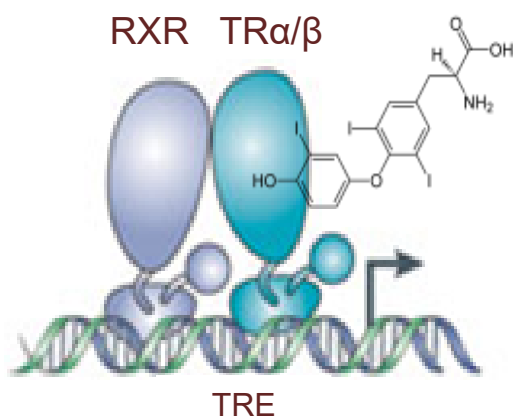


1. Contexte/justification scientifique

L'hormone thyroïdienne (T3) exerce un contrôle important sur de nombreux processus physiologiques et développementaux, agissant directement sur l'expression des gènes dans de nombreux types cellulaires, en modifiant la conformation des récepteurs nucléaires TR α 1 et TR β 1/2 (collectivement TRs). Ce changement de conformation modifie les interactions protéiques, favorisant le recrutement de coactivateurs de transcription. Il existe dans le génome des milliers de site de fixation des TRs, et des centaines de gènes cibles [1]. Un déficit précoce de T3, l'hypothyroïdie congénitale [2], ou une mutation du récepteur TR α 1 [3], peuvent entraîner un retard mental sévère et irréversible. C'est l'irréversibilité des dommages neurodéveloppementaux qui nous amènent à leur accorder un intérêt particulier, bien qu'un déficit de T3 ait bien d'autres conséquences [4]. Les données génétiques que nous avons obtenues chez la souris indiquent que la fonction de TR α 1 est prépondérante dans le neurodéveloppement et que ce récepteur exerce son influence notamment sur la différenciation des neurones inhibiteurs GABAergiques. Cette influence initiale limitée se traduit par un déficit de sécrétion de neurotrophines, qui altère de façon globale le neurodéveloppement [5, 6].

L'exposition des enfants en bas âge à des perturbateurs thyroïdiens (PTs) est ainsi fortement suspectée d'affecter leurs fonctions cognitives. Une exposition modérée pourrait, tout comme une hypothyroïdie légère, entraîner des troubles cognitifs chroniques (déficit de QI, déficit d'attention, tendance à la dépression et l'anxiété). Nous ignorons toutefois si la contamination de la chaîne alimentaire par les PTs est suffisante pour constituer un réel péril pour la population générale. Des données épidémiologiques récentes montrent un défaut de QI chez les enfants exposés aux pesticides (Etude CHARGE [7]). Cette conclusion est en accord avec des données précédentes, montrant qu'une exposition particulière des enfants aux organophosphates altère leurs fonctions cognitives [8] et peut causer un déficit d'attention [9]. Si ces défauts reflétaient une perturbation de la signalisation thyroïdienne, on devrait en conclure que les tests de toxicité actuels, qui ont conduit à l'autorisation des organophosphates, n'évaluent pas convenablement la capacité des composés chimiques d'agir en tant que PT. Or les tests actuels présentent des failles à nos yeux importantes, parce qu'ils n'envisagent pas que la perturbation puisse résulter non pas d'une modification des niveaux circulants d'hormone, mais d'une altération de la sensibilité cellulaire à l'hormone.



Mode d'action principal de l'hormone thyroïdienne. Les récepteurs, TR α 1 ou TR β 1/2, agissent sous forme d'hétérodimères avec un autre récepteur nucléaire RXR. Les hétérodimères sont fixés sur des éléments de réponse (TRE) de type DR4 (5'AGG(T/G)CANNNNAGG(T/G)CA3'). La fixation de T3 sur TR modifie la conformation du domaine C-terminal et induit le recrutement de coactivateurs, au détriment des corépresseurs de transcription. La fixation d'un ligand sur RXR semble être sans effet.

