

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

« TREE, Effets transgénérationnels de l'epoxycnazole »  
"TREE, TRansgenerational Effects of Epoxyconazole "

## 0 – Références au plan Ecophyto

Numéro et libellé de l'action Écophyto II dans lequel s'inscrit le projet :  
Number and description of the Écophyto II action the project refers to:

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

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

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

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

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

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

Date de la demande / Date of demand: 18 février 2017

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

Epoxiconazole, obesogène, fertilité, étude transgénérationnelle, épigénétiques/  
[Epoxiconazole, obesogen, fertility, transgenerational study, epigenetics](#)

## 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: Pr Marie-Christine CHAGNON

Organisme employeur / Employer organization: Université de Bourgogne

Représenté par *nom, prénom* / Represented by *name, first name*: BONNIN Alain

Adresse / Address:

Maison de l'Université – Esplanade Erasme – BP27877 – 21078 DIJON CEDEX

Téléphone / Phone number: 03.80.39.50.00

Mail / E-mail address:

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):

CHAGNON Marie-Christine: [marie-christine.chagnon@u-bourgogne.fr](mailto:marie-christine.chagnon@u-bourgogne.fr) ; (33)  
3.80.77.40.19  
(33) 682216046

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

AUBIN Armelle ; [armelle.aubon@u-bourgogne.fr](mailto:armelle.aubon@u-bourgogne.fr) ; (33) 3.80.39.35.83

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

KRYSHINETS Myriam ; [myriam.kryshinets@u-bourgogne.fr](mailto:myriam.kryshinets@u-bourgogne.fr) ; (33) 3.80.39.36.86

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):

Institut Cochin - INSERM

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.](#)

Le financement sera réparti entre les deux partenaires comme indiqué dans l'annexe financière.

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](#)

Institut Cochin – INSERM U1016 – CNRS UMR 8104 – Université Paris Descartes – 22 rue Méchain 75014 PARIS / [u1016@inserm.fr](mailto:u1016@inserm.fr)/ (33)1.40.51.64.01

Dr VAIMAN Daniel ; daniel.[vaiman@inserm.fr](mailto:vaiman@inserm.fr)/ (33)1.44.41.23.01

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

L'exposition aux pesticides impactent aussi bien les agriculteurs que les consommateurs. Ils sont présents dans l'environnement et les aliments. Dans cette étude, nous focalisons notre attention sur les effets sur la santé d'un des fongicides les plus utilisés en France et très controversé, l'époxiconazole. Utilisé largement sur les cultures céréalières, son autorisation est sujette à débat due à ses méfaits sur la reproduction des mammifères et ses propriétés de perturbateurs endocriniens (PE). Le but de cette étude est d'apporter des éléments sur deux notions émergentes et essentielles de l'action des PE, leur caractère obésogène et la transmissibilité aux générations de leurs effet néfastes et des modes d'action sous-jacents. Ce dernier point soulevant une forte inquiétude car il met en exergue la dangerosité, pour la population générale, de substances chimiques au-delà même de leur interdiction.

## **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'action des perturbateurs endocriniens (PE) impacte plusieurs systèmes hormonaux (sexuels, thyroïdien, glucocorticoïdes...) contrôlant toutes les grandes fonctions biologiques (reproduction, développement, système nerveux...). Plus récemment, le lien entre l'exposition à des PE et les maladies métaboliques (obésité, diabète voire le syndrome métabolique) a été mis en évidence. Ces différentes pathologies sont des facteurs de risques connus de maladies dégénératives plus importantes telles que le cancer et les maladies cardiovasculaires. Les PEs semblent également provoquer des pathologies dans la descendance des individus exposés alors même qu'elle n'a jamais été en présence directe avec l'agent chimique responsable. L'époxiconazole (EPO) est l'un des fongicides les plus utilisés en France dans le traitement des maladies fongiques de différentes cultures (céréales, betteraves sucrières...). L'EPO est un perturbateur endocrinien avec des activités anti-œstrogénique et anti-androgénique notamment *via* sa capacité à inhiber l'aromatase. Il est également considéré comme un reprotoxique probable (classé R1B). A ce jour, aucune étude n'a été réalisée sur l'effet à faibles doses d'EPO sur le métabolisme énergétique et/ou sa capacité à induire des effets transgénérationnels. Dans cette optique, nous nous proposons de vérifier l'hypothèse qu'une exposition périnatale à faibles doses d'EPO chez la souris C57Bl/6 induit des modifications transcriptomiques et épigénétiques dans des organes d'intérêt (foie, intestin grêle, tissus adipeux, testicules et ovaires) impactant la mise en place de l'obésité et de troubles de la fertilité. Ces nouvelles données serviront d'aide à la décision pour les gestionnaires du risque notamment dans le cas de l'EPO, une substance actuellement très controversée.

## **4 – Contexte et questions scientifiques et techniques (nature du domaine scientifique et question posée par le projet)**

Forte préoccupation concernant la toxicité de l'époxiconazole qui est largement utilisé comme fongicides dans les cultures agricoles.

Etude de trois domaines importants et émergents impactés par les perturbateurs endocriniens (perturbation du métabolisme énergétique, effet transgénérationnel et fertilité).

## **5 – Le projet (description du contenu)**

La forte prévalence des troubles liés au système endocrinien tels que les cancers hormono-dépendants, les problèmes de fertilité, les malformations congénitales des organes reproducteurs et les troubles métaboliques conduisant à l'obésité et/ou au diabète représente une préoccupation croissante dans le monde occidental. Des facteurs génétiques, ou liés au style de vie, mais aussi des facteurs environnementaux comme l'exposition aux perturbateurs endocriniens (PEs) [1] peuvent être impliqués dans ces effets indésirables. Une large gamme de pesticides ; des insecticides (DDT, endosulfan, dieldrine, méthoxychlore, dicofol, chlordécone, toxaphène), des nématocides (aldicarbe), des herbicides (alachlore, atrazine, nitrofène, 2,4D), et des fongicides (bénomyl, Mancozeb, vinclozoline) sont connus pour agir comme des perturbateurs endocriniens [2], avec des mécanismes d'action différents observés lors des études *in vivo*. Les caractéristiques communes des fongicides de type azole (époxyconazole, prochloraz et tébuconazole) sont : 1) d'augmenter la durée de la gestation 2) de masculiniser les portées 3) d'affecter les taux sanguins des hormones stéroïdiennes chez les fœtus et/ou les femelles gestantes [3-5]. Ainsi, en Europe les expositions aux pesticides PEs sont fortement susceptibles de contribuer au développement de pathologies tout au long de la vie, avec un coût estimé à 120 milliards d'euros par an [6].

### **5.1 Epoxyconazole**

#### **5.1.1. Etat de l'art :**

L'époxyconazole (EPO; (2RS, 3SR) -1- [3- (2-chlorophényl) -2,3-époxy-2- (4-fluorophényl) -propyl] -1H-1,2,4-triazole, CAS-n°133855-98-8) est un produit phytosanitaire de la classe des triazoles utilisés pour lutter contre diverses maladies fongiques dans différentes cultures : céréales, riz, betteraves à sucre, bananes, café et graines de soja. Il existe plusieurs triazoles tels que le cyproconazole, l'EPO et le prochloraz. Ces substances inhibent l'ergostérol déméthylase (CYP51), une enzyme essentielle dans la synthèse des membranes fongiques, entraînant une perturbation de la membrane. Les fongicides inhibiteurs de la déméthylase (DMI) sont largement utilisés pour traiter les infections fongiques systémiques et locales telles que la candidose ou l'aspergillose et comme pesticides pour protéger les plantes contre les maladies fongiques telles que *septoria tritici* ou *fusarium* [7, 8]. L'EPO est l'un des fongicides les plus utilisés en France. Récemment, une étude a démontré que le niveau d'exposition des agriculteurs sans protection pourrait dépasser de 900% (voir plus) le niveau d'exposition acceptable de l'opérateur à l'EPO (Direction Générale du Travail, 2014) [9].

