2

Equipe Signalisation hormonale et cancer de l'Institut de Recherche en cancérologie de Montpellier (IRCM) INSERM U1194.

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.](#)

La subvention de l'ONEMA pourra être versée au coordonnateur du projet dans son intégralité ou selon un échéancier convenu entre les deux parties (financeur et coordonnateur). Le coordonnateur pourra effectuer par la suite des versements au partenaire 2 du projet selon des modalités qui seront établies par une convention de reversements.

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](#)

Partenaire 2

Equipe Signalisation hormonale et cancer de l'Institut de Recherche en cancérologie de Montpellier (IRCM) INSERM U1194

Responsable Projet : Patrick Balaguer, patrick balaguer, patrick.balaguer@montpellier.unicancer.fr

04 67 61 24 0

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

Les stéatoses hépatiques non alcooliques sont des maladies en constante augmentation et pour lesquelles il n'existe actuellement aucun traitement. Les contaminants environnementaux, dont les pesticides sont suspectés de contribuer à leur occurrence et/ou leur évolution vers des formes plus sévères en conduisant à des perturbations endocrino-métaboliques. Les récepteurs nucléaires CAR et PXR sont suspectés d'être les médiateurs de l'effet des pesticides sur le développement de ces perturbations endocrino-métaboliques du fait de leur fonction de carrefour entre détoxification, endocrinologie et métabolisme énergétique. L'objectif de ce projet est de cribler un nombre important de pesticides parmi ceux retrouvés dans notre alimentation (étude de l'alimentation totale ou EAT2 de l'ANSES) par rapport à leur caractère stéatogène. Ce projet comporte un criblage *in vitro* des pesticides activant les formes murines et humaines des récepteurs nucléaires CAR et PXR. Une étude *in vivo* sur modèles de souris transgéniques permettra d'évaluer les conséquences de ces activations ou co-activations sur le développement de perturbations endocrino-métaboliques et de pathologies hépatiques.

In a nutshell (simple summary in English in 5-10 lines for the general public)

Non-alcoholic liver fatty liver diseases (NAFLD) are pathologies in constant increase and for which there is no treatment currently. Environmental contaminants, including pesticides are suspected of contributing to their occurrence and / or evolution towards more severe forms by leading to endocrino-metabolic disruptions. The CAR and PXR nuclear receptors are suspected to be mediators of the effect of pesticides on the development of these endocrino-metabolic disruptions because of their function at the crossroads between detoxification endocrinology and energy metabolism. The objective of this project is to screen an important number of pesticides among those found in our diet (study of the total diet or EAT2 of the ANSES) compared to their steatogenic character. This project involves an *in vitro* screening of pesticides activating the murine and human forms of the CAR and PXR nuclear receptors. An *in vivo* study on transgenic mouse models will allow to evaluate the consequences of these activations or co-activations on the development of endocrino-metabolic disruptions and liver diseases.

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) /

L'obésité et les maladies métaboliques associées sont des pathologies endocrino-métaboliques potentiellement sensibles aux produits chimiques de type perturbateurs endocriniens. De nombreuses études épidémiologiques et animales indiquent que l'exposition chimique peut contribuer à expliquer l'augmentation rapide de l'incidence de ces maladies métaboliques. Les stéatoses hépatiques non alcoolique (NAFLD) et la stéatohépatite non alcoolique (NASH) font partie de ces pathologies en augmentation constante et pour lesquelles il n'y a pas de traitement. La cause exacte des NAFLD / NASH n'a pas été formellement élucidée et le rôle des perturbations endocriniennes, en particulier

stéroïdiennes, dans son étiologie est suspectée. Dans le cadre de ce projet, nous prévoyons d'évaluer les perturbations endocrinométaboliques induites par les pesticides sur l'apparition de ces pathologies hépatiques. Nous proposons de cribler un nombre important de pesticides parmi ceux retrouvés dans notre alimentation (étude de l'alimentation totale ou EAT2 de l'ANSES) par rapport à leur caractère stéatogène. Ce criblage *in vitro* est réalisé à travers l'activation des récepteurs nucléaires CAR et PXR qui sont suspectés d'être des médiateurs de l'effet des pesticides sur le développement de ces perturbations endocrinométaboliques en raison de leur fonction de carrefour entre détoxification, endocrinologie et métabolisme énergétique. Ce projet comprend un criblage *in vitro* de pesticides activant les formes murines et humaines des récepteurs nucléaires CAR et PXR. Une étude *in vivo* sur des modèles de souris transgéniques permettra d'évaluer les conséquences de ces activations ou co-activations sur le développement des perturbations endocrinométaboliques et de pathologies hépatiques.

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)

Obesity and related metabolic diseases are endocrine-related diseases potentially sensitive to endocrine disrupting chemicals. Numerous epidemiological and animal studies indicate that chemical exposure may contribute to the rapid increase in the incidence of these metabolic diseases. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and non-alcoholic steatohepatitis (NASH) are part of these pathologies in constant increase and for which there is no treatment. The exact cause of NAFLD/NASH has not been formally elucidated and the role of endocrine disruptions, particularly steroidal, in its etiology is suspected. In this project we plan to evaluate the endocrinometa-bolic disruptions induced by pesticides on the occurrence of these liver pathologies. We propose to screen an important number of pesticides among those found in our diet (study of the total diet or EAT2 of the ANSES) compared to their steatogenic character. This *in vitro* screening is carried out through the activation of the nuclear receptors CAR and PXR which are suspected to be mediators of the effect of pesticides on the development of endocrinometa-bolic disruptions because of their functions at the crossroads between detoxification endocrinology and energy metabolism. This project involves an *in vitro* screening of pesticides activating the murine and human forms of the CAR and PXR nuclear receptors. An *in vivo* study on transgenic mouse models will allow to evaluate the consequences of these activations or co-activations on the development of endocrinometa-bolic disruptions and liver diseases.

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

Les perturbateurs endocriniens sont des produits chimiques qui peuvent interférer avec la synthèse, la sécrétion, le transport, le métabolisme, l'élimination ou l'action des hormones. Étant donné que le système endocrinien joue un rôle essentiel dans de nombreuses fonctions biologiques ou physiologiques, sa dérégulation par des composés de type perturbateurs endocriniens peut conduire à divers effets néfastes sur la santé humaine, allant de perturbations néonatales à des troubles du développement, au cancer ou encore aux maladies métaboliques et immunologiques. On suspecte une large gamme de substances naturelles et chimiques de perturber le système endocrinien. Il s'agit de produits pharmaceutiques, des dioxines et des composés de type dioxine-like, de polychlorobiphényles, de plastifiants tels que le bisphénol A, du DDT et d'autres pesticides (*Le Maire et al, Cell Mol Sci 2010; Delfosse et al, Acta Pharmacol Sin Dec 2014*). Des centaines de produits chimiques dans le commerce sont connus pour avoir des effets perturbateurs endocriniens. Cependant, des milliers d'autres produits chimiques ayant des effets endocriniens potentiels n'ont pas été recherchés ni testés.