Mode d'action des PTs. Le maintien d'un niveau physiologique de signalisation thyroïdienne dans le système nerveux central en développement nécessite une régulation précise et dynamique, qui fait intervenir de nombreux paramètres. Les PTs peuvent donc agir à de multiples niveaux: production de thyroxine par la glande thyroïdienne (celle de la mère, du fœtus ou des enfants en bas âge), conversion de la thyroxine en T3 par les désiodases, transport dans les cellules neurales, fixation aux récepteurs et recrutement de coactivateurs sur la chromatine, etc. En revanche, il n'existe à ce jour aucun PT identifié agissant clairement comme un ligand antagoniste de TR α 1 ou TR β 1/2, et encore

moins comme des antagonistes sélectifs d'un des récepteurs. Pourtant s'il s'avérait qu'il existe de tels PTs agissant comme des antagonistes sélectifs de TR α 1, il y a fort à parier qu'ils provoqueraient de fortes altérations du neurodéveloppement, tout comme les mutations génétiques qui inactivent ce récepteur. Malgré leur risque potentiel, ces molécules ne sont pas identifiables par une analyse toxicologique classique qui focalise sur les niveaux d'hormones thyroïdiennes circulantes. Le maintien du niveau circulant de T3 est en effet une fonction essentiellement dédiée à TR β 1/2. Ce programme explore donc la possibilité, inquiétante et rarement prise en compte, que certains xénobiotiques interfèrent directement avec la fonction de TR α 1, soit directement, en se fixant sur le récepteur, soit indirectement, en interférant avec son action au niveau de la chromatine.

Les pesticides. Les Européens sont exposés à des multitudes de contaminations par des pesticides de toute nature et par leurs dérivés. En France, un plan interministériel de réduction des risques liés aux pesticides a été mis en place en juin 2006 et le Grenelle de l'environnement a confirmé les orientations de ce plan, qui vise à réduire le nombre et les quantités de produits utilisés. Un rapport de l'UE en 2006 en dénombre 55 retrouvés dans les fruits, légumes et céréales commercialisés¹. Nous avons testé 28 de ces pesticides, parmi les plus abondants et les plus persistants (voir le tableau pour 16 d'entre eux).. Plusieurs ont montré une activité significative à concentration modérée (10⁻⁷M) dans deux tests cellulaires indépendants. L'un de ces tests est basé sur un récepteur chimérique Gal4-TR α 1(LBD) exprimé dans la lignée cellulaire humaine HEK293. L'autre repose sur la régulation du promoteur d'un gène cible de TR α 1, *Hairless*, dans les cellules murines C17.2 α , qui sont des cellules neurales transfectées pour exprimer de façon stable le récepteur TR α 1. Les deux tests utilisent un gène rapporteur luciférase, et ont été validés précédemment pour des agents ignifugeants [10]. La dernière colonne du tableau rapporte nos résultats.

Nom	Classe	Possible neurotox	Mesure d'interdiction	Possible PT	Résultats des tests
Azoxystrobin	strobilurines.			√	√√
Bifenthrin	Pyrèthroïde	√			√
Chlorpyrifos	Organophosphate	√			
Chlorpyrifosmethyl	Organophosphate	√			
Cypermethrine	Pyrèthroïde	√			
Deltamethrin	Pyrèthroïde	√			
Dienochlore	Organochloré				√√
Dieldrin ¹	Organochloré	√	1972	√	√
Fenitrothion	Organophosphate	√		√	√√
Imidacloprid	Neonicotinoïde	√			√
Malathion ²	Organophosphate	√	2008	√	
Penconazole	Triazole				
Piperonyl-butoxide	Autre			√	√√
Phosalone	Organophosphate		2006	√	
Quinoxifene ³	Quinoline		1996	√	√√
Tau-Fluvanilate	Pyrèthroïde				

¹ Encore présent dans l'environnement. ² Autorisation temporaire en 2014 pour lutter contre le chikungunya. ³ Dérogations possibles. √√ : Molécules actives dans les deux tests cellulaires.

L'essentiel de ce programme est consacré aux cinq molécules les plus actives. Nous continuerons toutefois à rechercher d'autres substances actives *in vitro*. Nous testerons également ces molécules en mélange. Cette approche se justifie en particulier pour le piperonyl-butoxide qui n'est pas utilisé