#### **5.1.2. Métabolisme de l'EPO chez les mammifères**

Après administration orale chez le rat, l'EPO est absorbé rapidement. Il est largement distribué, principalement au niveau du sang, du foie, des reins, de la rate, des poumons et des surrénales. Par contre, son élimination est lente. Plus de 95% de la substance active est excrétée (environ 17% *via* l'urine et environ 78% par les fèces), dans les 168 heures suivant l'administration. Par ailleurs, au moins 47 métabolites ont été identifiés dans l'urine de rat [9].

#### **5.1.3. Exposition humaine et directive de l'Union Européenne.**

Des doses acceptables pour l'EPO pour une exposition aiguë, à court terme ou chronique ont été déterminées. Aucune preuve d'activité génotoxique n'a été trouvée aussi

bien *in vitro* qu'*in vivo* [9]. Une étude de cancérogénicité de 18 mois chez la souris a permis de déterminer une dose journalière admissible (DJA) de 0,008 mg/kg poids corporel (pc)/jour (j). Une dose de référence aiguë (ARfD) de 0,023 mg/kg de poids corporel a été définie chez le rat lors d'une étude de reproduction sur deux générations. Le niveau acceptable d'exposition de l'opérateur (AOEL) de 0,008 mg/kg pc/j a été établi à partir d'une étude subchronique chez le chien. Depuis 2013, l'EPO est classé comme CMR (reprotoxique 1B, annexe II UE244, 2013). En prenant en compte une absorption cutanée de 50% que ce soit pour une solution concentrée ou diluée, les expositions prédictives pour les opérateurs portant une protection individuelle étaient de 39% (modèle allemand) et 700% (modèle anglais) de l'AOEL. Lorsqu'aucune protection n'est portée, les valeurs augmentent de 991% et jusqu'à 4918%. En ce qui concerne l'exposition orale, selon une notification de l'UE, l'exposition chronique représente moins de 17% de la DJA, la racine de betterave à sucre étant le principal facteur contribuant à l'exposition alimentaire. Pour le consommateur, les calculs d'évaluations nationales et internationales de l'apport journalier maximal théorique (AJMT) ont montré une exposition chronique inférieure à 20% (0,0016 mg/kg pc/j) de la DJA de l'EPO.

#### **5.1.4. L'Époxiconazole, un perturbateur endocrinien :**

Les triazoles ont été surtout développés pour inhiber un cytochrome P450 (CYP) fongique. Cependant, leurs actions ne sont pas spécifiques, en effet les triazoles peuvent aussi affecter d'autres CYPs chez des espèces non ciblées. De nombreux CYPs ont un rôle clé dans le métabolisme hormonal chez les humains et les animaux. La modification de leur activité peut donc provoquer une perturbation endocrinienne, un effet secondaire prévisible du groupement azole. En effet, il a été montré que certains azoles inhibaient l'expression et l'activité de l'aromatase chez les oiseaux, les amphibiens et les poissons [10]. C'est le cas du létrozole, un inhibiteur de l'aromatase (CYP19), développé comme agent thérapeutique et largement utilisé pour prévenir de façon efficace certains cas de cancers du sein [11]. Une exposition à l'EPO suite à un usage agricole et/ou une exposition par le biais d'aliments contaminés, peut donc augmenter la probabilité d'une perturbation endocrinienne chez l'Homme.

##### **a. EPO et activités hormonales *in vitro***

L'EPO a été étudié dans différents tests *in vitro* pour évaluer ses effets anti/œstrogéniques et anti/androgéniques, ses effets sur le récepteur aux hydrocarbures aromatiques (AhR), sur la fonction thyroïdienne et sur l'activité de l'aromatase ou sur d'autres enzymes impliquées dans la synthèse des stéroïdes [12]. L'EPO a été évalué pour ses effets œstrogéniques et anti-œstrogéniques en utilisant le test de prolifération des cellules MCF-7 (test E-Screen). L'EPO peut ainsi inhiber la prolifération de ces cellules lorsqu'elle est induite par 10 pM de 17β-œstradiol, ce qui suggère une activité anti-œstrogénique avec une LOEC (concentration la plus faible où l'effet est observé) de 25 μM. Cependant, un traitement avec l'EPO seul augmentait la prolifération des cellules MCF-7, ce qui indique une activité œstrogénique de ce composé, statistiquement significative à 6,25 μM. La prolifération cellulaire induite par l'EPO a été annulée par l'antagoniste spécifique, ICI 162,780, ce qui démontre que la prolifération est bien dépendante du récepteur aux œstrogènes. L'EPO a également été montré antagoniste sur le récepteur aux androgènes (AR) avec une LOEC de 0,8 μM dans un test d'activation transcriptionnelle [13]. De plus, l'EPO a inhibé la production de testostérone, d'œstradiol et la synthèse de progestérone a été stimulée dans les cellules H295R (test de synthèse des stéroïdes). L'EPO est principalement décrit comme un inhibiteur de l'aromatase avec une LOEC de 1 μM [14]. L'EPO activait également l'AhR avec une LOEC de 6,3 μM en utilisant le test du CALUX (test d'activation transcriptionnelle). En ce qui concerne le récepteur aux hormones thyroïdiennes, l'EPO n'a eu aucun effet dans le test T-Screen [12].

### **b. Etudes de reprotoxicité**

De nombreuses études ont examiné la reprotoxicité de l'EPO à fortes doses [15]. Chez le rat, un traitement par voie orale à 0,15 ou 50 mg/kg pc d'EPO à partir du 7<sup>ème</sup> jour de gestation (GD7) jusqu'au 16<sup>ème</sup> jour après la naissance (PND16) a montré une dystocie (parturition difficile) à la dose de 50 mg/kg pc. Chez les petits, la distance ano-génitale (AGD), un marqueur de masculinisation, a augmenté chez les femelles et a diminué chez les mâles [3, 16]. Chez les mâles, la rétention du mamelon a augmenté, et le poids de la prostate été réduit [3, 16]. Des doses plus élevées d'EPO induisaient des effets toxiques pour l'embryon et/ou le fœtus, une fertilité réduite et une augmentation de la durée de la gestation après une exposition à l'EPO chez les rongeurs [16]. Chez les femelles gestantes traitées par l'EPO, les taux plasmatiques d'œstradiol avaient diminué alors que ceux de testostérone et de progestérone avaient augmenté. L'aromatase (Cyp19) est une enzyme qui convertit la testostérone en 17 $\beta$ -œstradiol et l'androstènedione en œstrone. Son inhibition par l'EPO peut donc induire une augmentation des taux d'androgènes et une réduction des œstrogènes. Ce qui expliquerait les changements hormonaux observés après le traitement des femelles gestantes. Chez les fœtus, une diminution non significative des taux de testostérone a été observée [3, 16]. Les rats femelles traitées avec de l'EPO (45 et 180 mg/kg pc/j) du 6<sup>ème</sup> au 15<sup>ème</sup> jour après l'accouplement ont montré des signes de toxicité maternelle se manifestant par une altération de la consommation alimentaire et une réduction de la prise de poids. Le poids du placenta était augmenté de manière dose dépendante. De plus, une incidence élevée des malformations du palais chez les fœtus (90% des portées touchées dans le groupe à 180 mg / kg pc/j) a été observée. Les taux sanguins d'œstradiol, de progestérone et de prolactine ont été nettement réduits, tandis que celui de l'hormone lutéinisante (LH) a été augmenté. De plus, le nombre de gestations n'allant pas à terme était plus élevé avec une augmentation des pertes post-implantation et des résorptions fœtales totales [15]. Dans des études menées sur le rat, la mortalité fœtale semblait être nettement plus importante lorsque le traitement était poursuivi au-delà du 15<sup>ème</sup> jour de gestation, ce qui montre que l'EPO peut impacter des processus critiques pour la viabilité des fœtus, particulièrement en fin de la gestation [3, 16]. Comme indiqué précédemment, l'EPO entraîne des effets tératogènes (malformations du palais et cranio-faciales) à forte dose (180 mg / kg pc / jour) [17].