L'obésité et les maladies métaboliques associés sont fortement associées à des pathologies et dysfonctionnements du système endocrinien et sont de ce fait potentiellement sensibles aux produits chimiques de type perturbateurs endocriniens (*Thayer et al, Environ Health Persp 2012*). Il existe à l'heure actuelle de nombreuses études à la fois épidémiologiques et animales indiquant que l'exposition chimique peut avoir contribué à l'augmentation rapide de l'incidence de ces maladies métaboliques (*Heindel et al., Reprod Toxicol 2016*) et les pesticides sont parmi les plus impliqués (*Lee et al., Endocr Rev 2014; Dirinck et al., Obesity 2011*). Le mécanisme d'action des perturbateurs endocriniens reste à explorer et cela est particulièrement vrai pour les troubles métaboliques pour lesquels aucun outil d'évaluation *in vitro* ou *in vivo* n'est disponible. La perturbation endocrinienne ne se limite à celle d'un effet oestrogénique, androgénique ou thyroïdien. L'interaction des perturbateurs endocriniens avec d'autres récepteurs nucléaires a été proposée comme un facteur qui pourrait contribuer au développement des maladies métaboliques telles que l'obésité et le diabète de type II (*Casals-Casas et al., Annu Rev Physiol 2011*).

Dans ce projet, nous proposons d'évaluer différents pesticides actuellement retrouvés dans l'alimentation humaine par rapport à leur capacité à provoquer des perturbations métaboliques et plus particulièrement des stéatoses hépatiques non-alcooliques par leur interaction avec les xénosensors et régulateurs métaboliques CAR (Constitutive Androstane Receptor) et PXR (Récepteur X préventif).

NAFLD, NASH, TAFLD

Les stéatoses hépatiques non alcooliques (NAFLD) et les stéatohepatites non alcooliques (NASH) sont actuellement la principale cause de maladies hépatiques dans les pays occidentaux. Ils représentent un ensemble de pathologies hépatiques allant de la simple accumulation de graisse dans le foie, connue sous le nom de stéatose, à l'inflammation en présence ou en l'absence de fibrose connue sous le nom de stéatohepatite non alcoolique (NASH), qui peut se transformer en cirrhose et carcinomes hépatocellulaires. La prévalence de la NAFLD a doublé au cours des 20 dernières années, atteignant 30% dans les pays industrialisés et 10% dans les pays en développement (*Smith et al, Crit Rev Clin Lab Sci 2011*). La cause exacte de NASH n'a pas été officiellement élucidée. Bien qu'elle soit très étroitement liée à la résistance à l'insuline, à l'obésité et au syndrome métabolique, tous les patients obèses ne présentent pas de NAFLD / NASH et inversement, tous les patients atteints de NAFLD / NASH ne présentent pas d'obésité, de résistance à l'insuline et de syndrome métabolique (*Kneeman et al., Therap Adv Gastroenterol 2012*). Le rôle des perturbations endocriniennes, en particulier stéroïdiennes, dans son étiologie a récemment été avancée (*Hazlehurst et al., Eup J Endocrinol 2013; Marino et al., Word J Gastroenterol 2015*). En effet, des liaisons épidémiologiques ont été établies entre les faibles niveaux de testostérone et la présence de stéatoses chez les patients (*Kim et al., BMC Gastroenterol 2012, Volzke et al., Int J Androl, 2010*). De même, les œstrogènes protègent contre la

NAFLD et leur diminution chez les femmes ménopausées augmente le risque de développer cette pathologie (*Gutierrez-Grobe et al, Ann Hepatol 2010, Florentino et al, Ann Hepatol 2012*).

Le terme TAFLD (Toxicant-associated fatty liver disease) a récemment été créé pour décrire les stéatoses hépatiques non-alcooliques dues à l'exposition aux polluants environnementaux (*Wahlang et al, Ann Hepatol 2013*). En effet, de nombreuses données scientifiques, à la fois épidémiologiques et expérimentales, montrent un rôle de substances chimiques, en particulier celles de type perturbateur endocrinien dans le développement de stéatose ou leur évolution vers des formes plus sévères (*Arciello et al., Int J Mol Sci 2013; Wahlang et Al, Ann Hepatol 2013*). Les pesticides représentent une proportion significative de ces composés stéatogènes (*Mulligan et al, Environ Toxicol 2016, Pirozzi et coll., Toxicol Lett 2016, Al-Eryani et al, Toxicol Pathol 2015*).

Implication des récepteurs nucléaires CAR et PXR

L'implication des récepteurs nucléaires dans le développement de stéatoses hépatiques et plus particulièrement dans de celles de type TAFLD a été avancée par de nombreuses études (*Cave et al, Biochim Biophys Acta 2016, Ballestri et al., Adv Ther 2016*). Deux de ces récepteurs, le CAR et le PXR, sont particulièrement intéressants, en raison de leur fonction de carrefour entre la désintoxication, l'endocrinologie et le métabolisme énergétique (*Wang et al., Expert Opinion Drug Metab Toxicol 2012; Mo et al, Horm Mol Biol Clin Investig 2014 ; Banerjee et al, Drug Discov Today 2015*). Ils régulent de nombreux gènes (enzymes et transporteurs de phase I et II) impliqués dans le métabolisme des xénobiotique et dans celui des hormones thyroïdiennes et stéroïdiennes. Leur activation par des polluants environnementaux, y compris de nombreux pesticides, a eu des conséquences délétères sur l'estradiol et le métabolisme de la testostérone conduisant à une perturbation endocrinienne (voir *Kretschmer et al., Chim Biol Interact 2005*) et la stéatose (*Goet et al, Toxicol Appl Pharmacol 2009; Toxicol Sci 2009*). Ces deux récepteurs sont co-activés par de nombreux pesticides (*Kretschmer et al., Chim Biol Interact 2005*) et leur activation simultanée pourrait entraîner des effets encore plus nuisibles. Dans ce projet, nous proposons d'examiner un certain nombre de pesticides actuellement trouvés dans l'alimentation humaine par rapport à leur capacité à activer ou à co-activer ces deux récepteurs nucléaires et à induire des perturbations endocrino-métaboliques conduisant à NAFLD ou NASH.

Background and scientific and technical issues (nature of the scientific field and the question asked by the project)

Endocrine disruptors are chemicals that can interfere with synthesis, secretion, transport, metabolism binding action and elimination of hormones. Since the endocrine system plays a critical role in many biological or physiological functions, by interfering body's endocrine system, endocrine disrupting compounds (EDCs) have various adverse effects on human health, starting from birth defects to developmental disorders, cancer, metabolic and immunological diseases. A wide range of natural and man-made substances, are thought to cause endocrine disruption, including pharmaceuticals, dioxin and dioxin-like compounds, polychlorinated biphenyls, plasticizers such as bisphenol A, DDT and other pesticides (*Le Maire et al, Cell Mol Sci 2010 ; Delfosse et al, Acta Pharmacol Sin Dec 2014*). Hundreds of chemicals in commerce are known to have endocrine disrupting effects. However, thousands of other chemicals with potential endocrine effects have not been looked for or tested.

Obesity and related metabolic diseases are endocrine-related diseases/dysfunction and potentially sensitive to endocrine disrupting chemicals (*Thayer et al, Environ Health Persp 2012*). There are now epidemiological and animal studies indicating that chemical exposure may contribute to the rapid increase in the incidence of these metabolic diseases (*Heindel et al, Reprod Toxicol 2016*) and pesticides are among the most involved (*Lee et al., Endocr Rev 2014 ; Dirinck et al, Obesity 2011*). The mechanism of action of endocrine disruptors remains to be explored and this is particularly true for metabolic

disorders for which no *in vitro* or *in vivo* evaluation tools are available. Endocrine disruption is no longer limited to estrogenic, androgenic and thyroid pathways, interference of EDCs with others receptors has been proposed as a factor that could contribute to metabolic diseases such as obesity and diabetes (Casals-Casas *et al*, *Annu Rev Physiol* 2011).