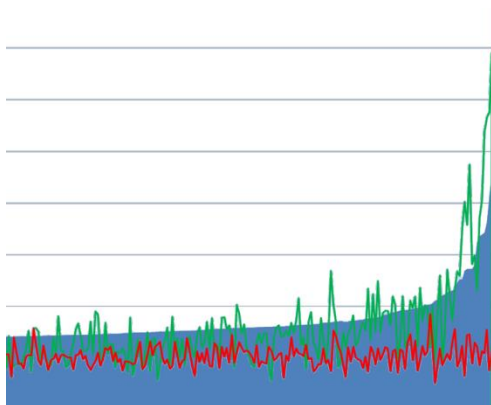
¹ www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/.../4038.pdf

seul, mais comme synergisant dans des préparations d'insecticides. Pour prendre en compte la possibilité d'un effet synergique de mélanges de PTs à dose faible, et la génération de PTs persistants par métabolisation des pesticides, nous testerons également des échantillons d'eau prélevés dans un environnement agricole ou urbain.

Les tests. En Juillet 2014, un rapport d'expertise commandé par l'OCDE a fait le bilan de 18 tests proposés pour évaluer la capacité de substances chimiques à agir comme des perturbateurs thyroïdiens². Cette prolifération de tests s'explique par le fait qu'aucun ne donne entière satisfaction, qu'il soit basé sur l'utilisation de modèles animaux, de modèles cellulaires ou d'analyses moléculaires *in vitro*. Notre programme reposera sur des tests innovants déjà développés par les partenaires, *in vitro* et *in vivo*, et tentera d'en valider de nouveaux.

Test N°1: Un test in vitro pangénomique

Dans le cadre de l'étude de faisabilité Toxicogenomic2, financée par l'ANSES (2013-2014), l'équipe IGFL a montré qu'une analyse globale du transcriptome (RNAseq) de cellules neurales murines (C17.2α) [1] procurait des avantages décisifs sur les autres approches *in vitro* : vision globale de la réponse cellulaire, définition précise de la voie de signalisation affectée, et puissance statistique inégalable, parce que le niveau d'expression de chacun des centaines de gènes cibles de TRα1 peut être utilisé comme « end-point » [10]. Ce test RNAseq *in vitro* sera appliqué pour les substances actives identifiées. Nous testerons diverses possibilités pour en réduire le coût.



Altération de la réponse à T3 des cellules C17.2α par des agents ignifugeants. En bleu le niveau d'induction par T3 de 200 gènes, classés par ordre croissant de taux d'induction (échelle log2 réponse à la T3 10⁻⁹M 6h). En vert la réponse des mêmes gènes à la T3 en présence de BDE-209 (10⁻⁸M). En rouge en présence de TBBPA (10⁻⁵M). A noter que l'effet potentiateur du BDE-209 (p<0.05) ne serait pas détectable si un seul gène était utilisé comme indicateur.

Test N°2 : Un test in vivo doté d'une grande puissance statistique

Les tests *in vivo* sont coûteux et longs, et souvent pointés du doigt pour des raisons éthiques s'ils sont réalisés chez des rongeurs. Comme ils sont en général réalisés que sur un petit nombre d'animaux, ils manquent essentiellement de puissance statistique. Ils présentent néanmoins l'avantage irremplaçable de détecter l'action perturbatrice des métabolites que les cellules de l'organisme peuvent générer à partir des produits testés, et de prendre en compte toute la complexité des paramètres pharmacodynamiques en jeu. Par ailleurs les paramètres mesurés, niveaux d'hormones circulant, histologie de la glande thyroïde, ne constituent que des indications très indirectes du niveau de signalisation hormonal dans le cerveau juvénile [11, 12]. La société Watchfrog, partenaire du projet, apportera un test *in vivo* original, dont les performances sont bien supérieures aux autres tests, notamment le test classique de métamorphose des têtards. Dans les têtards transgéniques *Thb/ZIP-gfp*, la T3 déclenche l'expression du gène rapporteur *gfp* en 24 heures [13]. La fluorescence des têtards, qui peuvent être nombreux, est une mesure qui s'avère précise, spécifique et reproductible du niveau de signalisation thyroïdienne. Ce test représente une

²<http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono%282014%2923&documentlanguage=en>.

amélioration notable en termes de rapidité, de précision, et de puissance statistique. Il est en cours de validation par l'OCDE et a été validé par l'AFNOR sous la forme d'une norme expérimentale³. Les points faibles de ce test sont l'utilisation d'un unique « end-point », et la distance évolutive entre amphibiens et mammifères. Même si la voie de signalisation thyroïdienne, et la structure des récepteurs, sont fortement conservées, un métabolisme différent des xénobiotiques ne peut être exclue *a priori*.