### **c. Toxicité hépatique**

Le foie est le principal organe cible de la toxicité de l'EPO. Les propriétés hépatotoxiques de l'EPO ont été démontrées par un certain nombre de tests de toxicité standard utilisés lors des processus d'homologation des substances actives utilisées pour la fabrication des pesticides [9, 18]. Chez les rongeurs traités à de fortes doses d'EPO, une augmentation du poids du foie et des modifications histopathologiques (hypertrophie hépatocellulaire) ont été observées. Dans les études de toxicité à long terme, l'EPO a induit également le développement de tumeurs hépatiques [19]. Au niveau moléculaire, l'EPO a induit l'expression d'un certain nombre de gènes cibles du récepteur constitutif des androstanes (CAR). Il agit aussi *via* d'autres récepteurs nucléaires (tel que le Pregnane X Receptor (PXR)), modulant ainsi des voies de signalisation moléculaires, [20, 21].

### **5.2 . Perturbation endocrinienne et métabolisme énergétique**

Le terme «Obesogène» désigne des agents chimiques qui dérèglent le métabolisme des lipides favorisant leur accumulation ainsi que l'adipogenèse. Parmi les contaminants identifiés, tous sont déjà connus pour être également des perturbateurs endocriniens [22]. Récemment, de nombreuses publications scientifiques ont montré l'implication potentielle ou avérée de l'environnement dans l'épidémie croissante d'obésité, particulièrement dans le cas d'exposition périnatale à faibles doses [23-25]. Grün *et al.* (2006) ont souligné les effets de ces composés sur le développement et les régulations homéostatiques en lien avec l'adipogénèse et le métabolisme énergétique. Des travaux sur l'implication des œstrogènes

dans la régulation de l'adipogénèse ont montré que soit l'absence de signalisation œstrogénique (souris knock-out (KO) pour le récepteur aux œstrogènes  $E\alpha$  ou pour l'aromatase), soit la potentialisation du signal œstrogénique par une substance œstrogénomimétique connue (exposition au diéthylstilbestrol (DES) par exemple) favorisaient le développement de l'obésité [25, 26]. D'autres modèles de rongeurs KO pour différents éléments impliqués dans les voies de biosynthèse des hormones (récepteur à la FSH, récepteur aux androgènes ...) confirment que ces hormones jouent un rôle dans la régulation de l'hypertrophie et de l'hyperplasie adipocytaire. Ces données suggèrent qu'une dérégulation impliquant les récepteurs aux hormones stéroïdiennes peut induire des effets pro-adipogéniques. La liste des perturbateurs endocriniens à étudier comme potentiels obésogènes continue de croître et comprend le diéthylstilbestrol (DES) [25], le bisphénol A [27, 28], le bisphénol S [29], le tributylétain (TBT) [30], le nonylphénol [31] la génistéine [32], les phtalates [33] et les composés perfluorés (PFC) [34]. L'exposition à des produits chimiques obésogènes peut ainsi modifier l'expression des récepteurs aux hormones stéroïdiennes, agir sur les voies de signalisations en relations avec ces récepteurs et par conséquent modifier les taux sériques de certaines hormones impliquées dans la régulation du métabolisme énergétique. En résumé, les PE agissent sur le métabolisme énergétique soit en impactant la sécrétion des hormones impliquées dans la régulation de la prise alimentaire (leptine, ghréline), soit en modifiant l'expression de différents récepteurs nucléaires (aux hormones stéroïdiennes, à l'acide rétinoïque, aux proliférateurs de peroxyosomes, aux glucocorticoïdes), soit en inhibant l'activité des aromatasés, enzymes de la famille des cytochromes P450 (CYP19 et CYP3A1) [35, 36] [23].

### **5.3 Effets perturbateurs endocriniens et transgénérationnels**

L'hypothèse du rôle des obésogènes d'origine environnementale suggère qu'une exposition prénatale ou prématurée à certaines substances comme des PE à faibles doses peut prédisposer les personnes à une augmentation de la masse grasse et un excès de poids. À l'heure actuelle, l'exposition à un certain nombre de facteurs environnementaux durant la gestation peut provoquer des phénotypes anormaux en génération F1 chez différentes espèces. Du fait que la génération F1 soit exposée aux facteurs environnementaux, l'effet observé en F1 est appelé phénotype générationnel. Les effets transgénérationnels dus à ces facteurs environnementaux entraînent des effets sur la génération F3 (qui n'est plus directement exposée à la molécule) [37]. La capacité d'un agent externe à induire un effet transgénérationnel nécessite une modification de la séquence de l'ADN ou un phénomène épigénétique (méthylation d'ADN ...) venant de la lignée germinale [38]. La programmation épigénétique ayant lieu au cours du développement représente une fenêtre d'exposition sensible du fœtus pendant laquelle une exposition insuffisante à des nutriments, un stress lié au comportement ou à des toxiques, peut conduire à des réactions physiologiques inadaptées plus tard dans la vie (hypothèse de l'origine développementale de certaines pathologies) [39, 40]. Plusieurs études montrent qu'une exposition à des produits chimiques ou non (bisphénol A, génistéine...) pendant les périodes critiques de différenciation, à faibles doses représentatives de l'environnement, modifie les programmes de développement entraînant une obésité à l'âge adulte [40-43]. Il a été suggéré que l'exposition aux obésogènes peut modifier l'épigénome conduisant à une augmentation de l'adipogénèse [44]. À ce jour, la majorité des effets sont observés chez la mère gestante (F0) et chez les individus de la génération F1 comme c'est le cas avec les PE [45]. Des études avec ces PE ont de plus démontré des effets transgénérationnels [46]. Par exemple, le diéthylstilbestrol a entraîné des effets reprotoxiques chez l'Homme (jusqu'à la génération F2) lors de son utilisation comme médicament chez la femme enceinte dans les années 1950-60 [47]. Concernant les pesticides perturbateurs endocriniens, l'exposition de souris gestantes à la vinclozoline et au méthoxychlore a provoqué un défaut dans la spermatogénèse et une diminution de la fertilité chez la génération F1 ainsi que chez les générations suivantes étudiées (F1 à F4) [46, 48]. D'un point de vue épigénétique, une modification de la méthylation de l'ADN a été observée. Bien que la plupart des gènes soient déméthylés au cours du développement embryonnaire précoce, un sous-ensemble de gènes appelés

« gènes imprimés » maintient son profil de méthylation. Contrairement aux cellules somatiques, les cellules germinales primordiales subissent une déméthylation pendant la migration et la colonisation précoce de la gonade embryonnaire. Ceci est suivi d'une reméthylation commençant au moment de la détermination du sexe [49]. L'exposition de la femelle gestante à cette période du développement semble ainsi pouvoir modifier la reméthylation de la lignée germinale et reprogrammer le méthylome de l'ADN [46, 50].

#### **5.4 . Objectifs**

La recherche sur la perturbation endocrinienne consiste à identifier les mécanismes d'action et de toxicité qui sont complexes et qui affectent simultanément plusieurs voies de régulation au niveau cellulaire, tissulaire et physiologique.