In this project, we propose to evaluate different pesticides currently found in the human diet compared to their ability to induce metabolic disruptions, and more particularly nonalcoholic fatty liver diseases through their interaction with the xenosensors and metabolic regulators CAR (Constitutive Androstane Receptor) and PXR (Pregnane X Receptor).

NAFLD, NASH, TAFLD

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and non-alcoholic steatohepatitis (NASH) are currently the leading cause of liver disease in Western countries. They represent a group of liver disorders ranging from the simple accumulation of fat in the liver, known as steatosis, to inflammation in the presence or absence of fibrosis known as nonalcoholic steatohepatitis (NASH), which can develop into cirrhosis and hepatocellular carcinomas. The prevalence of NAFLD has doubled over the past 20 years, reaching 30% in industrialized countries and 10% in developing countries (Smith *et al*, *Crit Rev Clin Lab Sci* 2011). The exact cause of NASH has not been formally elucidated. Although it is very closely related to insulin resistance, obesity and metabolic syndrome, not all obese patients suffer from NAFLD / NASH and conversely not all patients with NAFLD / NASH have insulin resistance, obesity and metabolic syndrome (Kneeman *et al*, *Therap Adv Gastroenterol* 2012). The role of endocrine disruptions, particularly steroidal, in its etiology has recently been advanced (Hazlehurst *et al*, *Eup J Endocrinol* 2013; Marino *et al*, *Word J Gastroenterol* 2015). Indeed, epidemiological links have been established between low levels of testosterone and the presence of steatoses in patients (Kim *et al*, *BMC Gastroenterol* 2012, volzke *et al*, *Int J Androl* 2010). Similarly, estrogens protect against NAFLD and their decrease in postmenopausal women increases the risk of developing this pathology (Gutierrez-Grobe *et al*, *Ann Hepatol* 2010; Florentino *et al*, *Ann Hepatol* 2012).

The term TAFLD (Toxicant-associated fatty liver disease) was recently created to describe non-alcoholic liver fatty liver diseases due to exposure to environmental pollutants (Wahlang *et al*, *Ann Hepatol* 2013). Indeed, numerous scientific data, both epidemiological and experimental, show a role of chemical substances, in particular those of endocrine disrupting type in the development of steatoses or their evolution towards more severe forms (Arciello *et al*, *Int J Mol Sci* 2013; Wahlang *et al*, *Ann Hepatol* 2013). Pesticides represent a significant proportion of these steatogenic compounds (Mulligan *et al*, *Environ Toxicol* 2016; Pirozzi *et al*, *Toxicol Lett* 2016; Al-Eryani *et al*, *Toxicol Pathol* 2015).

Involvement of CAR and PXR nuclear receptors

The involvement of nuclear receptors in the development of hepatic steatosis and more particularly in TAFLD has been advanced by numerous studies (Cave *et al*, *Biochim Biophys Acta* 2016; Ballestri *et al*, *Adv Ther* 2016). Two of these receptors, CAR and PXR, are of particular interest, because of their function at the crossroads between detoxification, endocrinology and energy metabolism (Wang *et al*, *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2012; Mo *et al*, *Horm Mol Biol Clin Investig* 2014; Banerjee *et al*, *Drug Discov Today* 2015). They regulate numerous genes (phase I and II enzymes and transporters) involved in xenobiotic metabolism and in thyroid and steroid hormone metabolism. Their activation by environmental pollutants, including many pesticides, was reported to have deleterious consequences on estradiol and testosterone metabolism leading to endocrine disruption (*for review see Kretschmer et al*, *chem Biol Interact* 2005) and steatosis (Goet *et al*, *Toxicol Appl Pharmacol* 2009; *Toxicol Sci* 2009). These two receptors are co-activated by many pesticides (Kretschmer *et al*, *chem Biol Interact* 2005) and their simultaneous activation could lead to effects that are all the more deleterious.

In this project, we propose to screen a number of pesticides currently found in human diet compared to their ability to activate or co-activate these two nuclear receptors and to induce endocrino-metabolic disruptions leading to NAFLD or NASH.

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

Description détaillée des objectifs poursuivis (1 page maxi)

L'identification de pesticides avec un potentiel perturbateur endocrinien parmi tous ceux qui sont utilisés dans le monde entier est un défi majeur dans la lutte contre les effets néfastes de ces composés. L'objectif de ce projet est de cribler un certain nombre de pesticides trouvés dans l'alimentation humaine, afin d'identifier ceux qui ont des propriétés endocrino-métaboliques en utilisant des outils d'analyse *in vitro* et *in vivo*. Les propriétés endocrino-métaboliques seront évaluées par rapport à la capacité de ces pesticides à activer les récepteurs nucléaires CAR et PXR à la fois *in vitro* et *in vivo* et entraîner des perturbations endocrinino-métaboliques entraînant une dérégulation hormonale et une apparition de stéatose hépatique. En outre, l'étude d'un perturbateur endocrinien à la fois est susceptible de sous-estimer le risque combiné d'expositions simultanées à de multiples molécules, nous prévoyons donc d'évaluer l'effet de mélanges de pesticides. Nous proposons de nouvelles approches pour examiner l'effet des mélanges de pesticides perturbateurs métaboliques en fonction de leur capacité à activer simultanément des récepteurs nucléaires régulant les mêmes voies métaboliques.

Le choix des pesticides à étudier a été effectué sur la base du rapport ANSES (organisme de réglementation français) sur une étude d'alimentation totale (EAT2). Les études d'alimentation totales menées par l'ANSES sont des études visant à surveiller l'exposition des populations à des substances chimiques présentes dans les aliments. Elles sont construites à partir de paniers représentatifs de la consommation alimentaire et analysés pour un nombre important de produits chimiques susceptibles d'être présents dans les aliments "tels qu'ils sont consommés". Dans EAT2, 283 résidus de pesticides ont été recherchés dans les aliments consommés par la population française. Les substances prioritaires considérées sont des substances relevant de la directive européenne 91/414 / EEC qui énumère les pesticides qui sont encore autorisés à être utilisés. Cette étude a permis de détecter 73 pesticides encore actuellement autorisés dans différents aliments. Les substances les plus fréquemment détectées sont les insecticides organophosphorés et les fongicides (carbamates, dicarboximides, imidazoles). Parmi les molécules détectées, certains (Chlorpyrifos-methyl, Iprodione) sont soupçonnés d'être des perturbateurs endocriniens (*Mnif et al., Int J Environ Res Public Health 2011*). Nous examinerons les 73 substances détectées et les évaluons par rapport à leur propriété perturbatrice métabolique grâce à leur capacité à activer les récepteurs nucléaires CAR et PXR. Le coordinateur de ce projet fait partie du comité ANSES responsable de l'évaluation des risques chimiques dans les aliments (CES ERCA). Ce comité était responsable de l'étude EAT2 et de l'évaluation des risques des contaminants détectés dans les aliments. La partie du rapport EAT2 sur les pesticides est disponible sur le site web de l'ANSES (<https://www.anses.fr/fr/system/files/PASER2006sa0361Ra2.pdf>).