Test N°3 : Un test in vivo et pangénomique.

L'équipe IGFL travaille depuis plusieurs années à la mise en place d'un test *in vivo* chez la souris combinant puissance statistique et pertinence physiologique. Il repose sur l'analyse du transcriptome dans le cerveau de souris en cours de développement, au sein des populations neuronales. Cet objectif est compliqué par le fait que les neurones les plus sensibles à la T3, qui sont les neurones inhibiteurs GABAergiques [6, 14] sont très minoritaires dans de nombreuses aires cérébrales. C'est le cas en particulier dans le cervelet, dont le développement post-natal reste un modèle privilégié pour étudier la fonction neurodéveloppementale de la T3. La seule exception est le striatum, très riche en neurones GABAergiques, qui sera de ce fait privilégié dans un premier temps. Nous avons tenté d'améliorer une méthode initialement proposée par N Heinz [15] puis reprise par d'autres, qui consiste à exprimer dans le type cellulaire choisi une protéine ribosomale « taguée ». Ceci permet d'obtenir à partir de cerveau entier des préparations enrichies en ARN messagers en cours de traduction dans un type cellulaire prédéfini. Au cours de ce programme, nous validerons l'utilisation des modèles des souris transgéniques que nous avons produits récemment, en les utilisant pour étudier à l'échelle pangénomique la réponse des neurones GABAergiques à des variations de signalisation thyroïdienne. Cette altération sera produite par une mutation de TRα1 limitée à ces cellules, ou par exposition à un pesticide actif *in vitro*. Il faut noter qu'une dysfonction du système GABAergique est invoquée dans de nombreuses pathologies neurodéveloppementales : autisme, déficit d'attention, anxiété élevée.

2. Description du projet -

Le projet abordera trois questions :

- Existe-t-il des pesticides présents dans l'environnement qui agissent comme des perturbateurs thyroïdiens à des doses réalistes?
- Les mélanges ont-ils un effet synergique?
- Les doses d'exposition estimées chez l'homme, sont-elles en mesure de mettre en péril le neurodéveloppement des foetus et les capacités cognitives des enfants?

Changements par rapport à la demande 2015

Ce programme a été retenu par le conseil scientifique mais n'a pas été financé en 2015. Quelques adaptations sont à noter :

- 1) La part de budget attribué au partenaire privé Watchfrog est diminuée, en raison d'une implication réduite.
- 2) Le programme fait appel à un plus grand nombre d'analyse RNAseq. Il tire avantage de la présence d'un plateau de séquençage NGS local Ion Proton (Thermo) qui a déjà fait preuve de sa compétence et de sa réactivité.
- 3) La lignée cellulaire Dev s'est avérée inutilisable. En revanche nous avons récemment découvert que la lignée cellulaire neurale humaine SHSY5Y fait partie des rares lignées cellulaires qui répondent spontanément à la T3. Elle apportera probablement un complément utile à la lignée cellulaire

³ Norme AFNOR XP T 90-716-1. Qualité de l'eau — Mesure par fluorescence *in vivo* des effets perturbateurs endocriniens des eaux naturelles et eaux résiduaires — Partie 1 : Mesure des effets sur l'axe thyroïdien d'embryons d'amphibiens (*Xenopus laevis*)

murine, C17.2 α , utilisée jusqu'à présent, transfectée pour exprimer TR α 1 et répondre à la T3. Il est à noter que la technologie Ampliseq, qui permet une réduction notable des coûts du RNAseq (250 €/banque au total), n'est pour l'instant disponible que pour les cellules humaines.

Tâche 1 : Coordination

1-1) Des réunions semestrielles seront organisées pour coordonner les efforts des deux partenaires.

Tâche 2 : test in vitro sur des lignées dotées d'un gène rapporteur

2-1) Test d'échantillons d'eau prélevés dans des zones agricoles ou urbaines dotés d'une activité perturbatrice thyroïdienne dans le test sur têtards de Xénope. Ces échantillons seront identifiés en dehors de ce programme par la société Watchfrog.

2-2) Test de nouveaux pesticides.

2-3) Test de mélanges de substances actives. Recherche d'éventuelles synergies.