L'époxiconazole (EPO) a été choisi car il s'agit d'un fongicide de type azole largement utilisé en France pour protéger les cultures (céréales, betterave à sucre ...). L'EPO est un CMR classé substance R1B (annexe II UE244, 2013). Il entre dans la chaîne alimentaire et est reconnu PE. En fait, l'EPO est un inhibiteur de certains cytochromes P450 tel que l'aromatase impliquée dans la synthèse des œstrogènes et le lanostérol 14  $\alpha$ -déméthylase (ou CYP51A1) responsable d'une étape essentielle dans la biosynthèse des stérols et des stéroïdes [51]. L'EPO est également décrit comme un PE interférant avec les hormones sexuelles puisqu'il présente des propriétés anti-œstrogéniques et anti-androgéniques. Il est maintenant bien décrit que les hormones sexuelles sont fortement impliquées dans le contrôle du métabolisme énergétique [52, 53]. De même, plusieurs PEs sont potentiellement des obésogènes (bisphénol S, bisphénol A, diéthylstilbestrol, DDT, dithiocarbamates, tributylétain, atrazine ...) [24, 25, 27]. À ce jour, aucune étude n'est disponible sur les propriétés obésogènes de l'EPO. Cependant, des doses élevées d'EPO semblent être hépatotoxiques et modifient la prise de poids corporel chez les rongeurs [18]. En outre, il n'existe aucune étude concernant l'effet biologique de l'EPO à faibles doses et / ou à des doses environnementales. Une autre préoccupation importante liée aux PEs concerne leurs effets générationnels ou transgénérationnels. Au niveau mécanistique, le facteur principal de l'effet transgénérationnel semble être une modification de la méthylation de l'ADN.

Ce projet prévoit de tester l'hypothèse selon laquelle l'exposition périnatale à une dose environnementale d'EPO induit un mécanisme épigénétique et des effets transgénérationnels sur le métabolisme énergétique en association avec des perturbations au niveau des organes sexuels chez des souris C56Bl/6J. Les éléments apportés par cette étude répondent à l'axe 3 du plan Ecophyto II. Nous proposons de répondre à trois questions i) L'EPO est-il un PE obésogène? ii) Le changement dans le métabolisme énergétique induit par l'EPO est-il corrélé au dysfonctionnement de l'intestin grêle, du foie et / ou du tissu adipeux? iii) L'effet obésogène de l'EPO est-il transgénérationnel? iiiii) L'effet transgénérationnel de l'EPO est-il lié à un phénomène héréditaire transmis par les gamètes? iiiiii) L'effet transgénérationnel de l'EPO est-il lié à des modifications de la fertilité masculine?

Une étude multigénérationnelle sur le modèle de souris C56Bl/6J classiquement utilisé pour étudier le métabolisme énergétique et ses pathologies associées sera menée. Pour évaluer le caractère obésogène de l'EPO, les souris seront nourries avec un régime hyperlipidique (HFD, 60% kcal à partir provenant de lipides saturés) puisque la majorité des obésogènes semblent potentialiser l'obésité induite par le HFD [24, 27]. Pour garantir la validité de cette étude, nous utiliserons un PE obésogène comme contrôle positif, le bisphénol S (BPS) [29]. Compte tenu de la capacité de notre animalerie, nous ne pourrons effectuer que trois groupes (contrôle négatif, EPO et contrôle positif) qui représenteront 120 souris par génération. Les paramètres physiologiques classiques associés à l'effet obésogène seront étudiés (poids corporel, masse grasse, paramètres plasmatiques ...). Afin de préciser les mécanismes sous-jacents, nous analyserons le transcriptome de trois organes essentiels (foie, intestin grêle et tissus adipeux) impliqués dans le métabolisme énergétique. Le deuxième objectif principal concerne la capacité de l'EPO à induire des modifications épigénétiques (méthylation de l'ADN) et des effets transgénérationnels. Dans le cadre du projet, seul l'ADN du foie sera analysé par RRBS (Reduced Representation Bisulphite Analysis) pour étudier le méthylome, le foie étant la cible principale des altérations



épigénétiques [54]. Après ce screening et l'analyse bioinformatique, la méthylation de l'ADN de promoteurs de gènes spécifiques pourra être évaluée sur un nombre limité de gènes cibles par pyroséquençage. La transmission d'une charge de micro ARN, un facteur hypothétique de l'hérédité transgénérationnelle, sera étudiée au niveau des spermatozoïdes masculins à la génération F3. Parallèlement, les marqueurs de fertilité seront évalués pour chaque génération. Nous évaluerons également le transcriptome des testicules et des ovaires.

### **5.5 . L'originalité et la nature innovante / pionnière du projet**

L'originalité de ce projet consiste à effectuer une exposition périnatale à faible dose d'époxiconazole et à étudier ses effets néfastes sur trois problématiques émergentes de la perturbation endocrinienne. En effet, à ce jour, aucune donnée n'est disponible concernant les effets obésogènes, transgénérationnels et sur la fertilité masculine de l'EPO à faible dose. La recherche sur la perturbation endocrinienne consiste à générer des connaissances sur les mécanismes de toxicité complexes affectant simultanément plusieurs voies de régulation aussi bien au niveau moléculaire, tissulaire et physiologique. Ce travail sera collaboratif, impliquant une expertise distincte mais complémentaire en perturbation endocrinienne permettant d'étudier l'obésité, le métabolisme lipidique, la fertilité, et la physiologie de l'intestin, des tissus adipeux, hépatiques et des organes sexuels.

### **5.6 . Intérêt en vue du plan Écophyto**

L'autorisation de l'époxiconazole a été suspendue puis autorisée à nouveau. Comme il est reprotoxique (classé R1B), il est officiellement enregistré dans la liste des produits à remplacer et est autorisé jusqu'en 2019. Dans un récent rapport, la Direction Générale du Travail soutient la nécessité d'anticiper cette interdiction. Notre étude permettra de fournir des éléments sur l'activité de perturbation endocrinienne de l'EPO, notamment dans trois problématiques importantes et émergentes : les maladies liées au métabolisme énergétique, les effets transgénérationnels et les problèmes de fertilité masculine. Cette étude entre dans l'axe 3 du plan l'Ecophyto II qui concerne l'évaluation des effets indésirables sur la santé de l'exposition aux pesticides.

### **5.7 . Structure et méthodologie du projet**

#### **L'époxiconazole est-il un composé obésogène? Partenaire 1**

L'idée est d'exposer les souris C57Bl/6J gestantes à l'EPO dès le premier jour de gestation (figure 1). Le traitement se poursuivra pendant la lactation et chez les petits jusqu'au sevrage. Les souris gestantes seront logées individuellement dans des cages standard en polypropylène (sans BPA/BPS) et auront un accès à la nourriture et à l'eau *ad libitum*. Nous utiliserons des biberons et des cages en polypropylène pour éviter la contamination par les bisphénols. En effet, les cages de souris sont principalement en polycarbonate ou en polysulfone qui sont des sources potentielles de contamination par le BPA et le BPS. Le régime alimentaire utilisé est certifié sans activité œstrogénique (Mucedola, Italie). Les souris seront divisées en trois groupes de traitement (témoin négatif, contrôle positif et groupe exposé à l'EPO). En bref, les femelles gestantes seront exposées à l'EPO ou au contrôle positif (BPS) à une dose pertinente de 1,5 µg/kg pc/j (*via* l'eau de boisson). Cette concentration est basée sur apport journalier maximal théorique (AJMT, à l'exclusion de l'eau et des produits alimentaires des animaux), ce qui représente 13% de la dose journalière admissible d'EPO (DJA = 8 µg/kg pc/j) et une exposition chronique estimée inférieure à 17% de la DJA (EFSA 2008). En ce qui concerne le BPS, dans une étude précédente (soutenue par le PNRPE, projet MELBA), nous avons montré que cette dose était la plus efficace pour induire des effets obésogènes dans ce modèle de souris [29]. Le groupe contrôle sera exposé à de l'eau contenant 0,1% d'éthanol (diluant de l'EPO et BPS). Les progénitures seront divisées en deux groupes, un pour chaque sexe (masculin et féminin) au sevrage. Quatre semaines après le sevrage, les souris seront soumises soit à un régime standard (SD), soit à un régime hyperlipidique (HFD, 60% des apports caloriques

sous forme de lipides issus de l'huile de palme) pendant 15 semaines. Le HFD est souvent utilisé pour exacerber ou induire l'effet obésogène d'un agent chimique. En effet, les obésogènes agissent souvent comme des potentialisateurs d'un déséquilibre énergétique préexistant et non comme des inducteurs de l'obésité [27].