La partie *in vitro* de ce projet vise à cribler les pesticides activant les récepteurs nucléaires CAR et PXR. Une étape *in vivo* permettra d'évaluer les conséquences de ces activations sur l'apparition de perturbations endocrino-métaboliques chez la souris.

Criblage in vitro sur les lignées cellulaires bioluminescentes (P Balaguer, Partenaire 2) Le partenaire 2 a développé des lignées cellulaires bioluminescentes stables pour évaluer l'effet des ligands de nombreux récepteurs nucléaires, permettant de cribler un grand nombre de molécules en fonction de leur capacité à activer différents récepteurs nucléaires (*Grimaldi et al., Front Endocrinol 2015; Delfosse et al., Nat Comm 2015*). Ces essais bioluminescents *in vitro* seront utilisés pour l'identification à haut débit des pesticides activant les formes humaines et murines des récepteurs nucléaires CAR et PXR. Les lignées HG5LN (HeLa GALARE₅-βGlobin luciferase cells) exprimant GAL4(DNA Binding Domain)-hPXR(Ligand Binding domain), -PXR(LBD), hCAR(LBD, mCAR)-(LBD) ont déjà été établies (*Menez et al., Biochem Pharmacol 2012*). Dans ces cellules, les pesticides seront choisis pour leur capacité à activer les récepteurs PXR et CAR dans des cellules humaines et murines.

Études *in vivo* sur des souris transgéniques (L Mselli-Lakhal, partenaire 1). Le partenaire 1 dispose d'une animalerie avec des animaux transgéniques invalidés pour les récepteurs nucléaires CAR et PXR. L'étude *in vitro* permettra de sélectionner des pesticides co-activant à la fois les formes humaines et murines des récepteurs nucléaires CAR et PXR. Dix d'entre eux seront évalués *in vivo* par rapport à leur capacité à provoquer des perturbations métaboliques hépatiques. L'activation des récepteurs nucléaires CAR et PXR sera évaluée en mesurant l'expression de leurs gènes cibles par RT-QPCR dans le foie. Les molécules seront administrées à la souris par voie orale (gavage) pendant une courte période de 28 jours, comme déterminé par le partenaire 1 pour la détection de la stéatose hépatique induite par un contaminant (Marmugi et al, Hepatol 2012). L'impact sur la perturbation des hormones stéroïdes sera évalué en quantifiant le niveau de testostérone chez les mâles. Les perturbations métaboliques associées seront évaluées en mesurant la quantité de lipides dans le foie (triglycérides, cholestérol et phospholipides) et l'expression de gènes clés impliqués dans la régulation du métabolisme énergétique comme décrit précédemment (Marmugi et al., Hepatol 2012; Toxicol 2014). L'effet inflammatoire indiquant une évolution de la stéatose vers des formes plus sévères (NASH) sera évalué en mesurant les cytokines pro inflammatoires au niveau hépatique. Trois à cinq pesticides seront retenus pour des études d'effets combinés sur la coactivation des récepteurs nucléaires CAR et PXR *in vivo* et la démonstration d'un effet synergique possible.

Detailed description of the objectives (max 1 page)

Identifying pesticides with endocrine disrupting potential among all of that are used worldwide is a major challenge in addressing the adverse effects of these compounds. The objective of this project is to screen a number of pesticides found in human diet, to identify those with endocrino-metabolic properties by using *in vitro* and *in vivo* analysis tools. The endocrino-metabolic properties will be evaluated in relation to the ability of these pesticides to activate the CAR and PXR nuclear receptors both *in vitro* and *in vivo* and lead to endocrino-metabolic disruptions resulting in hormonal dysregulation and in the occurrence of liver steatosis. Furthermore, since examination of one endocrine disruptor at a time is likely to underestimate the combined risk from simultaneous exposure to multiple molecules, we plan to evaluate the effect of mixture of pesticides. We propose new approaches to examine the effect of mixtures of metabolic disruptor pesticides based on their ability to simultaneously activate nuclear receptors regulating the same metabolic pathways.

The choice of the pesticides to be studied was made on the basis of the ANSES (French regulatory agency) report on the total diet study (EAT2). The total diet studies are national studies of exposure, monitoring risk assessments for chemicals of interest in public health. They are constructed from baskets representative of food consumption and analyzed for a significant number of chemicals likely to be present in foods "as consumed". In EAT2 study, 283 residues of pesticides were searched in food consumed by the French population. Priority substances considered are substances within the scope of European Directive 91/414 / EEC listing the pesticides that are still authorized for use. This study made it possible to detect 73 pesticides still currently authorized in different foods. The most frequently detected substances are organophosphorus insecticides and fungicides (carbamates, dicarboximides, imidazoles). Among the detected molecules some (Chlorpyrifos-methyl, Iprodione) are suspected of having an endocrine disruptor property (Mnif et al., Int J Environ Res Public Health 2011). We will consider the 73 detected substances and evaluate them in relation to their metabolic disruptive property through their ability to activate the CAR and PXR nuclear receptors. The coordinator of this project is part of the ANSES committee responsible for chemical risk assessment in food (CES ERCA) of the ANSES regulatory agency. This committee was responsible for the EAT2 study and the risk assessment of contaminants that were detected in food. The part of the EAT2 report on pesticides is available on the ANSES website (<https://www.anses.fr/fr/system/files/PASER2006sa0361Ra2.pdf>).

The *in vitro* part of this project aims at screening of pesticides activating the CAR and PXR nuclear receptors. An *in vivo* step will allow evaluating the consequences of these activations on the occurrence of endocrino-metabolic disruptions in mice.

In vitro Screening on Bioluminescent Cell Lines (P Balaguer, Partenaire 2). Partner 2 developed stable bioluminescent cell lines to evaluate effect of ligands of numerous nuclear receptors, making it possible to screen a large number of molecules with respect to their capacity to activate different nuclear receptors (Grimaldi et al, Front Endocrinol 2015; Delfosse et al, Nat Comm 2015). These bioluminescent in vitro assays will be used for high-throughput identification of pesticides activating human and murine forms of CAR and PXR nuclear receptors. HG5LN (HeLa GAL4RE₅-βGlobin luciferase cells) expressing GAL4(DNA Binding Domain)-hPXR(Ligand Binding domain), -PXR(LBD), hCAR(LBD, mCAR)-(LBD) have already been established (Menez et al, Biochem Pharmacol 2012). In these cells, pesticides will be selected for their ability to activate both PXR and CAR receptors in human and in mouse cells.

In vivo studies on transgenic mice (L Mselli-Lakhal, Partner 1). Partner 1 has an animal facility with transgenic animals invalidated for the CAR and PXR nuclear receptors. The in vitro study will select pesticides co-activating both the human and murine forms of the CAR and PXR nuclear receptors. Ten of them will be evaluated in vivo in relation to their capacity to induce hepatic metabolic disruptions. Activation of CAR and PXR nuclear receptors will be evaluated by measuring the expression of their target genes by RT-QPCR in the liver. The molecules will be administered to mice orally (gavage) for a short period of 28 days as previously determined by Partner 1 for the detection of contaminant-induced hepatic steatosis (Marmugi et al, Hepatol 2012). The impact on steroid hormone disruption will be evaluated by quantifying the level of testosterone in males. The associated metabolic disruptions will be assessed by measuring the amount of lipids in the liver (triglycerides, cholesterol and phospholipids) and the expression of key genes involved in the regulation of energy metabolism as described previously (Marmugi et al, Hepatol 2012; Toxicol 2014). The inflammatory effect indicating an evolution from steatosis to more severe forms (NASH) will be evaluated by measuring proinflammatory cytokines at the hepatic level. Three to five pesticides will be retained for studies of combined effects on the coactivation of CAR and PXR nuclear receptors in vivo and the demonstration of a possible synergistic effect.