Risques inhérents à la tâche 2. Solutions envisagées. Le choix des pesticides à tester peut varier en fonction de la mise sur le marché de nouvelles molécules, ou de nouvelles informations sur les contaminations environnementales. Seuls une dizaine de pesticides courants n'ont pas encore été testés. Nous testerons la possibilité qu'une activité apparaisse lorsque des substances inactives individuellement sont mélangées. En cas de détection de préparations environnementales actives (1-1), nous nous rapprocherons de l'Institut des Sciences Analytiques (Villeurbanne) pour un futur fractionnement et une identification des composés actifs, qui n'entre pas dans le cadre de ce programme.

Tâche 3 : Analyse du transcriptome de lignées cellulaires neurales par RNAseq

Deux lignées cellulaires sont utilisables : la lignée murine neurale transfectée C17.2 α , utilisée précédemment, et la lignée neurale humaine SHSY5Y dont nos résultats récents indiquent qu'elle exprime spontanément TR α 1 et peut répondre à la stimulation par T3.

3-1) Comparaison pangénomique de la réponse des cellules C17.2 α et SHSY5Y à des doses croissantes de T3. Analyse bioinformatique comparée. Choix de la lignée la plus propice pour les tests suivants. 8 banques RNAseq au total.

3-2) Test des 5 substances individuelles les plus actives sur les cellules (T3 à 10⁻⁹M, doses croissantes de pesticide. 24 banques RNAseq au total).

3-3) L'ensemble des données de transcriptome seront regroupées dans une seule base de données.

L'analyse bioinformatique devra :

- Comparer la réponse transcriptionnelle des cellules C17.2 α et SHSY5Y à la T3.
- Quantifier l'effet PTs, et déterminer les valeurs seuils.
- Définir si tous les gènes cibles de TR α 1 sont perturbés de manière coordonnée ou si des sous-groupes de gènes peuvent être distingués de ce point de vue (analyse en clustering)
- Analyser les effets des pesticides qui sont indépendants de la signalisation thyroïdienne (« Gene set enrichment analysis » ou GSEA)

Risques inhérents à la tâche 3. Solutions envisagées. S'il s'avérait que les cellules SHSY5Y et C17.2 α répondent de façon qualitativement différente à la T3, nous serions amenés à tester toutes les molécules dans les deux types cellulaires, ce qui augmenterait le nombre de banques RNAseq à préparer. A ce jour les molécules privilégiées sont le dieldrine, le fenitrothion, le piperonyl-

butoxide et le quinoxifène. Elles appartiennent à des classes chimiques distinctes : organochlorés, organophosphates, pyrèthroïdes. Nous n'étudierons que l'action de ces molécules sur le transcriptome cellulaire, sans tester d'hypothèse sur leur mécanisme d'action. En absence de similarité structurale, il est improbable que ces substances agissent comme des ligands de TR α 1.

Tâche 4 : Tests in vivo

4-1) Tests des 5 substances individuelles les plus actives sur les têtards transgéniques. Réalisation de courbes de dose-réponse pour couvrir une gamme allant jusqu'à des concentrations environnementales.

4-2) Définition du répertoire de gènes cibles de TR α 1 dans les neurones GABAergiques de la souris. Nous utiliserons un modèle, que nous avons produit, de souris combinant trois transgènes: 1) le transgène « floxé » L10GSa (version « taguée » de la protéine ribosomique L10a). 2) Le transgène Gad2Cre qui assure une recombinaison spécifique Cre/loxP dans les neurones GABAergiques [16]. 3) éventuellement l'allèle « floxé » TR α ^{AM1} [17] (absent des souris contrôles). L'immunoprécipitation des polysomes extraits du cervelet entier 8 ou 15 jours après la naissance (P8, P15) donnera accès au transcriptome des neurones GABAergiques du cervelet en cours de maturation. L'ARN extrait du striatum entier, très riche en neurones GABAergiques, servira de point de comparaison. Quatre groupes de quatre animaux fourniront un total de 32 échantillons d'ARN. L'analyse comparée, permettra de définir l'influence d'une mutation de TR α 1 sur l'expression des gènes dans ces neurones. Une première analyse en RT-qPCR testera l'expression de gènes cibles connus de TR α 1 (*Hr*, *Klf9*, *Dbp*). Elle sera suivie en cas de succès d'une analyse par RNAseq (32 banques). 32 analyses RNAseq au total.