Le BPS a été sélectionné comme un témoin positif car il présente un effet obésogène à la même dose que l'apport journalier maximal théorique de l'EPO (1,5 µg/kg pc/j). En effet, nous avons précédemment démontré qu'une exposition chronique périnatale au BPS (1,5 µg/kg pc/j) induisait une augmentation du poids corporel de 15% chez les souris mâles C56Bl/6J en relation avec la perturbation du métabolisme énergétique et l'augmentation de la masse grasse [29]. Le BPS est également un perturbateur endocrinien qui présente des propriétés œstrogéniques et anti-androgéniques. Dans une étude préliminaire sur le foie de souris, nous avons également observé que le BPS induisait une hypométhylation globale de l'ADN potentiellement liée à ses effets sur le métabolisme hépatique (données non publiées). Ce résultat est conforme aux données antérieures observées avec le BPA [42, 43], ce qui pourrait expliquer les effets transgénérationnels.

Les consommations alimentaires et d'eau seront mesurées chaque semaine. Le poids corporel des progénitures (mâles et femelles) sera vérifié chaque semaine. Avant le sacrifice, les masses grasse et maigre de chaque souris seront déterminées individuellement à l'aide d'un appareil EchoMRI 500TTM (EchoMRI, Houston, USA). Les fèces seront récoltées à l'aide de cages physiologiques afin de déterminer la perte fécale en lipides. Toutes ces techniques sont utilisées en routine dans la plateforme "FOODin" de l'équipe (Nutrition Physiology Laboratory, INSERM UMR1231, Dijon). Un test de tolérance au glucose sera également effectué pour chaque souris afin d'étudier le niveau de résistance à l'insuline.

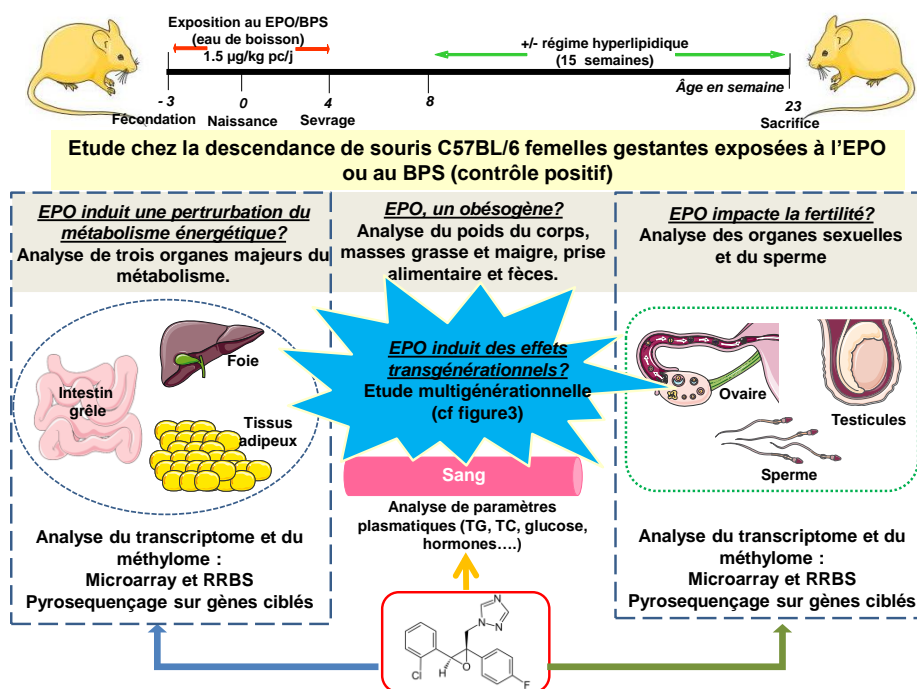


Figure 1: Hypothèses et expériences proposées

Après le sacrifice, les niveaux de plusieurs paramètres plasmatiques seront analysés: glucose, triglycérides (TG), cholestérol total (TC), acide gras non estérifié, leptine, insuline et adiponectine. Les niveaux d'hormones stéroïdes telles que la testostérone, l'oestradiol et les hormones thyroïdiennes seront également mesurés. Le nombre de souris pour chaque groupe est indiqué dans le tableau 1.

Table 1: Effectifs des souris du protocole

Groupe	Souris gestantes	Régime standard		Régime hyperlipidique		Croisement
		Mâles	Femelles	Mâles	Femelle	Mâles/Femelles
Contrôle	15	12	12	12	12	15 chacun
Positive	15	12	12	12	12	15 chacun
EPO	15	12	12	12	12	15 chacun

**La prise de poids corporel induit par l'EPO est-elle liée à des dysfonctionnements de l'intestin grêle, du foie et/ou des tissus adipeux ? Partenaire 2.**

Le projet général consiste à tester l'hypothèse qu'une exposition périnatale à l'EPO pourrait promouvoir l'obésité à l'âge adulte. Dans ce contexte, nous examinerons les perturbations métaboliques possibles dans les principaux organes impliqués dans le métabolisme énergétique.

L'intestin grêle (jéjunum), le foie et le tissu adipeux viscéral seront analysés en mettant l'accent sur la stéatose, la néoglucogenèse et le métabolisme lipidique à l'aide de gènes marqueurs. Le protocole vise à analyser des générations consécutives et dont seule la première aura été exposée. Les progénitures seront accouplées selon un mode frère x sœur, ce qui signifie que pour la première génération les deux sexes auront été exposés dans l'utérus. Cette approche est préférée à l'utilisation d'individu naïf de chaque sexe acheté spécialement pour les reproductions. En effet, ce protocole est plus proche de la situation rencontrée chez les humains, où généralement les deux membres du couple ont été exposés de manière similaire. Une limitation de ce protocole est qu'il ne permettra pas de suivre des effets sexes spécifiques. Cependant, en analysant les variations des taux ARNm, nous pourrions étudier des « imprinted genes » qui sont exprimés à partir d'un seul allèle. Nous avons montré dans plusieurs travaux antérieurs que les gènes imprimés sont les premiers à subir des modifications induites par l'environnement [55-57]. Ils sont donc d'excellents indicateurs des impacts environnementaux sur la physiologie et ceci d'une manière sexe spécifique. Nous proposons d'utiliser une analyse transcriptomique non ciblée. En bref, lors du sacrifice, après avoir été pesés, les organes concernés (intestin grêle, foie, testicules, ovaires, tissus adipeux) seront divisés en deux fragments, une partie recueillie dans du TriZol™, puis stockée pour l'extraction de l'ARN et une partie congelée de manière à extraire des protéines ou de l'ADN (afin de valider au niveau protéique, les variations d'expression observées au niveau des gènes ou d'étudier les effets potentiels sur la méthylation de l'ADN, voir ci-dessous). En outre, les spermatozoïdes de l'épididyme seront collectés et congelés (-80 °C). Dans le cadre du projet, pour pouvoir faire face au nombre d'échantillons et au coût, l'accent sera mis uniquement sur le foie, bien que les autres organes soient systématiquement collectés. Le choix du foie repose sur la littérature [54]. L'analyse des autres organes fera l'objet d'autres demandes de financement. Techniquement, l'approche sera basée sur une analyse par microarrays de dernière génération (banques d'exon *a priori* d'Affymetrix™), mais d'autres solutions techniques basées sur des oligonucléotides longs (comme les plaques Illumina™) sont également envisagées. Le choix des microarrays plutôt que du RNA-seq repose sur le fait que les données sont plus faciles à interpréter et que le coût est moindre que pour le RNA-seq. Néanmoins, le partenaire 2 est également expérimenté en RNA-seq, certains échantillons devraient être testés en utilisant cette approche [58]. Le protocole standard d'analyse sera basé sur l'analyse de triplets de 3 pools d'ARN (3 hybridations par condition), afin de diminuer les variations interindividuelles potentielles et de se concentrer sur l'effet du traitement. Le protocole est détaillé sur la Figure 2. En utilisant ce schéma, chaque génération demande 36 hybridations. L'analyse des données sera réalisée à l'aide d'approches de pointe, impliquant la génération de réseaux de gènes, l'analyse bioinformatique des promoteurs et les cibles d'ARNm et le regroupement fonctionnel des

gènes contenant des modifications d'expression. De façon non exhaustive, les outils de bioinformatique que nous utilisons actuellement sont Genomatix, Cytoscape, String, GSEA, miR-Walk, Ingenuity, DAVID, et nous les maîtrisons tous. Ces outils extrairont des informations biologiques pertinentes et détermineront les gènes « chef d'orchestre » qui seront étudiés individuellement, notamment au niveau protéique (analyse par Western-blot), lorsque les anticorps sont disponibles.