Originalité et caractère novateur du projet (0.5 page maxi)

L'effet perturbateur endocrinien des pesticides a été bien documenté pour la fonction de reproductrice (Balabanic et al., *Reprod Fertil Dev* 2011), nous proposons de cibler la fonction métabolique et plus particulièrement les perturbations métaboliques du foie. Nous proposons de cribler un nombre important de pesticides (73) sur la base d'un rapport ANSES récent pour sélectionner ceux présents dans notre alimentation. Dans le rapport EAT2 de l'ANSES, l'évaluation des risques en ce qui concerne l'effet perturbateur endocrinien n'a pas pu être réalisée en raison du manque de connaissance de ces composés. Nous proposons de fournir des données mécanistiques en relation avec les perturbations métaboliques induites par les pesticides en ciblant deux récepteurs nucléaires particulièrement intéressants, dont les fonctions sont au carrefour entre la désintoxication, l'homéostasie des hormones stéroïdes et le métabolisme énergétique. Notre étude met l'accent sur des analyses *in vitro* et *in vivo* pour une vue complète de l'effet de ces pesticides sur l'induction de perturbations métaboliques. Nous proposons de traiter l'effet "cocktail" à travers la capacité de ces pesticides à activer de manière synergique deux récepteurs nucléaires régulant les mêmes voies métaboliques dans le même organe, le foie. En utilisant des lignées cellulaires humaines, nous rendons nos résultats pertinents pour l'homme.

Originality and innovative / pioneering nature of the project (max 0.5 page)

The endocrine disrupting effect of pesticides has been well documented for reproductive function (Balabanic et al, *Reprod Fertil Dev* 2011), we propose to target the metabolic function and more particularly liver metabolic disruptions. We propose to screen a significant number of pesticides (73) on the basis of a recent ANSES report to select those present in our diet. In EAT2 ANSES report, the risk assessment with respect to the endocrine disrupting effect could not be made due to lack of

knowledge about these compounds. We propose to provide mechanistic data in relation to metabolic disruptions induced by pesticides by targeting two particularly interesting nuclear receptors, which functions are at the crossroads between detoxification, steroid hormones homeostasis and energy metabolism. Our study focuses on both *in vitro* and *in vivo* assays for a complete view of the effect of these pesticides on the induction of metabolic disruptions. We propose to address the “cocktail” effect through the ability of these pesticides to synergistically activate two nuclear receptors regulating the same metabolic pathways in the same organ, the liver. By using human cell lines we make our results relevant for human.

Intérêt pour le plan Écophyto (0.5 page maxi)

Ce projet fait partie de l'axe 2 du plan Ecophyto II visant à accroître la connaissance des risques associés aux produits phytosanitaires et leur impact sur la santé humaine. Il vise à mieux caractériser les risques associés à l'exposition à ces produits sur la santé humaine, en particulier en ce qui concerne les stéatoses hépatiques non alcooliques (NAFLD). Ces maladies représentent un problème important de santé publique en raison d'une forte augmentation de leur incidence et de l'absence d'un traitement thérapeutique efficace, leur contrôle étant fait par rapport à celui des facteurs de risque. Ce projet vise à mieux caractériser ceux liés à l'exposition aux contaminants environnementaux. Ce projet vise également à mieux documenter le mode d'action des pesticides perturbateurs endocriniens et l'effet "cocktail". Il existe de nombreuses façons de caractériser les interactions entre différents contaminants présents dans un cocktail. Nous proposons d'étudier les effets synergiques potentiels des mélanges de pesticides lors de l'activation des récepteurs nucléaires CAR et PXR. Les résultats escomptés fourniront des données utiles aux agences d'évaluation des risques dans leurs travaux d'expertise et fourniront des modèles pertinents pour l'évaluation de l'effet perturbateur métabolique des produits phytopharmaceutiques à la fois *in vitro* et *in vivo*.

Interest in view of the Écophyto Plan (0.5 page maximum)

This project is part of axis 2 of the Ecophyto II plan aiming to increase knowledge of the risks associated with plant protection products and their impact on human health. It aims to better characterize the risks associated with exposure to these products on human health, particularly with regard to non-alcoholic fatty liver diseases (NAFLD). These diseases represent an important public health issue because of a strong increase in their incidence and the absence of an effective therapeutic, their control going through that of the risk factors. This project aims to better characterize those related to exposure to environmental contaminants. This project also aims to better document the mode of action of endocrine disrupting pesticides and the "cocktail" effect. There are many ways to characterize the interactions between different contaminants present in a cocktail. We propose to study the potential synergistic effects of pesticide mixtures on activation of both CAR and PXR nuclear receptors. The expected results will provide useful data to the risk assessment agencies in their expert work and provide models relevant for the assessment of the metabolic disruptive effect of plant protection products both *in vitro* and *in vivo*.

Structuration du projet et méthodologie mise en œuvre :

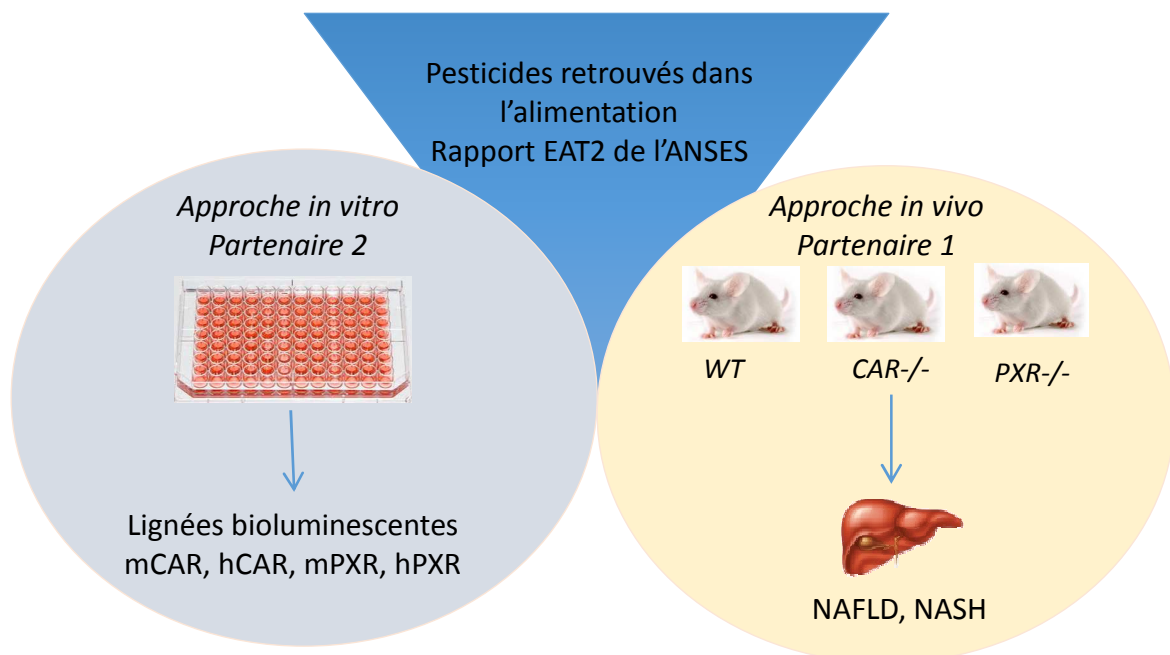
Ce projet implique une étape de criblage *in vitro* de pesticides par rapport à leur capacité à activer les formes murines et humaines des récepteurs nucléaires CAR et PXR. Ces études d'activation seront réalisées sur des lignées cellulaires bioluminescentes avec plusieurs doses de pesticides afin d'établir des courbes dose-réponse. Le criblage d'un grand nombre de pesticides est possible grâce à la plateforme de criblage mise en place par le partenaire 2, qui dispose d'une station de travail d'automatisation permettant de réaliser un certain nombre de tests avec une grande fiabilité. Dans le rapport EAT2 ANSES, l'exposition des adultes et des enfants aux pesticides trouvés dans les aliments a été calculée en tenant compte de la quantité de nourriture consommée. Nous utiliserons ces données pour définir les doses à étudier *in vitro* et *in vivo*. En raison de leur très grande sensibilité, les lignées cellulaires bioluminescentes peuvent être utilisées pour tester de très faibles doses de pesticides

