

Appel à projets de recherche "environnement-santé-travail" 2024

Résumés des dossiers déposés

Contenu du document

Ce document contient l'ensemble des résumés des 42 dossiers soumis aux appels à projets 2024 et retenus pour financement par le comité d'orientation à l'issu du processus de sélection

SOMMAIRE

Résumé AHRtox - 2024_EST_013.....	4
Résumé ATBR-SOL - 2024_EST_186	7
Résumé ATEN - 2024_RF_004.....	10
Résumé BioMetAll - 2024_EST_141.....	13
Résumé CAPSULE - 2024_EST_059	16
Résumé CARCOH-Lymph - 2024_EST_078.....	19
Résumé ClickPE - 2024_EST_150.....	22
Résumé COGEN'AIR - 2024_EST_243	25
Résumé COMBITAC - 2024_EST_201.....	28
Résumé COOLCOGNIRS - 2024_EST_146	31
Résumé CORSICA - 2024_RF_013.....	34
Résumé CulexResist - 2024_EST_163.....	37
Résumé Eat2AL - 2024_EST_014	40
Résumé EMBRYOPLAST - 2024_EST_021	43
Résumé EPiLEG - 2024_EST_240	46
Résumé Headphone - 2024_EST_074.....	49
Résumé InflaPark - 2024_EST_035	52
Résumé ISMI - 2024_EST_218	55
Résumé KynED - 2024_EST_198.....	58
Résumé KINEMAC - 2024_EST_226.....	61
Résumé MAELSTROEM - 2024_RF_010.....	64
Résumé MAG - 2024_EST_179	67
Résumé MoBioM-Epi - 2024_RF_002.....	70
Résumé MultiSocialEGEA - 2024_EST_042	73
Résumé PEMOC'H - 2024_EST_125.....	76
Résumé PESTIPREDIS - 2024_EST_129.....	79
Résumé PYRCOM - 2024_EST_184	82
Résumé PZLP - 2024_EST_124	85
Résumé RadioFerti - 2024_RF_007	88
Résumé RESILEPTO - 2024_EST_171	91
Résumé SAFECHARGE - 2024_RF_008.....	94
Résumé SAS - 2024_EST_208.....	97

Résumé SPIRIT - 2024_EST_216	100
Résumé STRATA - 2024_EST_083	103
Résumé Transepfas - 2024_EST_118	106
Résumé TRANSITION - 2024_EST_017	109
Résumé TEMP AIR-BREAST - 2024_EST_154	112
Résumé TESTISOME - 2024_EST_177	115
Résumé Toxicomac - 2024_EST_077.....	118
Résumé TOXIMET - 2024_EST_202.....	121
Résumé TOXMIX - 2024_EST_009.....	124
Résumé WOODTOX-ALI - 2024_EST_028.....	127

Résumé AHRtox - 2024_EST_013

Comprendre et prédire l'interaction du récepteur des hydrocarbures aromatique (AHR) avec les contaminants environnementaux

M. William Bourguet

Centre de Biochimie Structurale CNRS UMR5048 Inserm U1054 - Montpellier

Projet complet - 36 mois

Budget : 199 408 € TTC

Objectif détaillé

Le récepteur des hydrocarbures aromatiques (AHR) est un facteur de transcription ligand-dépendant qui intervient dans un large éventail de processus physiologiques et pathologiques en réponse à une multitude de substances chimiques et naturelles (1). Notamment, AHR est activé par de nombreux contaminants environnementaux (CE) tels que les hydrocarbures aromatiques halogénés (HAH), les polychlorobiphényles (PCB) ou les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) dont il médie le métabolisme mais également les effets délétères. Des dérèglements du fonctionnement d'AHR, notamment ceux induits par certaines molécules anthropogéniques, sont impliqués dans l'apparition de diverses pathologies telles que des cancers ou des maladies inflammatoires de l'intestin. Jusqu'à aujourd'hui l'absence de données structurales expérimentales à haute résolution ne permettait pas de comprendre le mode de liaison et le mécanisme d'activation d'AHR par une telle diversité de composés. En utilisant la cryo-microscopie électronique (cryo-ME), nous avons récemment résolu les structures 3D de AHR lié à un ligand naturel, l'indirubine (2), ainsi qu'un HAP, le benzo(a)pyrène (B[a]P) (3). Les structures obtenues aux résolutions de 2,85 Å et 2,75 Å, respectivement, ont fourni les premières visualisations expérimentales à l'échelle atomique (proches de celles obtenues par cristallographie aux rayons X) du domaine de liaison du ligand d'AHR et révélé précisément les interactions fines entre les deux composés et le récepteur. La structure du complexe AHR-B[a]P a en outre permis de modéliser in silico l'interaction de deux autres composés de la famille HAP (B[k]F et B[a]A) avec AHR et de prédire correctement leurs activités relatives corroborées par des essais cellulaires de gène rapporteur (3).

Dans le projet AHRtox nous proposons d'exploiter ce savoir-faire pour étudier plus largement l'interaction d'AHR avec ses ligands naturels et environnementaux. Notre premier objectif (Objectif #1) sera de résoudre la structure d'AHR en complexe avec des composés représentatifs des trois grandes classes chimiques de ligands anthropogéniques d'AHR : les HAH tels que TCDD (dioxine) ou TCDF, les PCB tels que PCB126 ou PCB81 et le 3MC, un second représentant de la famille des HAP. Ces structures nous permettront de mettre en évidence les modes de liaison de ces chefs de files et faciliteront la modélisation de dérivés apparentés (Objectif #2). Afin d'évaluer la pertinence de cette approche, les modes et activités de liaison obtenus par modélisation pour 5 composés supplémentaires par famille (5 ligands naturels, 5 HAH, 5 HAP, 5 PCB) seront validés grâce à des essais cellulaires utilisant une lignée rapportrice développée et validée dans notre laboratoire (2, 3), ou à des mesures biophysiques d'interaction. Notre ambition à travers l'Objectif #2 sera de valider une

approche in silico capable de prédire rapidement la capacité de liaison d'un grand nombre de composés naturels et environnementaux à AHR. L'Objectif #3 aura pour but d'étendre nos investigations à une espèce aquatique (le poisson zèbre) et une espèce mammifère non humaine (le rat), afin de mettre en évidence et d'expliquer les différences inter-espèces dans la réponse d'AHR aux molécules environnementales, comme nous l'avons déjà fait dans le cas de l'indirubine (2) et du BAP (3). Pour cela nous utiliserons la modélisation moléculaire et des lignées cellulaires rapportrices mises au point dans notre laboratoire et exprimant les récepteurs AHR des différentes espèces.

En combinant des approches structurales, bio-informatiques et cellulaires, AHRtox fournira un cadre rationnel pour mieux comprendre et prédire l'impact des polluants environnementaux sur la santé humaine et les écosystèmes via leur interaction avec AHR.

(1) Larigot L, et al. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2022 Jan 6;62:383-404.

(2) Gruszczuk J, et al. Nat Commun. 2022 Nov 16;13(1):7010.

(3) Kwong HS, et al. J Mol Biol. 2023, en révision.

Originalité et/ou caractère novateur du projet

Malgré les nombreuses tentatives menées depuis une trentaine d'années, aucun laboratoire au niveau international n'a pu résoudre la structure tridimensionnelle de AHR. En co-exprimant AHR humain avec des protéines chaperons, nous avons pu résoudre sa structure par cryo-ME. Cette avancée méthodologique nous place donc dans une position unique très favorable pour étudier l'interaction du récepteur AHR avec ses ligands environnementaux et naturels. Un autre point fort d'AHRtox est d'adosser une approche structurale à des essais cellulaires, cette association permettant d'aboutir à une compréhension plus complète des mécanismes mis en jeu et donc à une meilleure capacité de prédiction des interactions.

Questions de recherche

ACHIM 6 - Optimisation des protocoles d'évaluation des substances chimiques : amélioration et validation des méthodes, production de données utiles à la construction de valeur sanitaire de référence.

ACHIM 10 - Développement de nouveaux outils toxicologiques (modèles 3D, biologie synthétique) applicables à l'évaluation des risques. Validation et limite de l'utilisation de ces modèles.

PE 1 - Développement de méthodes permettant d'investiguer des mécanismes d'action (y compris épigénétiques).