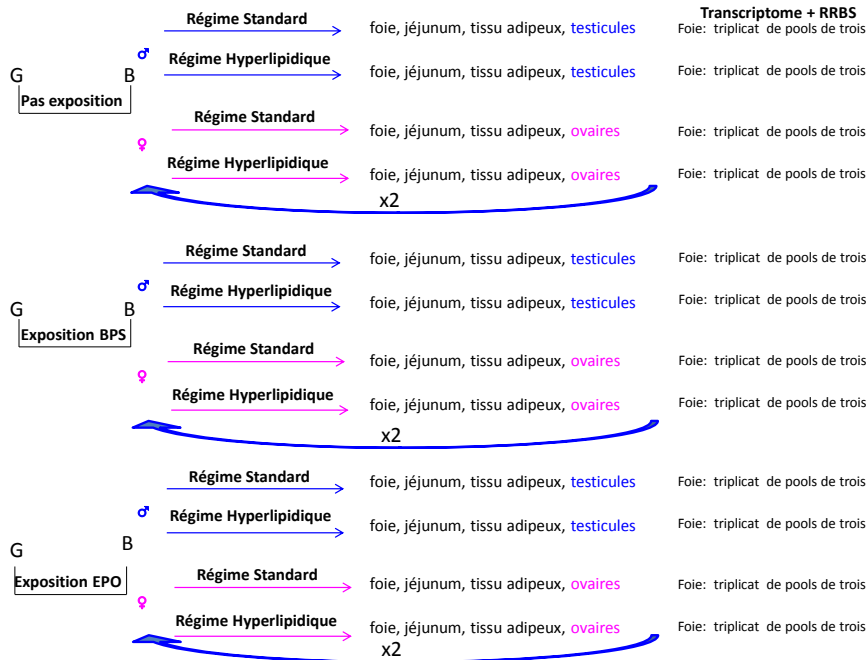


Figure 2: Protocole pour les tests de microarray

### L'effet obésogène de l'EPO est-il transgénérationnel? Partenaire 1.

Pour répondre à cette question, l'expérience *in vivo* sera effectuée jusqu'à la troisième génération (figure 3). Les mâles et les femelles issus des souris gestantes traitées par l'EPO (F0) seront croisés à l'âge de 10-12 semaines. Le même protocole sera reproduit pour obtenir la génération F2 et F3. Seule la génération F0 sera exposée à l'EPO, contrairement aux souris F1, F2 et F3. Le reste du protocole et les paramètres évalués sont les mêmes que ceux décrits précédemment.

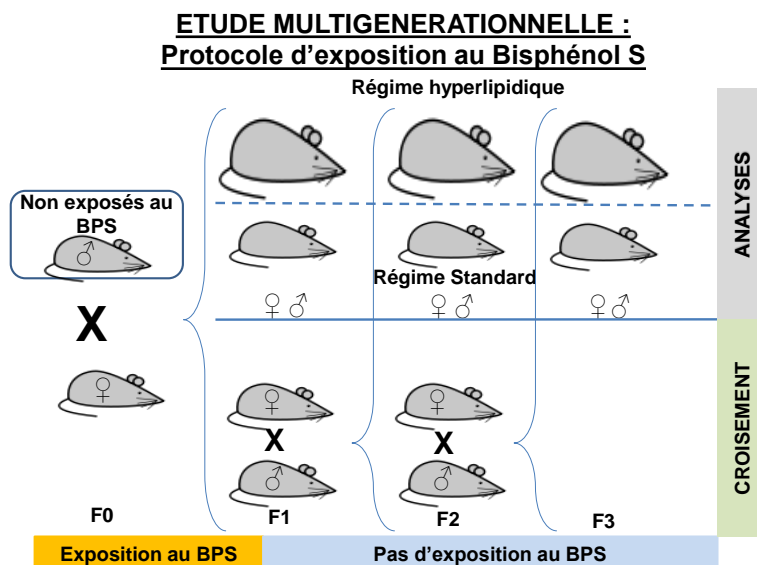


Figure 3: Protocole de l'étude multigénérationnelle

## **L'EPO induit-il des modifications épigénétiques conduisant à un effet transgénérationnel? Partenaire 2.**

Dans le cadre du projet, l'ADN du foie sera analysé par RRBS (Reduced Representation Bisulphite Analysis) pour étudier le méthylome. Le RRBS est basé sur le séquençage de l'ADN hydrolysé par des enzymes de restriction sensibles à la méthylation (comme HpaII). Les produits sont ensuite traités par bisulfite, séquencés et alignés sur un génome de référence. Compte tenu de la réduction du nombre de séquences analysées, cette technique réduit le coût à environ 1000 € par échantillon. Le budget demandé dans le cadre de ce projet devrait permettre d'analyser 12 échantillons. Le choix sera guidé par l'analyse du transcriptome qui sera effectuée au préalable. Après ce screening et l'analyse bioinformatique, la méthylation de l'ADN de promoteurs de gènes spécifiques pourrait être évaluée sur un nombre limité de cibles par pyroséquençage.

## **L'effet transgénérationnel de l'EPO est-il lié à une hérédité transmise par les gamètes? Partenaire 2.**

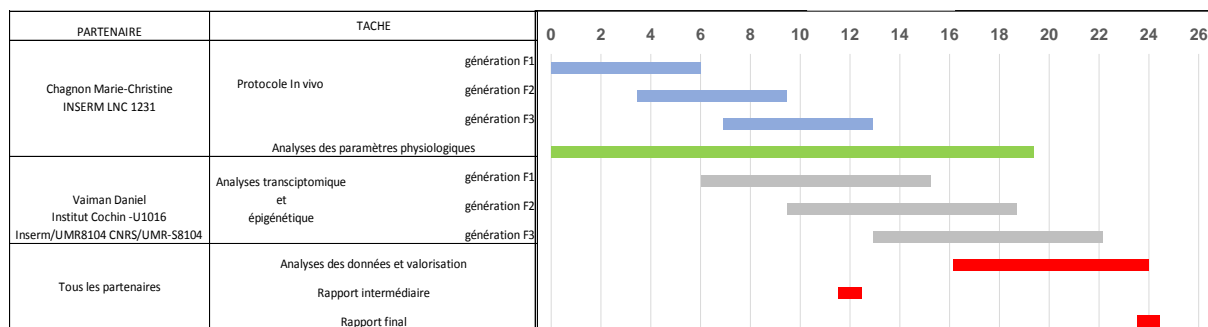
Pour répondre à cette question, nous nous concentrerons uniquement sur la troisième génération qui n'est pas directement ou indirectement exposée à l'EPO. En effet, l'effet transgénérationnel ne se produit que lors de la troisième génération où l'effet est censé être une conséquence des altérations transmises par les gamètes. Un facteur hypothétique pour l'hérédité transgénérationnelle est la transmission d'une charge de micro ARN (miR). Par conséquent, nous proposons d'examiner, dans une première approche, le miRNome d'un nombre limité d'échantillons de tissus masculins (en particulier des spermatozoïdes). Néanmoins, il y aura toujours la possibilité d'examiner le tissu ovarien, notamment si l'analyse du transcriptome va dans cette direction. *A priori*, les spermatozoïdes étant facilement accessibles à partir des épидидymes de souris mâles, il sera privilégié d'analyser les modifications possibles sur ces gamètes. Par conséquent, les microarrays adaptés à la souris seront utilisés pour analyser à la fois les niveaux d'expression en ARNm et en miR. Les observations des différences d'expression permettraient de mieux comprendre certaines caractéristiques d'une possible hérédité transgénérationnelle.