correspondant à ceux auxquels l'homme est exposé. Nous sélectionnerons les pesticides qui activent les récepteurs CAR et PXR et aussi bien les formes humaines que murines de ces récepteurs (Tâche 1) afin de rendre les résultats générés *in vivo* sur la souris pertinents pour l'homme.

Une dizaine de pesticides seront sélectionnés pour des études *in vivo*. Ces pesticides seront initialement administrés individuellement à des souris mâles C57BL6 (8 par lot) par voie orale par gavage pendant 28 jours (Tâche 2). L'activation des récepteurs nucléaires CAR et PXR sera évaluée par QPCR sur les ARN du foie en mesurant l'expression de gènes cibles prototypiques de chacun de ces récepteurs nucléaires (Cyp2b10 et Cyp2C29 pour CAR, Cyp3A11 et Cyp2C55 pour PXR). La perturbation des hormones stéroïdiennes sera évaluée en quantifiant le niveau de testostérone chez les mâles. L'effet stéatogène sera évalué par quantification des lipides neutres du foie (Tryglycerides, esters de cholestérol, phospholipides).

Trois à cinq pesticides seront conservés pour des études d'effets combinés sur la coactivation de CAR et PXR (Tâche 3). Ces études seront réalisées en utilisant des souris C57BL6 mais aussi des souris transgéniques de même souche invalidées pour les récepteurs nucléaires CAR et PXR. Les effets de combinaisons binaires de pesticides seront testées sur les gènes cibles de ces récepteurs, les niveaux de testostérone et la quantification de lipides neutres hépatiques comme décrit ci-dessus.

Organisation du projet



Calendrier du projet

Semestres	1-6 2018	7-12 2018	1-6 2019	7-12 2019	1-6 2020	7-12 2020
Tache 1 : Criblage des pesticides in vitro	■					
Tache 2 : Administration des pesticides individuellement in vivo			■			
Tache 3 : Administration des pesticides 2 par 2 in vivo				■		
Rapports scientifiques de mi-parcours				■		
Valorisation des résultats sous forme de présentations en congrès et rédaction d'articles scientifiques					■	
Rapports scientifiques finaux						■

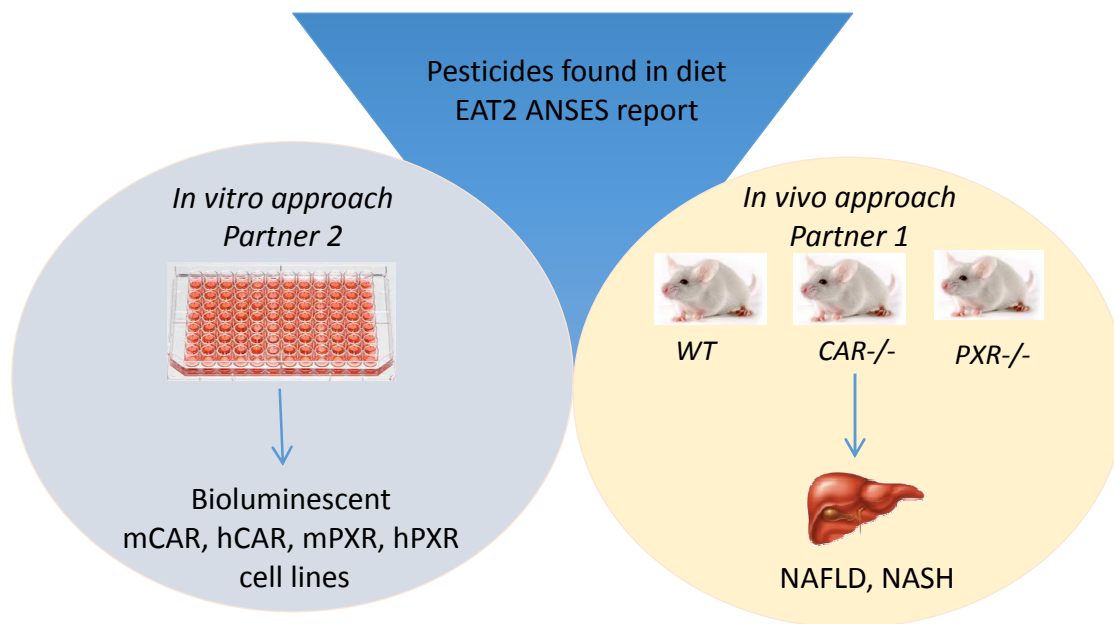
Project structure and methodology: Different tasks to implement

This project involves a step of *in vitro* screening of pesticides relative to their ability to activate the murine and human forms of the CAR and PXR nuclear receptors. These activation studies will be carried out on bioluminescent cell lines with several doses of pesticides so as to establish a dose-response curves. The screening of a large number of pesticides is made possible by the screening platform set up by the partner 2, which has automation workstation allowing a number of tests to be carried out with high reliability. In EAT2 ANSES report, the exposure of adult and children to pesticides found in food was calculated by taking into account the amounts of food consumed. We will use these data to define the doses to be studied *in vitro* and *in vivo*. Because of their very high sensitivity, the bioluminescent cell lines can be used to test very low doses of pesticides corresponding to those to which man is exposed. We will select the pesticides that activate both CAR and PXR receptors and both the human and murine forms of these receptors (Task 1) in order to make the results generated *in vivo* in the mouse relevant for humans.

About ten pesticides will be selected for *in vivo* studies. These pesticides will initially be administered individually to mice male C57BL6 (8 per batch) orally by gavage for 28 days (Task 2). The activation of CAR and PXR nuclear receptors will be assessed by QPCR on the liver RNAs by measuring the expression of prototypic target genes of each of these nuclear receptors (Cyp2b10 and Cyp2C29 for CAR, Cyp3A11 and Cyp2C55 for PXR). Disruption of steroid hormones will be evaluated by quantifying the level of testosterone levels in males. The steatogenic effect will be evaluated by quantification of the liver neutral lipids (Tryglycerides, cholesterol esters, phospholipids).