4-3) Exposition de souris gestantes L10GSa/Gad2Cre au pesticide le plus actif à faible dose (voie orale depuis la mi-gestation jusqu'à P15, 3 concentrations testées). Analyse du transcriptome neuronal GABAergique du striatum et du cervelet à P15. Six souris par lot (24 analyses RNAseq au total). Analyse bioinformatique ciblée sur les gènes identifiés lors de la tâche 3-2.

Risques inhérents à la tâche 4. Solutions envisagées.

La tâche 4-1 suffit à démontrer qu'une substance peut être qualifiée sans ambiguïté de perturbateur thyroïdien, mais se limite à un seul paramètre observable. Le succès de la tâche 4-2, qui conditionne la réalisation de la tâche 4-3, dépend essentiellement du protocole d'immunoprécipitation qui s'est avéré difficile à réaliser. Le succès de cette étape peut être évalué par RT-qPCR, en définissant le taux d'enrichissement obtenus pour des ARNm spécifiques des neurones GABAergiques (*Gad2*, *Parv*, *Pcp2*). Notre objectif est d'atteindre un degré d'enrichissement >5.

Les partenaires

Partenaire N°1 : L'équipe « Génomique Fonctionnelle de la signalisation thyroïdienne » est située à l'Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon, l'un des laboratoires de biologie de l'École Normale Supérieure de Lyon. Elle est composée des personnels suivants (implication dans le projet en %) :

Frédéric Flamant DR2 INRA (30%)

Sabine Richard CR1 INRA (20%)

Karine Gauthier CR1 CNRS (10%)

Jacques Samarut PuPH (0%)

Denise Aubert IR1 INRA (10%)

Romain Guyot IR2 CNRS (50%)

Suzy Markossian IE INRA (30%)

Son activité est centrée sur la fonction développementale, plus particulièrement neurodéveloppementale, des récepteurs TR α 1 et TR β 1/2 chez la souris. Elle s'est distinguée par son

expertise en matière de transgénèse animale, qui lui permet de disposer d'une collection unique de modèles transgéniques pour l'analyse de la signalisation thyroïdienne *in vivo*, et d'analyse pangénomique de l'expression des gènes. Son activité est actuellement financée par un contrat ANR (Thyromut2, 2016-2020) dédié à l'étude des mutations génétiques de TR α 1 chez l'homme. F Flamant est également éditeur associé de la revue *Endocrinology*, et directeur adjoint de l'IGFL.

5 Publications récentes :

Production Scientifique : 63 publications. H-index : 22

Choix de 5 publications récentes :

- A Novel Mutation in THRA Gene Associated With an Atypical Phenotype of Resistance to Thyroid Hormone. Espiard S, et al *J Clin Endocrinol Metab*. 2015 Aug;100(8):2841-8
- Toxicogenomic analysis of the ability of brominated flame retardants TBBPA and BDE-209 to disrupt thyroid hormone signaling in neural cells. Guyot R, Chatonnet F, Gillet B, Hughes S, Flamant F. *Toxicology*. 2014 Nov 5;325:125-32
- Purkinje cells and Bergmann glia are primary targets of the TR α 1 thyroid hormone receptor during mouse cerebellum postnatal development. Fauquier T, Chatonnet F, Picou F, Richard S, Fossat N, Aguilera N, Lamonerie T, Flamant F. *Development*. 2014 Jan;141(1):166-75
- Genome-wide analysis of thyroid hormone receptors shared and specific functions in neural cells. Chatonnet F, Guyot R, Benoît G, Flamant F. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Feb 19;110(8):E766-75
- Thyroid hormone triggers the developmental loss of axonal regenerative capacity via thyroid hormone receptor α 1 and krüppel-like factor 9 in Purkinje cells. Avci HX, Lebrun C, Wehrlé R, Doulazmi M, Chatonnet F, Morel MP, Ema M, Vodjdani G, Sotelo C, Flamant F, Dusart I. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Aug 28;109(35):14206-11.

Partenaire N°2 : Société Watchfrog.