AHRtox inclura la mise au point et l'utilisation d'outils bio-informatiques, biochimiques, biophysiques et cellulaires applicables à l'évaluation des substances chimiques (ACHIM6) et des risques (ACHIM10).

PE1 : L'interférence transcriptionnelle entre le récepteur AHR et certains récepteurs nucléaires comme les récepteurs des estrogènes et des androgènes est bien documentée et peut donc intervenir dans la perturbation des voies de signalisation estrogéniques et androgéniques. Des polluants environnementaux comme la dioxine peuvent donc être considérés comme des perturbateurs endocriniens agissant via ces mécanismes de « crosstalk ».

Description des méthodes mises en œuvre

Objectif #1

M1-M20 : Expression et purification des complexes AHR-HAH (x2), AHR-HAP (x1) et AHR-PCB (x2). Acquisition des données de cryo-ME et résolution des structures (CBS).

Objectif #2

M8-M22 : A l'aide des structures expérimentales obtenues, modélisation par amarrage de l'interaction de 5 ligands naturels, 5 HAH, 5 HAP et 5 PCB avec AHR humain à l'aide du logiciel de modélisation @TOME développé au CBS (<http://atome.cbs.cnrs.fr>) (CBS).

M12-M24 : Validation des modes et des activités de liaison prédits par des méthodes biophysiques (nano-DSF et/ou dénaturation thermique) et des essais de transactivation sur gène rapporteur (tests en cellules) (CBS/IRCM).

Objectif #3

M1-M12 : Les lignées HAhLH (humaine), H4AhLH (rat) et ZAhLH (poisson zèbre) seront utilisées pour caractériser l'activité des 20 composés naturels et environnementaux sur le récepteur AHR des trois espèces (IRCM).

M21-M30 : La modélisation des récepteurs de rat et de poisson zèbre à partir des structures humaines permettra d'interpréter les différences inter-espèces mises en évidence dans les lignées cellulaires (CBS).

Objectif #4

M31-M36 : Rédaction d'articles (CBS/IRCM).

Partenariat

Centre de Biologie Structurale (CBS) - Nuclear receptors as integrators of endogenous and environmental signals

Responsable de l'équipe : M. William Bourguet

Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier (IRCM) - Plateforme de criblage en cancérologie

Responsable de l'équipe : Mme Marina Grimaldi

Résumé ATBR-SOL - 2024_EST_186

Déterminants de **sélection ou d'atténuation de l'AnTiBioRésistance** lors du retour au SOL de produits résiduaux organiques

Mme Maialen Barret

INPT-ENSAT - Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie ECOLAB UMR5245 - Laboratoire d'Ecologie

Fonctionnelle et Environnement - Castanet Tolosan

Projet complet - 30 mois

Budget : 199 655 € TTC

Objectif détaillé

La résistance aux antibiotiques est une préoccupation majeure pour la santé publique et environnementale. L'épandage de produits résiduaux organiques (PRO), tels que des composts ou digestats de boues, des effluents d'élevage, contribue à l'apport discontinu dans l'environnement d'antibiotiques, de bactéries résistantes (BRA) et de gènes de résistance (GRA) et participe à la dissémination de l'antibiorésistance. Pour maîtriser les impacts sur la problématique globale de l'antibiorésistance dans un contexte « One Health », la gestion de ces PRO jusqu'à leur retour au sol constitue un levier d'action majeur. Les procédés mis en œuvre pour stabiliser ces PRO peuvent réduire les teneurs en antibiotiques, en BRA, la diversité et de l'abondance du résistome et des éléments génétiques mobiles (EGM) associés. Néanmoins cette réduction est sujette à une grande variabilité en fonction du type de gènes considérés, de l'effluent traité, ou encore du procédé utilisé. De même, l'évolution des marqueurs de l'antibiorésistance lors du retour au sol varient en fonction du type de sol étudié et de sa biodiversité.

Les objectifs de ATBR-SOL visent à étudier et déterminer :

1-les « acteurs » issus d'un PRO (matière organique MO, antibiotiques et communautés microbiennes) contribuant à la dissémination de l'antibiorésistance lors du retour au sol de ce PRO

2-le rôle de la biodiversité du sol (communauté microbienne, fongique et vers de terre) dans l'atténuation de l'antibiorésistance lors du retour au sol

3-les phénomènes de coalescence des communautés et des GRA (évolution & interaction des communautés endogènes du sol & exogènes du PRO après épandage)

4-la dynamique des transferts de gènes entre PRO et sol en fonction des pressions de sélection appliquées aux communautés du sol

Originalité et/ou caractère novateur du projet

L'originalité du projet ATBR-SOL est de proposer une étude complète des différents facteurs influençant la dissémination de l'antibiorésistance lors du retour au sol des PRO sur des systèmes contrôlés de laboratoire afin de maîtriser les paramètres physicochimiques et biologiques.

-> La prise en compte du facteur de coalescence microbienne et des GRA au sein des procédés de traitement des PRO et lors du retour au sol est novateur car peu investigué.

-> L'intégration dans l'écosystème « sol » de vers de terre (et de leur microbiote) permettra de se rapprocher de conditions réelles et d'évaluer leur rôle sur le devenir des marqueurs de l'antibiorésistance dans des sols amendés avec des PRO.

-> Notre stratégie innovante d'ingénierie de matrice (découplage MO, antibiotique et communauté microbienne du digestat) permettra de dissocier les différents acteurs de la pression de sélection et d'identifier leurs impacts respectifs sur la dissémination de l'antibiorésistance.

-> L'utilisation d'outils de biologie moléculaires de pointe (qPCR haut débit Fluidigm, souche CRISPR-Cas9, séquençage Illumina) permettra d'appréhender la dynamique des flux de gènes dans les environnements complexes que sont les sols.

Questions de recherche

ACHIM 3.3 - Prise en compte et caractérisation des multi-expositions et co-expositions en lien avec l'exposome : impacts des co-expositions à des agents microbiologiques et chimiques sur la santé humaine et les écosystèmes.

ABIO 5 - Impacts des co-expositions à des agents microbiologiques et chimiques sur la santé humaine et les écosystèmes.

DECHETS 2 - Risques sanitaires et environnementaux au cours du cycle de vie des déchets :

- *associés à la présence de substances chimiques ou agents biologiques dans des déchets recyclés et les biodéchets,*

- *liés à la présence d'agents pathogènes.*

ATBR-SOL permettra de répondre aux questions sur les risques sanitaires et environnementaux liés à l'épandage d'effluents d'élevages contaminés par des antibiotiques et des BRA/GRA sur les sols.

Le projet s'inscrit notamment dans la problématique de l'impact des co-expositions BRA, GRA/antibiotiques sur les écosystèmes (ici le sol) et de fait sur la santé humaine. Par l'intermédiaire de nos expériences et en dissociant chaque acteur de pression de sélection, nous pourrions déterminer les facteurs contrôlant la prolifération de BRA/GRA, mieux comprendre les phénomènes de coalescence microbienne entre communautés endogènes du sol et exogènes des PRO, et les mécanismes de transfert horizontal de résistance lors du retour au sol des PRO.

Description des méthodes mises en œuvre

Phase 0 Production de digestat de fumier bovin

Un fumier bovin (dont l'élevage représente 58% des Unités Gros Bétail en France) sera dopé ou non dopé en oxytétracycline (antibiotique largement utilisé dans la filière) et sera digéré par méthanisation afin de produire deux digestats (dig-oxy, dig-Øoxy) (3 mois, T1-T3).

Phase 1 Identifier les acteurs contribuant à la dissémination de l'antibiorésistance lors du retour au sol. Microcosmes de sol (1 sol, historique amendement connu), caractérisés à T0 (communauté endogène, GRA, BRA, EGM) et amendés avec les digestats de la phase 0 et avec les constituants de ces digestats : MO seule, MO et oxytétracycline, communauté microbienne exogène seule (préalablement extraite des digestats, 10.1128/AEM.05549-11), MO et communauté microbienne exogène. Suivi sur 3 mois (GRA, EGM, antibiotiques et étude de la coalescence microbienne et des GRA (10.3389/fmicb.2023.1155956). (10 mois, T4-T13).