Three to five pesticides will be retained for studies of combined effects on the coactivation of CAR and PXR (Task 3). These studies will be carried out using C57BL6 mice but also transgenic mice of the same strain invalidated for the CAR and PXR nuclear receptors. Binary combinations of pesticides will be tested on the endpoints described above.

Project organisation



Schedule of the project

Semesters	1-6 2018	7-12 2018	1-6 2019	7-12 2019	1-6 2020	7-12 2020
Task 1 : Screening of pesticides in vitro	■					
Task 2 : Pesticides testing one by one in vivo			■			
Task 3 : Tests on pesticide mixures two by two				■		
Middle-way scientific reports			■			
Valorization of the results in the form of congress presentations and writing of scientific articles					■	
Final scientific reports						■

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

Les partenaires de ce projet connaissent parfaitement les outils utilisés dans ce projet qui ont été validés par de nombreuses publications (*Delfosse et al, PNAS 2012, Nat Commun 2015, Marmugi et al, Hepatol 2012, Toxicol 2014*). Les partenaires se connaissent et ont déjà eu l'opportunité de collaborer et de publier ensemble (*Menez et al, Biochem Pharmacol 2012*). Le développement de ce programme ne devrait donc pas poser de problèmes particuliers.

Main expected difficulties and how to meet them (fallback)

The partners of this project are fully familiar with the tools used in this project which have been validated by numerous publications (*Delfosse et al, PNAS 2012, Nat Commun 2015 ; Marmugi et al, Hepatol 2012; Toxicol 2014*). The partners know each other and have already had the opportunity to collaborate and publish together (*Menez et al, Biochem Pharmacol 2012*). The development of this program should therefore not pose any particular problems.

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

Ce projet regroupe deux partenaires ayant des compétences complémentaires dans l'étude des perturbateurs endocriniens.

L'équipe Toxicologie Intégrative et Métabolisme de l'unité Toxalim (Partenaire 1) travaille sur le rôle *in vivo* des récepteurs nucléaires (PPARs, LXR, CAR, PXR) dans la régulation du métabolisme énergétique principalement hépatique (*Montagner et al., Gut 2016; Marmugi et al, Toxicol Appl Pharmacol 2016; Ducheix et al, J Hepatol 2013*) et sur sa perturbation suite à une exposition aux contaminants perturbateurs métaboliques (DEHP, BPA, *Marmugi et al., Hepatol 2012; Toxicol 2014*). L'équipe possède une expertise reconnue dans la réalisation d'études *in vivo* sur les modèles murins: installations animales de type A2, animaux transgéniques invalidés pour les récepteurs nucléaires (PPAR, LXR, CAR, PXR ...).

L'équipe Signalisation hormonale et cancer de l'Institut de recherche sur le cancer (Partenaire 2) possède une expertise reconnue dans l'étude des perturbateurs endocriniens et de leur interaction avec les récepteurs nucléaires (*Delfosse et al., PNAS 2012, Nat Commun 2015*). Cette équipe dispose d'équipements de haute performance composés de postes de travail automatisés (2 Beckman Biomek 3000 et 1 Biomek FX) et de luminaires à microplaques (3 Wallac Microbeta et 2 Berthold Centro et Mithra).

Laila Lakhal, coordinatrice du projet, est ingénieur INRA (PhD / HDR). Elle a déjà participé à la coordination de projets de recherche financés par l'ANR (Plastimpact et Perinatox) et l'ANSES (Xenomix) sur les perturbations endocriniennes et métaboliques induites par les contaminants environnementaux. Elle supervise les travaux des doctorants sur le rôle des récepteurs nucléaires CAR et PXR dans la régulation du métabolisme énergétique hépatique (*Marmugi et al, Toxicol Appl Pharmacol 2016*). Elle travaille également comme experte au sein du comité ERCA (Evaluation des risques chimiques dans les aliments) de l'ANSES.

Les réunions du consortium se tiendront au début du projet et deux fois par an afin de partager et de discuter des résultats. La proximité des partenaires dans la même région (Toulouse pour le partenaire 1 et Montpellier pour le partenaire 2) encouragera ces réunions et en réduira le coût.

Control and monitoring rules of the project: partners, skills and human resources

This project brings together two partners with complementary skills in the study of endocrine disruptors.

The Toxalim Integrative Toxicology and Metabolism Team (Partner 1) is working on the *in vivo* role of nuclear receptors (PPARs, LXR, CAR, PXR) in regulating hepatic energy metabolism (*Montagner et al, Gut 2016; Marmugi et al, Toxicol Appl Pharmacol 2016; Ducheix et al, J Hepatol 2013*) and on its disruption following exposure to metabolic disrupting contaminants (DEHP, BPA, *Marmugi et al, Hepatol 2012; Toxicol 2014*). The team has a recognized expertise in carrying out *in vivo* studies on murine models: type A2 animal facility, transgenic animals invalidated for nuclear receptors (PPARs, LXR, CAR, PXR ...) .

The Hormone and Cancer Signaling Team of the Institute of Cancer Research (Partner 2) has recognized expertise in the study of endocrine disrupters and their interaction with nuclear receptors (*Delfosse et al, PNAS 2012, Nat Commun 2015*). This team has high performance equipment consisting of automated workstations (2 Beckman Biomek 3000 and 1 Biomek FX), and microplate luminometers (3 Wallac Microbeta and 2 Berthold Centro and Mithra).

Laila Lakhal, the project coordinator, is an INRA engineer (PhD/HDR). She has already coordinated research projects funded by ANR (Plastimpact and Perinatox) and ANSES (Xenomix) on endocrine-metabolic disruptions induced by environmental contaminants. She supervises PhD students work on the role of CAR and PXR nuclear receptors in the regulation of hepatic energy metabolism (*Marmugi et al, Toxicol Appl Pharmacol 2016*). She also works as an expert on the ERCA (Chemical Risk in Foods) committee of ANSES French regulatory agency.

Consortium meetings will be held at the beginning of the project and twice a year in order to share and discuss the results. The proximity of partners in the same region (Toulouse for partner 1 and Montpellier for partner 2) will encourage these meetings and reduce the cost.

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

La prévalence du NAFLD a doublé au cours des 20 dernières années, alors que la prévalence d'autres maladies chroniques du foie est restée stable ou même diminuée. Cependant, il n'existe actuellement aucun traitement efficace contre la stéatohépatite non alcoolique autre que le contrôle des facteurs de risque (limitation du surpoids, prévention de la résistance à l'insuline, etc.). Une bonne connaissance de ces facteurs de risque est donc importante dans le contrôle de l'apparition et de l'aggravation de cette pathologie. Les facteurs de risque de NAFLD comprennent les facteurs génétiques, mais aussi l'obésité, le diabète, la résistance à l'insuline, les altérations cardiovasculaires et l'hypertriglycéridémie. Mais les contaminants environnementaux, principalement ceux du type perturbateur endocrinien, sont également soupçonnés de jouer un rôle important. Ce projet vise à caractériser un grand nombre de pesticides auxquels la population française est soumise par des aliments par rapport à leur nature stéatogène possible. Il fournira des données aux organismes règlementaires pour tenir compte du caractère « perturbateur endocrinien » qui n'est actuellement pas prise en compte dans l'évaluation de risque. Ce projet valide également des outils pour évaluer le caractère « perturbateur métabolique » des contaminants qui ne sont actuellement pas disponibles. Il permet enfin de documenter l'effet cocktail dérivant d'une activation simultanée de 2 récepteurs nucléaires impliqués dans la régulation des mêmes voies métaboliques et dans un organe commun, le foie.