## **L'effet transgénérationnel de l'EPO est-il lié à la fertilité masculine? Partenaire 2.**

Des études antérieures sur les rats mâles Wistar exposés par gavage, de la gestation à l'âge adulte, à des niveaux d'exposition environnementale de perturbateurs endocriniens ont montré un impact délétère sur l'axe reproducteur masculin, ainsi que des modifications significatives de l'expression de nombreux gènes testiculaires, en première mais aussi en deuxième génération [59, 60]. En outre, les changements métaboliques liés à l'obésité peuvent également affecter la fonction reproductive. L'augmentation de l'adiposité peut altérer le milieu testiculaire de manière à modifier la production du sperme.

Dans ce projet, les marqueurs de fertilité seront évalués pour chaque génération. Pour chaque groupe, 15 mâles (10-12 semaines d'âge) seront sélectionnés pour s'accoupler avec des femelles exposées. Chaque mâle sera mis dans une cage avec une femelle pendant 3 jours. Les femelles seront inspectées quotidiennement. Lorsqu'un bouchon vaginal sera observé, les femelles seront séparées des mâles jusqu'à la parturition. Nous utiliserons les marqueurs de fertilité suivants: indice d'accouplement (nombre de femelles accouplées ÷ nombre de femelles cohabitées avec les mâles × 100), indice de fertilité (nombre de femelles gestantes ÷ nombre de femelles accouplées × 100), taille de la litière, poids moyen par nouveau-né, rapport des sexes à la naissance et pourcentage de perte post-implantation (nombre de cicatrices embryonnaires ÷ nombre de boutons embryonnaires et cicatrices × 100) [59]. Les paramètres de reproduction seront évalués. À savoir, pour chaque génération, la distance anogénitale (AGD) sera évaluée au 25<sup>ème</sup> jour après la naissance (F1, F2, F3). Pour chaque animal, les testicules, les épидидymes, les vésicules séminales et la prostate ventrale seront pesés et les poids relatifs (poids de l'organe en grammes par kilogramme de poids corporel) seront calculés. Pour chaque groupe de souris mâles, de différentes générations, le nombre de spermatozoïdes testiculaires sera évalué à partir des testicules, comme l'ont décrit Jégou *et al.* [61].

## 5.8 . Planification des expériences



## 5.9 . Principales difficultés attendues et comment les résoudre (solution de repli)

Aucune difficulté apparente n'a été détectée. Nous nous attendons à obtenir des résultats pertinents car nous étudierons plusieurs organes et tissus. Même si nous n'observons aucun effet néfaste dans nos conditions expérimentales, cela confirmera la sécurité sanitaire d'un faible niveau d'exposition à l'EPO en ce qui concerne les paramètres toxicologiques et les mécanismes étudiés, ce qui réduit l'incertitude.

## 5.10 Règles de contrôle et de suivi du projet: partenaires, compétences et ressources humaines

Des réunions régulières, des échanges de données et de résultats seront programmés (au moins tous les trois mois). L'ingénieur recruté devra faire le lien entre les partenaires en participant à toutes les expériences. Il est prévu d'aller au laboratoire du partenaire 2 pour obtenir une expertise spécifique telle que l'échantillonnage du sperme et son analyse.

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

Les résultats obtenus devraient fournir des éléments concernant le caractère obésogène et les effets reprotoxiques de l'époxiconazole, en particulier à faible dose et suite à une exposition périnatale, en relation avec ses activités de perturbation endocrinienne. L'effet transgénérationnel de cette molécule sur les paramètres physiologiques analysés sera également clarifié. Ces nouveaux effets néfastes de l'EPO devraient apporter des éléments au gouvernement français afin d'exiger le retrait de ce fongicide au niveau de l'Union Européenne.

## 5.12 Livrables attendus et optimisation des résultats au profit d'Écophyto

Les livrables attendus comprennent : les rapports intermédiaires et finaux en libre accès; des communications dans plusieurs congrès scientifiques nationaux et internationaux (Société Française de Toxicologie, Eurotox, Programme de Recherche Nationale sur les Perturbateurs Endocriniens, Société Française de Nutrition ...); ainsi que des publications dans des revues scientifiques internationales.

## 5.13 Références

1. Baillie-Hamilton PF: Chemical toxins: a hypothesis to explain the global obesity epidemic. *J Altern Complement Med* 2002, 8(2):185-192.

2. Kojima H *et al.*: Screening for estrogen and androgen receptor activities in 200 pesticides by in vitro reporter gene assays using Chinese hamster ovary cells. *Environ Health Perspect* 2004, 112(5):524-531.
3. Taxvig C *et al.*: Endocrine-disrupting activities in vivo of the fungicides tebuconazole and epoxiconazole. *Toxicol Sci* 2007, 100(2):464-473.
4. Vinggaard AM *et al.*: Antiandrogenic effects in vitro and in vivo of the fungicide prochloraz. *Toxicol Sci* 2002, 69(2):344-353.
5. Vinggaard AM *et al.*: Antiandrogenic effects in short-term in vivo studies of the fungicide fenarimol. *Toxicology* 2005, 207(1):21-34.
6. Trasande L *et al.*: Estimating burden and disease costs of exposure to endocrine-disrupting chemicals in the European union. *J Clin Endocrinol Metab* 2015, 100(4):1245-1255.
7. Paveley ND *et al.*: Steps in predicting the relationship of yield on fungicide dose. *Phytopathology* 2001, 91(7):708-716.
8. Edwards SG *et al.*: Reduction of Fusarium head blight and deoxynivalenol in wheat with early fungicide applications of prothioconazole. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 2010, 27(5):629-635.
9. EFSA: Conclusion on the peer review of epoxiconazole *EFSA Scientific Report* 2008, 138:1-80.
10. Villeneuve DL *et al.*: Relationship between brain and ovary aromatase activity and isoform-specific aromatase mRNA expression in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Aquat Toxicol* 2006, 76(3-4):353-368.
11. Miller WR *et al.*: Anti-tumor effects of letrozole. *Cancer Invest* 2002, 20 Suppl 2:15-21.
12. Kjaerstad MB *et al.*: Endocrine disrupting effects in vitro of conazole antifungals used as pesticides and pharmaceuticals. *Reprod Toxicol* 2010, 30(4):573-582.
13. Vinggaard AM *et al.*: Rapid and sensitive reporter gene assays for detection of antiandrogenic and estrogenic effects of environmental chemicals. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999, 155(2):150-160.
14. Wuttke W *et al.*: LH pulses and the corpus luteum: the luteal phase deficiency LPD). *Vitam Horm* 2001, 63:131-158.
15. DAR.: Draft Assessment Report (DAR), public version. In: R. M. S. GERMANY, editor. Annex B, B.1-B7. 2006.
16. Taxvig C *et al.*: Endocrine-disrupting properties in vivo of widely used azole fungicides. *Int J Androl* 2008, 31(2):170-177.
17. Schneider S *et al.*: Species differences in developmental toxicity of epoxiconazole and its relevance to humans. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 2013, 98(3):230-246.
18. Goetz AK *et al.*: Mode of action for reproductive and hepatic toxicity inferred from a genomic study of triazole antifungals. *Toxicol Sci* 2009, 110(2):449-462.
19. Hester S *et al.*: The hepatocarcinogenic conazoles: cyproconazole, epoxiconazole, and propiconazole induce a common set of toxicological and transcriptional responses. *Toxicol Sci* 2012, 127(1):54-65.
20. Goetz AK *et al.*: Gene expression profiling in the liver of CD-1 mice to characterize the hepatotoxicity of triazole fungicides. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006, 215(3):274-284.
21. Nesnow S *et al.*: Discrimination of tumorigenic triazole conazoles from phenobarbital by transcriptional analyses of mouse liver gene expression. *Toxicol Sci* 2009, 110(1):68-83.
22. Grun F *et al.*: Environmental obesogens: organotins and endocrine disruption via nuclear receptor signaling. *Endocrinology* 2006, 147(6 Suppl):S50-55.
23. Grun F *et al.*: Endocrine disruptors as obesogens. *Mol Cell Endocrinol* 2009, 304(1-2):19-29.
24. Heindel JJ *et al.*: Endocrine disruptors and obesity. *Nat Rev Endocrinol* 2015, 11(11):653-661.
25. Newbold RR *et al.*: Environmental estrogens and obesity. *Mol Cell Endocrinol* 2009, 304(1-2):84-89.