Phase 2 Etudier l'influence de la physicochimie et de la biodiversité du sol sur la dissémination de l'antibiorésistance. Microcosmes de sols (2 types de sol argilo-limoneux et

limoneux-sableux), contenant ou non vers de terre de type *Aporrectodea caliginosa*, amendé avec digestats de la phase 0 (contenant ou non oxytétracycline). Suivi sur 3 mois des phénomènes de coalescence microbienne, GRA, EGM, antibiotiques et bioturbation via présence de luminophores analysés par fluorescence (10.1007/s00374-020-01536-y). (12 mois, T14-T25)

Phase 3 Etudier les transferts de GRA. Etude de la dynamique du transfert horizontal de GRA sur échantillons prélevés à différents temps des microcosmes des phases 1 et 2 : via une souche d'*E. coli* « réceptrice » possédant une plateforme d'acquisition, basée sur système CRISPR-Cas9, capable d'incorporer et d'identifier l'ADN exogène (10.1038/s41467-019-14012-5) (24 mois, T4-T27).

Méthodes et outils mobilisés au cours du projet :

- Pilote digestion anaérobie, microcosmes sol, analyses physicochimiques. LBE, UR050, INRAE, D. Patureau, V. Bru, O. Della-Negra.

-Analyses des communautés microbiennes/fongiques (séquençage ARNr 16S, ITS, abondances relatives des GRA et EGM) et essais de bioturbation : Laboratoire d'Ecologie Fonctionnelle et Environnement, UMR 5245, CNRS/UPS/INPT, M. Barret, C. Larue, F. Gilbert

-Essais de transferts de GRA, laboratoire L2 & quantification antibiotique (LC-MS) : INTHERES, UMR 1436 INRAE/ENVT, D. Bibbal, N. Arpaillange, V. Dupouy, E. Dordet

Recrutement demandé sur le projet : Post-doctorat, 2 ans.

Partenariat

CNRS/UPS/INPT - UMR 5245-Laboratoire d'Ecologie Fonctionnelle et Environnement

Responsable de l'équipe : Mme Maialen Barret

INRAE/ENVT - UMR 1436-INTHERES

Responsable de l'équipe : Mme Delphine Bibbal

INRAE - UR 0050-LBE

Responsable de l'équipe : Mme Oriane Della-Negra

Résumé ATEN - 2024_RF_004

Analyses Toxicologiques Ex vivo du système Nerveux de rats exposés en corps entier durant leur développement pré et post natal à la 5G à 3,5 GHz

Mme Anne-Sophie Villégier

INERIS Parc technologique Alata BP 2 - Verneuil en Halatte

Projet complet - 36 mois

Budget : 199 997 € TTC

Objectif détaillé

Le déploiement des télécommunications implique désormais des expositions aux champs électromagnétiques (CEM) radiofréquence (RF) proches du corps humain. Notre laboratoire a publié qu'après une exposition pré et post-natale aux CEM 3,5 GHz, la descendance présentait des anomalies cliniques (Bodin et al 2023) dont les mécanismes seront explorés dans le 1er objectif du projet ATEN.

Les foetus et les enfants sont plus vulnérables que les adultes à la pénétration de l'énergie des CEM dans le cerveau, à cause de la finesse du crâne. Des études ont décrit les voies de toxicité neurodéveloppementales (Adverse Outcome Pathways) qui affectent la neurogenèse, le nombre de neurones, de synapses, les récepteurs des neuromodulateurs (sérotonine), le Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF), son récepteur et les cytokines. **Des études soulignent le rôle des interactions du cerveau immature avec l'intestin dans l'axe** intestin-cerveau et les stimuli environnementaux visuels et tactiles, pour le développement. **Le rôle de l'axe intestin-cerveau n'a encore jamais été décrit** dans les études de toxicité neurodéveloppementale des CEM. Les yeux et la peau, localisés en superficie du corps absorbent le plus d'énergie des fréquences de la 5G, sans que ces effets ne soient connus aujourd'hui.

In vivo, après des expositions prénatales à 900 MHz 2,6 W/kg des foetus, la descendance montrait une réduction de l'activité locomotrice (Petitdant et al 2018). A 3,5 GHz, la descendance de rates gestantes exposées à 0,07 W/kg montrait une activité stéréotypée augmentée chez les mâles et réduite chez les femelles (Bodin et al 2023) et une réduction du TNF α et des interleukines 6 dans le cerveau. A ce stade d'analyse, le mécanisme n'est pas encore compris. Des prélèvements de sang, yeux, peau, tube digestif ont été réalisés afin d'étayer les mécanismes possibles de l'exposition 0,07 W/kg. Le 1er objectif du projet ATEN **est d'analyser : cerveau (BDNF), l'inflammation et le stress oxydant de l'axe intestin-cerveau et de la peau, les yeux (neurogenèse cornéenne, structure rétinienne).** Le 2ème objectif du projet ATEN sera de répliquer le protocole in vivo et ex vivo afin de consolider les résultats. Ce travail apportera des données sur les effets neurotoxiques des CEM 5G.

Originalité et/ou caractère novateur du projet

Ce projet est novateur parce qu'il porte sur les fréquences 3,5 GHz de la 5G. Il permettra de produire les 1ères données neurodéveloppementales selon la ligne directrice de l'OCDE n°426. Notre étude longitudinale associe l'exposition dans la fenêtre de vulnérabilité du développement pré et post natal, l'observation clinique in vivo, et l'analyse ex vivo mécanistique. Ce protocole intègre les principes récemment montrés du rôle clé des interactions cerveau- systèmes sensoriels, et axe intestin-cerveau pour le développement. Ce projet prend en compte les 1000 1ers jours de développement face aux expositions aux CEM 5G. Il permettra l'identification des périodes de vulnérabilité, d'une part face aux expositions aux CEM et d'autre part pour l'expression des anomalies fonctionnelles et mécanistiques. L'originalité du projet est qu'il démarre après une pré-étude, c'est à dire que le projet est initié, validé sur le plan éthique, et sur sa faisabilité (risque faible), avec une publication des données cliniques (Bodin et al 2023). Ceci constitue un rationnel aux recherches mécanistiques sur les échantillons ex vivo, pour lesquels les résultats seront directement corrélables aux effets observés in vivo parce qu'ils ont été obtenus sur les mêmes animaux.

Nous consoliderons les résultats dans une étude de réplication (tâche 2). Cette démarche est novatrice parce que la littérature sur "CEM et santé" manque cruellement de confirmation des résultats (intra/extra laboratoires), les données présentant une grande variabilité qui empêche d'émettre des conclusions.

Questions de recherche

RFES 1.1 - Études in vitro, in vivo ou cliniques sur les mécanismes d'action de l'exposition (aiguë et chronique) du vivant aux radiofréquences, aux niveaux moléculaire et cellulaire, en tenant compte des évolutions d'utilisation de fréquences liées aux nouveaux usages et nouvelles technologies de communication. Les études s'intéressant aux bandes de fréquences nouvellement identifiées (pour la 5G par exemple) et encore peu étudiées (3,5 GHz, 26 GHz et au-delà, notamment) sont prioritaires.

RFES 1.2 - Études réalisées, dans les mêmes conditions expérimentales, à plusieurs fréquences, afin d'évaluer la possibilité d'effets dépendants de la bande de fréquences.

RFES 2.1.6 - Études in vivo ou cliniques sur les effets éventuels de l'exposition (aiguë et chronique) aux radiofréquences, notamment : sur le développement fonctionnel et cérébral en fonction de l'âge (in utero, juvénile, adulte et sujet âgé), en engageant des études longitudinales chez l'animal, afin d'identifier des périodes de sensibilité/vulnérabilité éventuelles

Le projet ATEN s'intéresse aux bandes de fréquences nouvellement utilisées par la 5G et encore peu étudiées, la 3,5 GHz.

Ce projet s'inscrit dans deux thèmes de recherche : Les mécanismes d'action au niveau moléculaire et cellulaire « RFES 1.1. Études in vitro, in vivo ou cliniques sur les mécanismes d'action de l'exposition...aux radiofréquences,... RFES 1.2. Études réalisées, dans les mêmes conditions expérimentales, à plusieurs fréquences, afin d'évaluer la possibilité d'effets dépendants de la bande de fréquences. »

ATEN rentre dans le cadre d'un projet plus ample dans lequel la pré-étude a été mise en œuvre avec la 2G (900 MHz) et la 5G (3,5 GHz).

- Effets physiologiques et sanitaires des RF. «...déploiement de la5G (en particulier pour les bandes 3,5 GHz et 26 GHz et au-delà),...