WatchFrog. (<http://www.watchfrog.fr>) est une société de biotechnologie innovante basée à Evry. Son effectif est compris entre 10 et 19 salariés. En 2014 elle a fait un chiffre d'affaires de 543 400,00 €. Watchfrog a émané en 2005 des recherches du laboratoire Régulations, Développement et Diversité Moléculaire du Muséum National d'Histoire Naturelle à l'initiative du Professeur Barbara Demeneix (médaillon de l'innovation CNRS 2014). Elle est dirigée par Gregory Lemkine, un chercheur auteur de 13 publications dans le domaine de la physiologie, l'écotoxicologie et de la transgénèse animale. Watchfrog a généré une collection de modèles transgéniques, poissons et xénopes, porteurs de gènes rapporteurs fluorescents et des méthodes semi-automatiques de quantification de la fluorescence *in situ*. Elle réalise des études à la demande des industries pharmaceutique, cosmétique, chimique, et des collectivités locales pour analyser la qualité des eaux, tester des produits de grande consommation et cribler des chimothèques. Elle est propriétaire du test qui consiste à détecter des PTs potentiels à l'aide de larves de Xénope transgéniques.

Future water quality monitoring - Adapting tools to deal with mixtures of pollutants in water resource management. Altenburger et al *Sci Total Environ*. 2015 Apr 15;512-513:540-51.

Rapid fluorescent detection of (anti)androgens with spiggin-gfp medaka. Sébillot A, et al *Environ Sci Technol*. 2014 Sep 16;48(18):10919-28. doi: 10.1021/es5030977. Epub 2014 Aug 29.

The SOLUTIONS project: challenges and responses for present and future emerging pollutants in land and water resources management. Brack W, et al *Sci Total Environ*. 2015 Jan 15;503-504:22-31.

Optimizing fluorescent protein choice for transgenic embryonic medaka models. Loire N, et al *Environ Toxicol Chem*. 2013 Oct;32(10):2396-401.

Oestrogen reporter transgenic medaka for non-invasive evaluation of aromatase activity. Spirhanzlova et al. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2016 Jan;179:64-71.

Calendrier (P1 : IGFL P2 : Watchfrog)

Tâche	S1	S2	S3	S4
1-1				P1
2-1		P2 P1		
2-2	P1			
2-3		P1		
3-1		P1		
3-2			P1	
3-3			P1	
4-1			P2	
4-2		P1		
4-3				P1

6. Actions de valorisation

Le programme est destiné à la publication dans des journaux internationaux de données qui ne pourront être immédiatement utilisées pour une action réglementaire, mais devraient informer les autorités de risques sanitaires éventuels. Il validera de nouveaux outils exploitables pour des programmes futurs sur les PTs. Il produira également une base de données transcriptomiques qui sera disponible pour découvrir d'autres activités biologiques des pesticides. L'éventuelle découverte de molécules agissant spécifiquement sur l'activité des TRs pourrait servir de base au développement de nouvelles molécules à visée thérapeutique, permettant d'agir sur la signalisation thyroïdienne. Il existe une forte demande pour des molécules pouvant agir sur la fonction des TRs dans certains tissus seulement, notamment le foie, qui ne posséderaient pas la toxicité cardiaque de la T3 elle-même [18].

7. Considérations légales et éthiques

Ce programme s'inscrit dans l'optique non seulement d'améliorer la fiabilité des tests mais également de réduction de l'utilisation des modèles animaux pour l'analyse toxicologique, en utilisant en priorité des modèles cellulaires. Les têtards transgéniques seront utilisés à un stade de développement qui précède l'élaboration d'un système sensoriel de perception de la douleur. Parce qu'elle utilise des centaines de gènes comme points de mesure, l'analyse transcriptomique chez la souris offre une très grande puissance statistique, qui permet de mettre en évidence des effets modestes avec de très petits nombres d'animaux. Les partenaires disposent des autorisations nécessaires pour l'expérimentation animale et l'utilisation d'OGM.

7 Adéquation à l'annexe « Questions à la recherche » de l'appel d'offre.

Ce programme concerne le plan Ecophyto et devrait apporter des éléments informatifs pour l'évaluation des risques pour la santé humaine liés à l'utilisation des pesticides: doses limites, fenêtre d'exposition critique, amplitude des effets attendus.