26. Cooke PS *et al.*: Role of estrogens in adipocyte development and function. *Exp Biol Med (Maywood)* 2004, 229(11):1127-1135.
27. Le Corre L *et al.*: BPA, an energy balance disruptor. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2015, 55(6):769-777.
28. Miyawaki J *et al.*: Perinatal and postnatal exposure to bisphenol a increases adipose tissue mass and serum cholesterol level in mice. *J Atheroscler Thromb* 2007, 14(5):245-252.
29. Ivry Del Moral L *et al.*: Obesogen effects after perinatal exposure of 4,4'-sulfonyldiphenol (Bisphenol S) in C57BL/6 mice. *Toxicology* 2016, 357-358:11-20.
30. Inadera H *et al.*: Environmental chemical tributyltin augments adipocyte differentiation. *Toxicol Lett* 2005, 159(3):226-234.
31. Masuno H *et al.*: Effect of 4-nonylphenol on cell proliferation and adipocyte formation in cultures of fully differentiated 3T3-L1 cells. *Toxicol Sci* 2003, 75(2):314-320.
32. Dang ZC *et al.*: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) as a molecular target for the soy phytoestrogen genistein. *J Biol Chem* 2003, 278(2):962-967.
33. Hatch EE *et al.*: Association of urinary phthalate metabolite concentrations with body mass index and waist circumference: a cross-sectional study of NHANES data, 1999-2002. *Environ Health* 2008, 7:27.
34. Sakr CJ *et al.*: Cross-sectional study of lipids and liver enzymes related to a serum biomarker of exposure (ammonium perfluorooctanoate or APFO) as part of a general health survey in a cohort of occupationally exposed workers. *J Occup Environ Med* 2007, 49(10):1086-1096.
35. Bouret SG *et al.*: Minireview: Leptin and development of hypothalamic feeding circuits. *Endocrinology* 2004, 145(6):2621-2626.
36. Lebrethon MC *et al.*: Effects of in vivo and in vitro administration of ghrelin, leptin and neuropeptide mediators on pulsatile gonadotrophin-releasing hormone secretion from male rat hypothalamus before and after puberty. *J Neuroendocrinol* 2007, 19(3):181-188.
37. Anway MD *et al.*: Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors. *Endocrinology* 2006, 147(6 Suppl):S43-49.
38. Barber R *et al.*: Elevated mutation rates in the germ line of first- and second-generation offspring of irradiated male mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, 99(10):6877-6882.
39. Morgan HD *et al.*: Epigenetic reprogramming in mammals. *Hum Mol Genet* 2005, 14 Spec No 1:R47-58.
40. Tarry-Adkins JL *et al.*: Nutrition in early life and age-associated diseases. *Ageing Res Rev* 2016.
41. Strakovsky RS *et al.*: Developmental bisphenol A (BPA) exposure leads to sex-specific modification of hepatic gene expression and epigenome at birth that may exacerbate high-fat diet-induced hepatic steatosis. *Toxicol Appl Pharmacol* 2015, 284(2):101-112.
42. Desai M *et al.*: Epigenomics, gestational programming and risk of metabolic syndrome. *Int J Obes (Lond)* 2015.
43. Dolinoy DC: Epigenetic gene regulation: early environmental exposures. *Pharmacogenomics* 2007, 8(1):5-10.
44. Janesick A *et al.*: Endocrine disrupting chemicals and the developmental programming of adipogenesis and obesity. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2011, 93(1):34-50.
45. Park W *et al.*: Conserved properties of a urochordate estrogen receptor-related receptor (ERR) with mammalian ERRalpha. *Biochim Biophys Acta* 2009, 1789(2):125-134.
46. Anway MD *et al.*: Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science* 2005, 308(5727):1466-1469.
47. Blatt J *et al.*: Ovarian carcinoma in an adolescent with transgenerational exposure to diethylstilbestrol. *J Pediatr Hematol Oncol* 2003, 25(8):635-636.
48. Kelce WR *et al.*: Vinclozolin and p,p'-DDE alter androgen-dependent gene expression: in vivo confirmation of an androgen receptor-mediated mechanism. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997, 142(1):192-200.



49. Hajkova P *et al.*: Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mech Dev* 2002, 117(1-2):15-23.
50. Tirado-Magallanes R *et al.*: Whole genome DNA methylation: beyond genes silencing. *Oncotarget* 2017, 8(3):5629-5637.
51. Lepesheva GI *et al.*: CYP51: A major drug target in the cytochrome P450 superfamily. *Lipids* 2008, 43(12):1117-1125.
52. Mauvais-Jarvis F: Estrogen and androgen receptors: regulators of fuel homeostasis and emerging targets for diabetes and obesity. *Trends Endocrinol Metab* 2011, 22(1):24-33.
53. Mauvais-Jarvis F *et al.*: The role of estrogens in control of energy balance and glucose homeostasis. *Endocr Rev* 2013, 34(3):309-338.
54. Carone BR *et al.*: Paternally induced transgenerational environmental reprogramming of metabolic gene expression in mammals. *Cell* 2010, 143(7):1084-1096.
55. Fauque P *et al.*: Assisted Reproductive Technology affects developmental kinetics, H19 Imprinting Control Region methylation and H19 gene expression in individual mouse embryos. *BMC Dev Biol* 2007, 7:116.
56. Fauque P *et al.*: In vitro fertilization and embryo culture strongly impact the placental transcriptome in the mouse model. *PLoS One* 2010, 5(2):e9218.
57. Fauque P *et al.*: Modulation of imprinted gene network in placenta results in normal development of in vitro manipulated mouse embryos. *Hum Mol Genet* 2010, 19(9):1779-1790.
58. Ducat A *et al.*: Endothelial cell dysfunction and cardiac hypertrophy in the STOX1 model of preeclampsia. *Sci Rep* 2016, 6:19196.
59. Eustache F *et al.*: Chronic dietary exposure to a low-dose mixture of genistein and vinclozolin modifies the reproductive axis, testis transcriptome, and fertility. *Environ Health Perspect* 2009, 117(8):1272-1279.
60. Auger J *et al.*: Environmental levels of oestrogenic and antiandrogenic compounds feminize digit ratios in male rats and their unexposed male progeny. *Proc Biol Sci* 2013, 280(1768):20131532.
61. Jegou B *et al.*: Protective effect of medroxyprogesterone acetate plus testosterone against radiation-induced damage to the reproductive function of male rats and their offspring. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991, 88(19):8710-8714.

## **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 « TREE » est de 330265 €, dont 197640€ sont éligibles à une subvention.

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

Le projet est prévu sur une durée de 24 mois à partir de la date de signature du directeur général de l'ONEMA.

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

Voir annexe financière jointe.