RFES 2.1. Études in vivo ou cliniques sur les effets éventuels de l'exposition (aiguë et chronique) aux radiofréquences, notamment : 2.1.6. sur le développement fonctionnel et cérébral en fonction de l'âge (inutero, juvénile, adulte et sujet âgé), en engageant des études

longitudinales chez l'animal, afin d'identifier des périodes de sensibilité/vulnérabilité éventuelles ; »

Description des méthodes mises en œuvre

Dans la pré-étude les rates gestantes (n=8/groupe) ont été exposées à 3,5 GHz 0,08 W/kg en corps entier entre G7 et J21. Dans chaque portée, 1 mâle et 1 femelle ont été sacrifiés à J1, 9, 17 et 45. Des observations in vivo étaient le détachement des oreilles, la percée des dents, l'ouverture des yeux, les réflexes néonataux (géotaxie, retournement et agrippement) et l'activité dans l'open field (Bodin et al 2023). Le cerveau, le sang, les yeux, la peau et le tube digestif ont été récupérés.

Tâche1. Analyses ex vivo (8 mois): L'hippocampe, le striatum et le cortex seront analysés sur les récepteurs du BDNF (trk B). Le BDNF sera mesuré par ELISA dans le sang. Les yeux seront examinés par immunohistochimie sur la neurogenèse cornéenne, la structure rétinienne, la réponse gliale, la vascularisation et le développement du cristallin. La peau sera examinée en anatomopathologie, sur l'inflammation et le stress oxydant, avec marquages histologiques (Hématoxyline et Eosine) et des terminaisons nerveuses. Le tube digestif sera examiné sur l'inflammation et le stress oxydant. Ces mesures seront réalisées sur 1 mâle et 1 femelle par portée à J1, 9, 17, 45.

Tâche2. Etude de réplification (25 mois): La pré-étude et la tâche1 seront répliquées point par point avec 8 rates gestantes par groupe dans le but de consolider tous les résultats (positifs et négatifs).

Tâche3. Valorisation des résultats (3 mois): rédaction des articles, présentations pour congrès internationaux.

Partenariat

Ineris - TEAMS

Responsable de l'équipe : Mme Anne-Sophie Villégier

Inserm - umr1138 équipe17

Responsable de l'équipe : Mme Alicia Torriglia

Université de Picardie Jules Verne - PériTox UMR_I 01

Responsable de l'équipe : Mme Amandine Pelletier

Université de Rouen Normandie - Equipe BIOMMAT

Responsable de l'équipe : M. Christophe Egles

Identification de nouveaux biomarqueurs pour la caractérisation de co-exposition cutanées aux molécules chimiques : Étude du métabolome des kératinocytes et lien avec les réactions inflammatoires allergiques

Mme Saadia Kerdine-Römer
Université Paris-Saclay Faculté de Pharmacie - Orsay

Projet complet - 36 mois
Budget : 199 888 € TTC

Objectif détaillé

On estime qu'environ 5 millions de personnes en Europe sont déjà sensibilisées aux substances chimiques présentes dans les produits de consommation courante et que jusqu'à 180 000 nouveaux cas de sensibilisation se produisent chaque année (ECHA).

Parmi les pathologies cutanées développées en réponse à ces expositions cutanées aux substances chimiques, la dermatite allergique de contact (DAC) est très fréquente dans la population européenne, 27 % des personnes interrogées étant allergiques à des allergènes environnementaux et professionnels (1). Parmi les principaux allergènes professionnels, on peut citer les additifs du caoutchouc (dithiocarbamates, benzothiazoles, guanidine), les plastiques (résines époxy) et les biocides (ammoniums quaternaires, résines époxy) (2 ; INRS, 2023). En Europe, on estime que l'incidence annuelle de la dermatite de contact professionnelle se situe entre 0,5 et 1 cas pour 1000 travailleurs et qu'elle a un impact délétère sur l'emploi et l'économie (3).

Plusieurs facteurs influencent la DAC, notamment la réactivité chimique et la concentration de la molécule chimique appliquée sur la peau ainsi que la fréquence d'exposition. Dans l'épiderme, la couche la plus superficielle de la peau, les kératinocytes (KC), présents en abondance (95 %), jouent un rôle central dans la barrière cutanée et les processus inflammatoires. En réponse au stress chimique, les KC sécrètent un panel de différentes protéines (cytokines, alarmines...) activant les cellules dendritiques (DC) cutanées, cellules essentielles dans l'initiation d'une réponse immunitaire spécifique. Étant donné que les KC sont les premières et principales cibles des toxiques environnementaux, il existe aujourd'hui un intérêt majeur à mieux caractériser comment les KC intègrent et s'adaptent aux stress chimiques dans le cadre de l'allergie cutanée.

Nos résultats montrent un effet du Cinnamaldéhyde (CinA), molécule allergisante de référence, sur le profil métabolique des KC dépendamment du facteur de transcription Nrf2 (4). Ce remodelage métabolique pourrait modifier le microenvironnement cutané, influençant ainsi l'activation des DC.

Notre objectif est d'étudier (a) les modifications du métabolisme cellulaire induites par les molécules chimiques en exposition unique ou en mélange et (b) l'impact de ces modifications sur le microenvironnement cutané et l'activation de la DC, et ce en lien avec Nrf2, facteur de transcription décrit comme incontournable dans la détoxification de tous les

produits chimiques et l'inflammation (5). In fine, cette étude devrait contribuer à proposer **de nouveaux biomarqueurs précoces de l'exposition aux produits chimiques**

1. Dickel, H., et al. . 2002.. Contact Dermatitis 46: 197–206.
2. Olufunmilayo A., et al, 2021, Int. Journal of Dermatology, 60:1082-1091
3. Dietz, J. et al. 2020. Contact Dermatitis 1–12.
4. Vallion et al., 2022. 2. Antioxidants, 11(3), 575
5. Kobayashi E.H. et al.. Nat. Commun. 7: 11624

Originalité et/ou caractère novateur du projet

Les deux modèles de KC proposés sont un modèle 2D de KC humains et un modèle d'épiderme reconstruit (modèle 3D). Le modèle 2D permettra de réaliser une analyse approfondie du métabolisme énergétique, de l'activité métabolique des KC exposés en mélange ou non avec certains principaux allergènes professionnels tels que les additifs du caoutchouc [1,3-Diphénylguanidine (DPG)], les plastiques [poly et méthacrylate de méthyle (MMA)] et les biocides [Benzisothazolinine (BIT)]. Le choix des concentrations sera établi sur deux critères, l'activation du facteur de transcription Nrf2 (composante anti-oxydante et anti-inflammatoire) et l'activité métabolique des KC en mono-exposition.

L'analyse des métabolites intracellulaires des KC sera réalisée par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution (LC-HRMS) afin de caractériser les voies métaboliques impactées par une exposition à un ou plusieurs agents présents à différentes concentrations. Le traitement et l'analyse de ces données devraient permettre d'identifier les métabolites spécifiques, les fonctions et les voies associés avec l'état inflammatoire des KC. De plus, la composition du sécrétome, réalisée via une analyse multiplex, reflet du microenvironnement cutané, informera sur la façon dont les KC peuvent moduler le phénotype des DC de la peau, qui seront co-cultivées avec le modèle 3D. En outre, les lipides étant essentiels à la fonction barrière de l'épiderme, l'analyse du lipidome sera réalisée en parallèle et devrait permettre d'obtenir une signature métabolique complète représentative de l'exposition et du produit chimique.

Questions de recherche

ACHIM 3.1 - Prise en compte et caractérisation des multi-expositions et co-expositions en lien avec l'exposome : impacts des expositions à des substances chimiques en milieu de travail et en population générale, multi-expositions ou expositions cumulées, y compris médicamenteuses, à d'autres types de nuisances (nuisances physiques, biologiques, relationnelles, organisationnelles...).

ACHIM 3.2 - Prise en compte et caractérisation des multi-expositions et co-expositions en lien avec l'exposome : modèles in vitro et in vivo chez l'animal : développement d'indicateurs globaux « d'effets cocktail » d'une exposition chronique, identification d'espèces sentinelles, étude des effets synergiques et antagonistes des substances en mélanges.

ACHIM 10 - Développement de nouveaux outils toxicologiques (modèles 3D, biologie synthétique) applicables à l'évaluation des risques. Validation et limite de l'utilisation de ces modèles.