Ce programme pourrait révéler que certains pesticides entrent dans la catégorie des Agents chimiques et polluants émergents. Le programme constitue un banc d'essai pour la mise au point d'outils innovants, tant *in vitro* que *in vivo*, permettant de définir les PTs sur des bases nouvelles et rigoureuses. L'analyse du transcriptome, encore coûteuse et difficile, est amenée à se simplifier et son coût ne cesse de baisser. A terme nous envisageons l'établissement d'une plate-forme de criblage progressivement automatisée. Nous avons la conviction qu'elle peut déjà apporter beaucoup à l'analyse des perturbateurs endocriniens, et notamment identifier de nouveaux biomarqueurs utilisables en routine (les relations entre transcriptome neuronale et métabolome

sanguin et urinaire sont explorées par l'équipe IGFL en dehors de ce programme). Les risques neurodéveloppementaux étudiés concernent avant tout la population des enfants en bas âge.

References citées

1. Chatonnet, F., et al., *Genome-wide analysis of thyroid hormone receptors shared and specific functions in neural cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. 110(8): p. E766-75.
2. Bernal, J., *Thyroid hormone receptors in brain development and function*. Nat Clin Pract Endocrinol Metab, 2007. 3(3): p. 249-59.
3. Dumitrescu, A.M. and S. Refetoff, *The syndromes of reduced sensitivity to thyroid hormone*. Biochim Biophys Acta, 2013. 1830(7): p. 3987-4003.
4. Zoeller, T.R., *Environmental chemicals targeting thyroid*. Hormones (Athens), 2010. 9(1): p. 28-40.
5. Picou, F., et al., *Deciphering direct and indirect influence of thyroid hormone with mouse genetics*. Mol Endocrinol, 2014. 28(4): p. 429-41.
6. Fauquier, T., et al., *Purkinje cells and Bergmann glia are primary targets of the TRalpha1 thyroid hormone receptor during mouse cerebellum postnatal development*. Development, 2014. 141(1): p. 166-75.
7. Shelton, J.F., et al., *Neurodevelopmental disorders and prenatal residential proximity to agricultural pesticides: the CHARGE study*. Environ Health Perspect, 2014. 122(10): p. 1103-9.
8. Munoz-Quezada, M.T., et al., *Neurodevelopmental effects in children associated with exposure to organophosphate pesticides: a systematic review*. Neurotoxicology, 2013. 39: p. 158-68.
9. Bouchard, M.F., et al., *Attention-deficit/hyperactivity disorder and urinary metabolites of organophosphate pesticides*. Pediatrics, 2010. 125(6): p. e1270-7.
10. Guyot, R., et al., *Toxicogenomic analysis of the ability of brominated flame retardants TBBPA and BDE-209 to disrupt thyroid hormone signaling in neural cells*. Toxicology, 2014. 325C: p. 125-132.
11. Quignodon, L., et al., *Thyroid hormone signaling is highly heterogeneous during pre- and postnatal brain development*. J Mol Endocrinol, 2004. 33(2): p. 467-76.
12. Hernandez, A., et al., *Type 3 deiodinase deficiency causes spatial and temporal alterations in brain T3 signaling that are dissociated from serum thyroid hormone levels*. Endocrinology, 2010. 151(11): p. 5550-8.
13. Fini, J.B., et al., *An in vivo multiwell-based fluorescent screen for monitoring vertebrate thyroid hormone disruption*. Environ Sci Technol, 2007. 41(16): p. 5908-14.
14. Gil-Ibanez, P., B. Morte, and J. Bernal, *Role of thyroid hormone receptor subtypes alpha and beta on gene expression in the cerebral cortex and striatum of postnatal mice*. Endocrinology, 2013. 154(5): p. 1940-7.
15. Doyle, J.P., et al., *Application of a translational profiling approach for the comparative analysis of CNS cell types*. Cell, 2008. 135(4): p. 749-62.
16. Taniguchi, H., et al., *A resource of Cre driver lines for genetic targeting of GABAergic neurons in cerebral cortex*. Neuron, 2011. 71(6): p. 995-1013.
17. Quignodon, L., et al., *A point mutation in the activation function 2 domain of thyroid hormone receptor alpha1 expressed after CRE-mediated recombination partially recapitulates hypothyroidism*. Mol Endocrinol, 2007. 21(10): p. 2350-60.
18. Flamant, F., K. Gauthier, and J. Samarut, *Thyroid hormones signaling is getting more complex: STORMs are coming*. Mol Endocrinol, 2007. 21(2): p. 321-33.