Expected results, particularly in terms of reducing the use, associated impacts and risks from plant protection products

The prevalence of NAFLD has doubled in the past 20 years, while the prevalence of other chronic liver diseases has remained stable or even decreased. However, there is currently no effective treatment against non-alcoholic steatohepatitis other than the control of risk factors (limitation of overweight, prevention of insulin resistance, etc.). A good knowledge of these risk factors is therefore important in the control of the occurrence and aggravation of this pathology. Risk factors for NAFLD include genetic factors, but also obesity, diabetes, insulin resistance, cardiovascular alterations and hyper-triglyceridemia. But environmental contaminants, mainly those of the endocrine disrupting type are also suspected of playing a role that is important to characterize.

This project aims to characterize a large number of pesticides to which the French population is subjected by food in relation to their possible steatogenic nature. It will provide data to risk assessment agencies to take into account this "endocrine disruption" characteristic that is currently not taken into account in risk assessment. This project also validates tools for assessing the metabolic character of contaminants that are not currently available. It finally allows to document the cocktail effect through simultaneous activation of 2 nuclear receptors involved in the regulation of the same metabolic pathways and in a common organ, the liver.

Livrables attendus et valorisation des résultats au bénéfice d'Écophyto

Les résultats du projet SYNEPEST seront d'abord communiqués par des présentations lors de congrès nationaux et internationaux consacrés à la toxicologie et / ou à l'endocrinologie (Société française de toxicologie et d'endocrinologie, Gordon Conférence sur les perturbateurs endocriniens etc.) à l'obésité, ainsi que la NAFELD / NASH. Par la suite, la publication des données sera formalisée sous forme de publications scientifiques soumises à des revues internationales. La valorisation du projet permettra aux organismes de réglementation (ANSES, EFSA, etc.) d'améliorer l'évaluation des risques et l'établissement de valeurs toxicologiques de référence.

Expected deliverables and optimization of results for the benefit of Écophyto

The results of the SYNEPEST project will first be communicated through presentations at national and international congresses devoted to toxicology and / or endocrinology (French Toxicology and Endocrinology Society, Gordon Endocrine Disruptors Conference, etc.) Obesity and NAFELD/NASH. Subsequently, publication of the data will be formalized in the form of scientific publications submitted to international journals. The valorisation of the project will enable the regulatory agencies (ANSES, EFSA, etc.) to improve the risk assessment and the establishment of reference toxicological values.

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 SYNEPEST est de 479936 €, la demande de participation est de 108 000 €

Pour le partenaire 1, le personnel permanent est impliqué dans le projet: Colette Betouillère (technicienne) pour la maintenance des animaux, Frédérique Lasserre (assistant ingénieur) pour la réalisation d'expériences animales, QPCR et analyses biochimiques avec l'aide de Laurence Payrastra (chercheur) et Laila Lakhall (ingénieur). Herve Guillou (directeur de recherche) contribuera aux discussions / à l'interprétation des résultats. Le coût de tout ce personnel s'élève à 283 540 €. 70 000 € d'euros sont demandés pour la mise en œuvre du projet, dont 35 000 € pour l'achat et l'entretien d'expériences animales ; 30 000 € pour l'achat de réactifs de biochimie moléculaire et de biologie; 5000 € pour les missions et les frais de bureau.

Pour le partenaire 2, le personnel permanent est impliqué dans le projet: deux ingénieurs pour les expériences de dépistage *in vitro*. Le directeur de recherche de Patrick Balaguer sera impliqué dans les discussions / l'interprétation des résultats et la coordination du projet. Le coût de tout ce personnel s'élève à 85 396 €. 30 000 € d'euros sont demandés pour le projet, dont 29 000 € pour l'achat de consommables (milieu plastique et culture, réactifs pour l'expression de la luciférase, pesticides et ligands PXR et CAR) et 1000 € pour les missions.

Financial characteristics (total amount of the project, possible technical phasing...) and motivated grant proposal (eligible expenditure, grant rate and amount, special conditions...)

The total cost of the SYNEPEST project is 479936 €, the request participation is of 108000 €

For the Partner 1 permanent staff are involved in the project: Colette Betouillère (technicien) for the maintenance of animals, Frederique Lasserre (assistant engineer) for the realization of animal experiments, QPCR and biochemical assays with the help of Laurence Payrastra (researcher) and Laila Lakhall (engineer). Herve Guillou (research director) will contribute to the discussions / interpretation of the results. The cost of all these personnel amounts to 283 540 €. 70 000 € euros are requested for the implementation of the project, of which 35 000 € for the purchase and maintenance of animals and animal experiments; 30 000 € for the purchase of molecular biochemistry and biology reagents; 5000 € for missions and office expenses.

For Partner 2, permanent staff are involved in the project: two engineer for the *in vitro* screening experiments. Patrick Balaguer research director will be involved in discussions / interpretation of results and coordination of the project. The cost of all these personnel amounts to 85, 396 €. 30 000 € euros are requested for the project, including 29 000 € for the purchase of consumables (plastics and

culture medium, reagents for luciferase expression, pesticides and PXR and CAR ligands) and 1000 € for missions.

7 – Le calendrier prévisionnel de réalisation

Date of project start:

Le début du projet est souhaité pour janvier 2018

Durée prévisionnelle du projet :

La durée du projet est estimée à 36 mois.

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

- au référent Écophyto II : à mi-projet en partant de la signature de la convention

Le rapport scientifique à mi-parcours sera envoyé au correspondant d'Ecophyto II 18 mois après le début du projet, en juin 2019.

- et à l'Onema (rapport validé) : à mi-projet +6 mois après la signature de la convention.

Le rapport scientifique à mi-parcours sera envoyé à ONEMA en janvier 2020.

Période de remise du rapport scientifique ou technique final :

- au référent Écophyto II à l'issue de la durée du projet

Le rapport scientifique final sera envoyé au référent Ecophyto II en janvier 2021

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

Le rapport scientifique final sera envoyé à ONEMA au plus tard en janvier 2021

Planned implementation schedule

Date of project start:

Start of project is desired for January 2018

Expected duration of the project:

The duration of the project is estimated for 36 months.

Dead-line for the middle-way scientific or technical report (except for the one year long projects):

- to the Écopyto II contact point for the ministry: after signing the agreement

The mid-term scientific report will be sent to the correspondent of Ecophyto II 18 months after the beginning of the project i.e. in June 2019.

-to Onema (validated report): half-point + 6 months after signing the agreement

The mid-term scientific report will be sent to ONEMA in January 2020.

Dead-line for the final scientific or technical report:

- to the Écopyto II contact point for the ministry at the end of the project

The final scientific report will be sent to the Ecophyto II referent in January 2021

- to Onema (validated report) no later than the project duration + 12 months

The final scientific report will be sent to ONEMA no later than January 2021

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.