Le projet s'inscrit dans les thématiques "Agents chimiques", en étudiant les impacts de co-exposition à des allergènes professionnels (ACHIM 3.1). En utilisant des modèles in vitro (2D et 3D) (ACHIM 3.2, ACHIM10), ce projet, au-delà des résultats scientifiques attendus et en adéquation avec la règle des 3R, devrait à terme proposer des éléments nouveaux au sein de l'AOP de la sensibilisation cutanée (ACHIM 10) relatif au métabolome des KC.

Description des méthodes mises en œuvre

1. Choix des concentrations pertinentes (M1-M9)

Tâche 1. Tests de cytotoxicité MTT, de rouge neutre, et mesure de l'ATP intracellulaire pour définir deux concentrations CV70 et CV50 post 24h de stimulation

Tâche 2. Nrf2 étant impliqué dans la détoxification et la réponse inflammatoire. L'expression du Nrf2 sera mesurée par western blot aux deux concentrations retenues et à deux temps (3h et 6h)

Tâche 3. Mesure du métabolisme énergétique par Seahorse XF PRO

Pour les 2 & 3: Activation des KC par DPG, BIT, MMA, et un contrôle positif (CinA) aux concentrations sélectionnées en 1.

2 - Analyse métabolomique et lipidomique. L'analyse des métabolites par LC-HRMS sera effectuée pour caractériser les réseaux métaboliques et lipidomiques fonctionnels en mono-exposition et en mélange (M9-M22)

Tâche 1. sans à priori Modèle 2D

Tâche 2. avec à priori Modèle 3D : une fois les signatures définies, elles seront alors adressées dans le modèle RhE (modèle 3D)

3 - Microenvironnement cutané et rôle du Nrf2 (M22-M34)

Tâche1. Analyse de la production de cytokines et autres médiateurs par dosage système multiplex des KC en modèle RhE

Tâche 2. Modèle co-culture RhE/DC pour étudier le rôle du microenvironnement dans l'activation des DC : étude du phénotype des DC par cytométrie en flux

Tâche 3. Modèle RhE prétraité avec ou sans activateur Nrf2 (curcumine ou sulforaphane) ou inhibiteur (Brusatol) afin d'aborder l'effet protecteur du Nrf2

Partenariat

Université Paris-Saclay - INSERM UMR996

Responsable de l'équipe : Mme Saadia Kerdine-Römer

CEA - LI-MS

Responsable de l'équipe : M. François Fenaille

Résumé CAPSULE - 2024_EST_059

Utilisation des données de systèmes capteurs pour le calcul d'exposition aux particules fines

Mme Alicia Gressent

INERIS Parc Technologique Alata Rue Jacques Taffanel - Verneuil-en-Halatte

Projet complet - 36 mois

Budget : 199 353 € TTC

Objectif détaillé

En 2019, l'Organisation Mondiale de la Santé estime que l'exposition de la population à la pollution atmosphérique entraîne 4,2 millions de décès prématurés par an. Il est prouvé que les PM2.5 (particules fines) sont responsables d'un taux de mortalité élevé dans les 250 villes les plus peuplées du monde. Il est donc nécessaire de suivre l'exposition de la population aux PM2.5 dont l'estimation est usuellement réalisée à partir de modélisations fusionnées aux mesures du réseau de surveillance de la qualité de l'air (Real et al., 2022). De nouvelles données d'observation issues des systèmes capteurs offrant une résolution spatiale et temporelle de mesure unique sont désormais disponibles sur le territoire français. Ce projet vise à utiliser ces données pour estimer l'exposition de la population aux PM2.5 et calculer l'impact sanitaire associé à l'échelle nationale. Il est attendu que l'intégration d'observations réalisées par les citoyens dans ces estimations puisse encourager le changement des comportements à l'égard de la pollution atmosphérique et accompagner les politiques publiques de réduction aux expositions chroniques.

Originalité et/ou caractère novateur du projet

Le projet CAPSULE permettra de centraliser les données de systèmes capteurs provenant des plateformes en accès libre telles que Sensor.Community (<https://sensor.community/fr/>) et Purple Air (<https://www2.purpleair.com/>), ainsi que les observations collectées lors du projet de sciences participatives Polluscope (<https://polluscope.uvsq.fr/>). L'assurance de la qualité des observations (souvent dépourvues d'informations de contexte) et la gestion de l'hétérogénéité des données (induite par la diversité des systèmes capteurs et des protocoles de collecte) sont des points primordiaux pour leur utilisation. Par conséquent, les paramètres issus des systèmes capteurs seront davantage utilisés pour évaluer la variabilité des PM2.5 et les données seront soumises à des traitements qui concernent l'agrégation pour changer d'échelle spatio-temporelle, la correction des artefacts et l'imputation de valeurs manquantes. Les interfaces de programmation interactive telles que Jupyter seront utilisées pour réaliser en ligne les traitements sur les données, permettant ainsi l'intégration du code, du résultat et de la documentation, et favorisant la mise en œuvre et le partage. Un catalogue des données de systèmes capteurs sera créé et permettra un accès rapide et une visualisation cartographique de ces dernières. Les données traitées avec leurs incertitudes seront accessibles en temps réel via le portail de données qui sera maintenu et réactualisé au-delà du projet. Pour la première fois, ces observations seront utilisées pour la fusion de données avec les modélisations de la plateforme PREV'AIR (<http://www2.prevoir.org/>) afin

d'estimer l'exposition annuelle de la population aux PM2.5 et le produit final sera disponible et pourra être visualisé directement via le portail de données de façon inédite.

Questions de recherche

AIR 2 - Liens entre pollution de l'air et effets sanitaires : recherche sur de nouveaux outils (bases de données sur la qualité de l'air par exemple, systèmes capteurs, modélisation, biomonitoring...) visant à améliorer l'étude de la relation dose-réponse utile à l'évaluation des risques.

Ce projet s'inscrit dans la thématique « Contaminations de milieux : Air » sur les liens entre pollution de l'air et effets sanitaires : recherche sur de nouveaux outils (bases de données sur la qualité de l'air par exemple, systèmes capteurs, modélisation, biomonitoring...) visant à améliorer l'étude de la relation dose-réponse utile à l'évaluation des risques. ». Il vise à donner des éléments de réponse aux questions de recherche suivantes : Peut-on utiliser les observations de systèmes capteurs pour estimer l'exposition aux PM2.5 ? Quel est l'impact de la prise en compte de ces observations dans l'estimation de l'impact sanitaire associé ?

Description des méthodes mises en œuvre

La 1ère année du projet consistera à centraliser les données de systèmes capteurs issues des plateformes Sensor.Community, Purple Air et de Polluscope. Les données aberrantes seront éliminées selon une méthode (Gressent, 2021) qui consiste à réaliser un clustering des données et qui permet le calcul d'un intervalle de confiance en dehors duquel les observations sont exclues. Puis, les algorithmes d'agrégation spatio-temporelle et de correction seront appliqués. Le calcul de facteurs de correction aux stations de référence, leur interpolation sur le domaine d'étude et leur application aux données de systèmes capteurs seront réalisés. Le calcul des facteurs sera effectué à partir des données de référence de PM2.5 contenues dans la base nationale Geod'air. Une incertitude associée aux données sera calculée et rendra compte de l'hétérogénéité liée au type de capteurs et à la variabilité intrinsèque. Enfin, le portail d'observations de systèmes capteurs sera créé avec la mise en place d'un transfert automatisé des données depuis les différentes plateformes en accès libre et un transfert spécifique d'une partie anonymisée des données de Polluscope. Ces données seront homogénéisées selon un format commun pour en faciliter l'analyse et le traitement. La 2ème année du projet permettra la poursuite du développement du portail d'observations. La fusion de données sera réalisée par l'outil SESAM (Gressent et al., 2020) qui permet d'intégrer dans les cartographies de la qualité de l'air les données de systèmes capteurs par krigeage universel en considérant l'incertitude inhérente à la mesure pour pondérer l'importance des observations dans l'interpolation spatiale. Cette procédure sera évaluée par validation croisée aux mesures fixes de référence, afin de comparer des concentrations estimées aux concentrations observées, avec et sans prise en compte des données de capteurs. La 3ème année du projet consistera à exploiter les concentrations de PM2.5 calculées dans PREV'AIR pour la fusion avec les données de systèmes capteurs. L'exposition sera estimée en pondérant par la population les concentrations de PM2.5 issues de la fusion de données avec et sans les données de systèmes capteurs pour montrer l'effet de l'exploitation de ces dernières. L'impact sanitaire de l'exposition aux PM2.5 sera évalué avec l'outil Alpha-RiskPoll (Schucht et al., 2015). L'outil comprend des fonctions de

concentrations-réponses par classe d'âge liant des niveaux d'exposition aux polluants à des impacts sanitaires spécifiques, ainsi que des indicateurs monétaires et leurs valeurs. Deux calculs seront réalisés, avec et sans les données de systèmes capteurs. Enfin, la faisabilité d'utiliser des données d'autres projets de sciences participatives ainsi que les données générées par des startups sera évaluée en tenant compte de l'expérience acquise lors des premières phases du projet.

Partenariat

INERIS - MOCA

Responsable de l'équipe : Mme Alicia Gressent

AERIS - AERIS

Responsable de l'équipe : M. Sébastien Payan

UVSQ - Laboratoire DAVID

Responsable de l'équipe : Mme Karine Zeitouni

Résumé CARCOH-Lymph - 2024_EST_078

Exposition professionnelle aux pesticides (carbamates, **chloroacétamides, herbicides totaux**) et risque d'hémopathies malignes lymphoïdes

Mme Séverine Tual

INSERM 1086 Cancers et Préventions Centre de Lutte Contre le Cancer François Baclesse - Caen

Projet complet - 36 mois

Budget : 198 871 € TTC

Objectif détaillé

L'objectif du projet CARCOH-Lymph est d'estimer le risque d'Hémopathies Malignes Lymphoïdes (HML) (anciennement appelées lymphomes non hodgkiniens, LNH) et de ses principaux sous-types (myélomes multiples, leucémies lymphoïdes chroniques/lymphomes lymphocytiques et lymphomes diffus à grandes cellules B) associé à l'exposition professionnelle agricole aux herbicides chloroacétamides, aux carbamates (et thio- et dithiocarbamates) (herbicides, insecticides, fongicides) et aux désherbants totaux (dont le glyphosate) au sein de la cohorte AGRICAN (79 pesticides ciblés). L'effet de ces expositions sera mesuré (1) pour chaque matière active et (2) en considérant l'effet des mélanges de substances sur la base d'un travail de clustering effectué sur l'utilisation des substances ciblées.

Originalité et/ou caractère novateur du projet

De nombreuses études ont montré des risques accrus de LNH et myélome multiple en milieu agricole dont la cohorte AGRICAN (Lemarchand 2017). Un niveau de preuve fort a été conclu entre exposition professionnelle aux pesticides et ces pathologies (Expertises INSERM 2013&2021). D'après la méta-analyse de Schinasi (2014), les études épidémiologiques sont peu nombreuses (1) à avoir documenté le rôle d'herbicides et de fongicides dont l'utilisation est très majoritaire en France (29 180 t. d'herbicides et 26 347 t. de fongicides, FAO 2020) (2) à documenter le rôle de l'exposition aux pesticides par sous-types d'HML aux étiologies différentes et (3) les études sont majoritairement des études cas-témoins à la puissance limitée ou des études nord-américaines.

Dans ce projet, nous avons ciblé les chloroacétamides (10 molécules), les carbamates (14 herbicides, 16 fongicides, 19 insecticides) et les herbicides totaux (20 molécules). Des analyses sont en cours sur d'autres familles d'insecticides (pyréthrinoïdes et organochlorés) et les phenoxy-herbicides (projet Pestilymph, financement Ecophyto). Les familles de pesticides ciblées étaient parmi les plus vendues en France en 2020 (8640 t. pour le glyphosate, 4100 t. pour les chloroacétamides, 6300 t. pour les herbicides carbamates et 1700 t. pour les carbamates fongicides) (Base Nationale des Ventes). Sur 79 molécules ciblées, 30% sont encore homologuées en France et 33% sont classées cancérigènes probables ou possibles selon l'US-EPA, l'ECHA ou le CIRC. Bien que reposant sur un faible nombre d'études, des méta-analyses montraient des élévations de risque, notamment pour

le glyphosate (lymphomes à cellules B), les herbicides et insecticides carbamates et les chloroacétamides. Le consortium Interlymph montrait aussi des risques associés au glyphosate (lymphome folliculaire) ou au carbaryl (insecticide carbamate, lymphomes à cellules T). **L'évaluation de l'exposition aux pesticides, notamment dans Interlymph, reposait majoritairement sur l'auto-déclaration de pesticides utilisés ou le recours à des experts (Ohlander, 2020).** Cette auto-déclaration est discutable (1) de nombreuses molécules sont utilisées dans une vie (2) notamment dans le contexte français de grandes cultures (multiples cultures différentes sur une même ferme) ou de viticulture ou arboriculture où les Indices de Fréquences de Traitements sont bien plus élevés que dans la cohorte AHS par exemple (3) **quand les personnes exposées sont des salariés agricoles et n'ont pas connaissance des produits utilisés.** Dans ce projet, nous proposons d'utiliser la matrice cultures-expositions PESTIMAT développée pour le contexte français.

L'originalité de ce projet sera (1) d'estimer la relation entre les HML (et ses principaux sous-types) et l'exposition au cours de la vie aux substances ciblées, grâce à la matrice PESTIMAT avec des paramètres détaillés (probabilité, intensité, fréquence) permettant de documenter la relation dose-réponse au sein de la cohorte française prospective AGRICAN et (2) de documenter les risques associés aux cocktails de pesticides.

Questions de recherche

CANCER 1 - Étude des risques de cancers liés à des expositions environnementales et/ou professionnelles aux substances, mélanges ou procédés potentiellement cancérigènes (entre autres avec une approche « vie entière »).

CANCER 3 - Identification de facteurs de risques environnementaux ou professionnels des cancers.

Ce projet quantifiera les effets à long terme des expositions cumulées agricoles à de nombreuses substances (dont 33% sont classées cancérigènes probables ou possibles et 30% sont encore homologuées) sur les HML. Ce projet fournira aux pouvoirs publics des données sur les effets de santé post-homologation permettant d'éclairer les décisions de renouvellement d'homologation et d'informer les professionnels de la prévention. Ce projet documentera également pour la première fois à notre connaissance les risques d'HML associés à ces substances en prenant en compte l'effet « cocktail », c'est-à-dire la combinaison de l'exposition à plusieurs molécules au cours de la vie.

Description des méthodes mises en œuvre

Ce projet reposera sur la cohorte AGRICAN et la matrice PESTIMAT. La cohorte comprend près de 182 000 personnes affiliées à la MSA qui ont répondu à un auto-questionnaire entre 2005 et 2007 (Levêque-Morlais 2015). Le dernier croisement avec les registres de cancers identifiait environ 1 700 cas incidents d'HML jusqu'en 2017 (373 MM, 378 LLC/LL, 262 LDGCB). Les années d'exposition aux pesticides, renseignées par culture, seront croisées avec la matrice qui, pour une culture et une année donnée, permet d'estimer 3 paramètres (probabilité, fréquence et intensité) pour chaque matière active à partir de 6 sources de données (Baldi 2017). Pour les chloroacétamides, les scores d'exposition sont déjà estimés. La 1ère étape du projet sera l'estimation des scores des tables carbamates (informations sources déjà collectées et tables déjà élaborées) et désherbants totaux (calendrier selon le mois (M): M1-M16, réalisé par l'équipe partenaire EPICENE). Des analyses seront conduites pour estimer le lien entre le risque d'HML et l'exposition aux pesticides

considérés individuellement (M1-M8 pour les chloroacétamides, M9-M16 pour les carbamates et M17-M24 pour les désherbants totaux, 3 publications prévues). Ensuite, le travail de clustering à partir **des scores d'exposition à ces 79 molécules sera conduit et le lien entre les clusters et le risque d'HML sera estimé (M25-M30)** puis écriture du manuscrit de thèse (M31-M36). Le modèle utilisé sera le modèle de Cox, en intégrant les facteurs de risque et divers paramètres influençant les niveaux d'exposition (matériels de pulvérisation...). Ces analyses seront conduites par un doctorant (co-financement à 50% demandé dans cet appel d'offre, cofinancement par la Ligue contre le cancer ou la Région Normandie en général acquis si cofinancier national). Il sera encadré par Pierre Lebailly, MCU-HDR en Santé Publique et co-encadré par Séverine Tual (cadre de recherche).

Partenariat

INSERM - INSERM 1086 ANTICIPE

Responsable de l'équipe : Mme Séverine Tual

INSERM - INSERM U1219 EPICENE

Responsable de l'équipe : Mme Isabelle Baldi

Evaluation d'une nouvelle méthodologie pour la quantification de perturbateurs endocriniens de type phtalate à faibles doses : application chez le poisson zèbre

M. Eric Battaglia

Université de Lorraine Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux - Metz

Etude de faisabilité - 24 mois

Budget : 42 640 € TTC

Objectif détaillé

Le projet de recherche a pour objectif de développer une nouvelle stratégie de suivi de polluants organiques anthropiques et de leur bioaccumulation lorsque ces derniers sont difficilement détectables et quantifiables par les méthodes analytiques classiques. Notre choix se porte sur des **phtalates qui soulèvent des inquiétudes tant en santé humaine qu'en santé environnementale**. Leur présence ubiquitaire dans les milieux mais aussi dans le matériel de laboratoire (notamment lors des procédures analytiques) complique toute expérimentation **nécessitant leur quantification à faibles doses**. Nous proposons d'évaluer dans ce cadre des phtalates mimant étroitement deux des phtalates les plus fréquemment rencontrés dans l'environnement : le di-n-butyl phtalate (DBP) et le di(2-éthylhexyl) phtalate (DEHP). Leurs caractéristiques structurales uniques permettront de les distinguer de tout autre phtalate susceptible d'être présent (milieux, biote, équipement analytique) tout en améliorant considérablement la limite de détection de ces composés en permettant un **couplage à un fluorochrome lors de l'étape finale de détection/quantification**. Ces composés seront obtenus par le biais de synthèses organiques originales.

Originalité et/ou caractère novateur du projet

Nous espérons lever les verrous caractéristiques de l'expérimentation avec les phtalates liés à leur présence ubiquitaire plus particulièrement dans le cadre de leur utilisation à faibles doses. En greffant un « hameçon alcyne » de très petite taille sur le DBP et DEHP, nous anticipons qu'il sera possible d'augmenter considérablement la limite de détection de ces composés tout en permettant de les distinguer de ceux inévitablement présents dans les échantillons testés et dans le matériel utilisé ce qui constitue une stratégie innovante jamais encore testée en (éco)toxicologie. Nous sommes conscients que la nature et la position du groupement « hameçon » pourraient affecter l'engagement de ces composés vis-à-vis des sites récepteurs hormonaux, et in fine ne pas être représentatifs des effets des phtalates modèles (DBP, DEHP). Les approches proposées permettront de répondre à cette interrogation et d'orienter le choix des molécules à évaluer.

Questions de recherche

PE 1 - Développement de méthodes permettant d'investiguer des mécanismes d'action (y compris épigénétiques).

PE 3 - Étude de la toxicologie des faibles doses et/ou de la relation dose/effet.

La compréhension des mécanismes d'action de phtalates (e.g. approches « omiques ») ne peut être pleinement abordée en absence d'informations sur la biodisponibilité, la bioaccumulation, l'organotropisme et le métabolisme de ces composés. Ces dernières ne peuvent être accessibles en absence de méthodes de quantification simples à mettre en œuvre, sensibles et polyvalentes. L'approche méthodologique de quantification de phtalates modèles que nous proposons présente un intérêt novateur dans des domaines d'études pour lesquels il existe de verrous scientifiques liés à la quantification des phtalates : c'est particulièrement le cas lorsque les phtalates sont évalués dans cadre d'études des mécanismes d'action sur les modèles biologiques à faibles doses représentatives des milieux contaminés.

Description des méthodes mises en œuvre

Synthèse et validation des analogues synthétiques en tant que perturbateurs endocriniens (PE) représentatifs de phtalates - Cette étape initiale (6 mois) vise à démontrer que les analogues du DBP et DEHP synthétisés par l'équipe 2 (aDBP, aDEHP) seront effectivement capables d'induire des réponses biologiques de type PE. Nous utiliserons pour cela une panoplie de lignées cellulaires reporter permettant de mettre en évidence l'interaction de ligands agonistes et/ou antagonistes avec des récepteurs nucléaires de *Danio rerio* caractéristiques de PE (prestation de service) que nous comparerons aux DBP et DEHP. Il s'agit des récepteurs nucléaires de *D. rerio* (ERα, Erb1 &2, AR, PPARδ, PPARγ, PXR) dont l'interaction avec des phtalates est établi. Dans le cas où aucune analogie en termes d'effets n'apparaîtrait clairement, cette approche comparative pourra être élargie à d'autres phtalates afin de préciser de quel(s) phtalate(s) PE les composés aDBP et aDEHP sont in fine les proxys en termes de critères d'effet à l'aide des lignées reporter.

Après cette validation in vitro (3 mois), des expériences in vivo seront réalisées afin de valider son utilisation en écotoxicologie. Le poisson zèbre *D. rerio* est couramment utilisé en toxicologie environnementale et il existe des tests normalisés de toxicité aiguë et chronique chez l'embryon et l'adulte. Ceci accroît l'intérêt du développement de méthodes de quantification de phtalates afin par exemple de faire le lien entre toxicité et concentrations effectives. La validation in vivo (3 mois) se fera lors d'exposition (aDBP, aDEHP) d'embryons particulièrement sensibles aux perturbations par les PE et parallèlement aux phtalates de référence (DBP, DEHP ou autres). Les critères d'effets retenus sont ceux associés aux PE (e.g. vitellogénine, acyl coenzyme A oxydase 1). Les résultats obtenus à l'aide des lignées cellulaires reporter contribueront aussi à définir le choix des biomarqueurs d'effet in vivo.

Exposition embryo-larvaire et évaluation de la nouvelle méthodologie d'étude de la bioaccumulation et du métabolisme de phtalates in vivo - Nous procéderons alors aux expérimentations de bioaccumulation et de métabolisme du aDBP et aDEHP (12 mois). Les larves seront exposées préférentiellement à des concentrations représentatives de concentrations environnementales des phtalates de référence (jusqu'à au maximum plusieurs dizaines de µg/L et 5 jours post-fécondation). Ces proxys de phtalate PE portent un « hameçon alcyne » de petite taille qui autorisera le couplage spécifique d'un fluorochrome par chimie « bio-orthogonale », lors de l'étape finale de quantification (LC-MS, HPLC en détection de fluorescence) à partir des larves ainsi que dans les milieux d'exposition. Ceci permettra d'évaluer leur bioaccumulation ainsi que leur métabolisme de détoxification. Une comparaison avec les méthodologies classiques de détection des phtalates (notamment LC-

MS) sera réalisée selon le même protocole mais en présence de DBP et MBP pour montrer en quoi l'approche que nous proposons pourrait être beaucoup plus robuste que les méthodes actuelles et comment elle permettrait de lever ainsi les verrous liés aux difficultés de quantification pour les phtalates.

Partenariat

CNRS - Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux

Responsable de l'équipe : M. Eric Battaglia

CNRS - Laboratoire Conception et application de molécules bioactives

Responsable de l'équipe : M. Alexandre Specht

Résumé **COGEN'AIR** - 2024_EST_243

Contribution à la co-construction d'un indicateur de gêne liée au bruit du trafic aérien

Mme Fanny Mietlicki
Bruitparif 32 boulevard Ornano - Saint-Denis

Etude de faisabilité - 24 mois
Budget : 49 999 € TTC

Objectif détaillé

Le projet COGEN'AIR vise à réaliser une étude de faisabilité d'élaboration d'un nouvel indicateur de gêne liée au bruit du trafic aérien en associant les riverains de trois secteurs survolés en Île-de-France. Il s'agira d'élaborer une méthodologie de sélection des sites pilotes et de recrutement des participants, puis de développer et mettre en œuvre un protocole de recueil des données et enfin d'analyser les résultats et de proposer une méthode de calcul de l'indicateur. L'indicateur sera ensuite expérimenté en opérationnel et sa pertinence discutée par l'intermédiaire de focus groups organisés avec les participants à l'étude sur chacun des secteurs retenus.

Originalité et/ou caractère novateur du projet

La réglementation en vigueur relative au bruit des aéronefs s'appuie principalement sur des indicateurs acoustiques dit « énergétiques » agrégés sur une année entière. Ce type d'indicateur traduit mal les critères d'intensité et de répétitivité des pics de bruit spécifiques au trafic aérien et ne distingue pas les différentes configurations de survol des populations. Le débat public autour des questions de nuisances sonores aéroportuaires se cristallise donc souvent autour de la remise en cause de ces indicateurs qui sont jugés inaptes à traduire la gêne des populations survolées, notamment dans un contexte d'augmentation du trafic aérien.

Dans ce contexte, un groupe de travail réunissant des membres du Conseil National du Bruit (CNB) et de l'ACNUSA a été mis en place afin de formuler des préconisations relatives à l'introduction de nouveaux indicateurs de bruit aérien dans la réglementation. En tant que membre de ce groupe de travail, Bruitparif a suggéré d'étudier le principe d'un compteur d'événements sonores à points qui s'inspire des indicateurs déjà existants de type NAX (nombre d'événements sonores ayant généré un niveau de bruit maximal sur 1 seconde qui dépasse un seuil X en décibels) mais en s'affranchissant de l'effet de seuil qui est un inconvénient à leur utilisation. Il s'agirait de réaliser un décompte du nombre de survols en pondérant chaque survol en fonction du niveau de gêne instantanée qu'il est susceptible de générer chez les riverains. Ce décompte pourrait être fait de manière distincte en fonction des périodes de la journée (jour, soirée, nuit), des types de jour de la semaine (jour de semaine/ jour de week-end) et des saisons (hiver/été) afin de tenir compte des différences de sensibilité au bruit sur ces différentes périodes, puis être agrégé à un niveau annuel.

Pour avancer sur la faisabilité de développement d'un tel indicateur et conforter sa pertinence, le projet COGEN'AIR propose de réaliser une étude pilote sur trois secteurs survolés sélectionnés en Île-de-France, en y associant à chaque fois une trentaine de riverains.

L'originalité de COGEN'AIR repose essentiellement sur trois aspects :

- L'approche novatrice consistant à proposer un indicateur de type compteur d'événements sonores à points.
- La notation de survols d'aéronefs et la mise en relation avec les mesures de bruit généré par les survols d'aéronefs, cette méthodologie n'ayant jamais été réalisée en France, in-situ, pour évaluer la gêne instantanée du bruit lié au trafic aérien.
- L'association des riverains survolés à la co-construction d'un nouvel indicateur de gêne liée au bruit du trafic aérien, cette méthodologie n'ayant jamais été mise en œuvre en France.

Questions de recherche

NSON 1 - Évaluation des effets extra-auditifs pour la population générale et/ou les travailleurs (par exemple pathologies respiratoires, chronobiologie et perturbations du sommeil, risque cardiovasculaire, apprentissage scolaire, communications sociales) ainsi que pour les écosystèmes.

QT 1 - Recherche sur les contributions citoyennes et mobilisations sociales (savoirs profanes, épidémiologie populaire, lancements d'alerte, veille scientifique, dispositifs de vigilance, actions de mitigation des impacts, recherches et expertises participatives)

- *participation aux processus d'expertise et à la production de connaissances, y compris dispositifs de surveillance, en santé-environnement,*
- *participation aux processus de prévention et de gestion des crises sanitaires et environnementales, dont les épidémies de maladies infectieuses,*
- *nouvelles formes de mobilisation (production et usage des données, mobilisation de l'open data, mesures réalisées par des citoyens, sujets émergents...).*

Le projet vise à faire progresser la connaissance des indicateurs les plus appropriés pour caractériser les effets extra-auditifs du bruit généré par le trafic aérien, au premier rang desquels figure la gêne et s'inscrit donc dans la question à la recherche NSON 1. Il repose pour sa mise œuvre sur la participation de citoyens ainsi que sur la mobilisation de méthodes de recherche qualitative issues des sciences humaines et sociales (focus group), et relève donc également de la question à la recherche QT 1.

Description des méthodes mises en œuvre

Cette étude comportera différentes étapes :

1) La préparation de l'étude (mois 1 à 4) qui visera à :

- a. Sélectionner trois sites pilotes en Île-de-France au sein de secteurs bénéficiant d'une station permanente de mesure du bruit des aéronefs exploitée par Bruitparif depuis plusieurs années et répondant à des typologies d'exposition au bruit aérien variées. Les sites seront situés à proximité des deux grands aéroports franciliens et d'un aérodrome.
- b. Réaliser le recrutement des participants parmi les riverains des sites pilotes.
- c. Mettre au point les outils pour le recueil des données.

2) Le recueil des données (mois 5 à 8) par l'intermédiaire de la passation d'un questionnaire général permettant de caractériser la gêne de long terme ressentie par les participants en lien avec leur exposition au bruit des aéronefs, d'un questionnaire intermédiaire destiné à recueillir de manière quotidienne des informations sur la gêne de moyen terme (par exemple sous la forme d'un budget espace-temps) et de la consignation

par les participants lors de différentes sessions de notation, de leurs niveaux de gêne instantanée lors des survols d'aéronefs.

3) L'analyse des données recueillies (mois 9 à 12) en mettant en œuvre des modèles de régression, afin de déterminer le descripteur acoustique associé aux survols d'aéronefs qui apparaît le mieux corrélé à la gêne instantanée. Cette phase visera également à déterminer les pondérations qui pourraient être appliquées pour tenir compte des différences de sensibilité au bruit selon les périodes.

4) L'élaboration du modèle de calcul du nouvel indicateur de compteur d'événements sonores à points (mois 13 à 16) à partir des résultats de la phase 3.

5) L'expérimentation (mois 17 à 20) de l'indicateur de compteurs d'événements sonores à points avec la production opérationnelle de celui-ci durant quatre mois au sein des sites pilotes et son calcul a posteriori sur l'historique des données de mesure de bruit disponibles. Cette phase s'achèvera avec l'organisation de focus groups avec les participants à l'étude sur chacun des sites afin de partager les résultats de l'indicateur et de recueillir l'appréciation des riverains quant à sa pertinence à bien traduire leur gêne liée au bruit aérien.

6) Une phase finale (mois 21 à 24) qui sera consacrée à faire une synthèse du déroulement du projet et des résultats obtenus et à dresser le bilan de l'étude de faisabilité. En cas de bilan positif, des préconisations seront faites pour la réalisation d'une étude à envergure plus large permettant de valider le nouvel indicateur proposé.

Partenariat

BRUITPARIF - Pôle Études

Responsable de l'équipe : Mme Fanny Mietlicki

Résumé COMBITAC - 2024_EST_201

Effets combinés de contaminants environnementaux sur la truite arc en ciel – Impacts éco-toxicologiques et sanitaires

M. Rémy Michel
CEVA 83 Presqu'île de Pen Lan - Pleubian

Projet complet - 36 mois
Budget : 194 238 € TTC

Objectif détaillé

Les poissons sont exposés à différents types de contaminants, qu'ils soient de nature microbiologique ou chimique, et d'origine naturelle ou anthropique. Selon leurs caractéristiques, ces contaminants peuvent avoir un impact plus ou moins important sur leur état de santé global, en altérant certains processus physiologiques. En complément de ces considérations éco-toxicologiques, l'accumulation dans ces produits alimentaires de contaminants susceptibles d'affecter la santé humaine revêt un enjeu sanitaire majeur. Malgré les phénomènes de multi-exposition, l'étude de ces contaminants se fait généralement de manière individuelle (par type de contaminant). Au travers de ce projet, nous souhaitons nous intéresser à l'interaction entre trois types de contaminants présents dans le milieu naturel et à leur impact sur la truite arc-en-ciel (TAC, *Oncorhynchus mykiss*), modèle d'étude en écotoxicologie et espèce économiquement pertinente. Les microcystines (MC), cyanotoxines les plus courantes dans les eaux douces et connues pour induire une hépato et repro-toxicité, présentent un risque avéré pour l'homme et la faune. Le virus de la nécrose hématopoïétique infectieuse (vNHI) est un pathogène majeur de la TAC chez qui il induit de multiples signes cliniques et des mortalités élevées. Le tébuconazole (TBZ) est un fongicide largement utilisé en agriculture et présent dans les masses d'eau continentales, avec des propriétés de perturbateur endocrinien bien documentées.

Originalité et/ou caractère novateur du projet

Si l'impact du couple virus / contaminant chimique a été testé chez la TAC sur des composés de différentes natures, très peu de données sont disponibles concernant des multi-expositions complexes, situation pourtant représentative de la réalité des écosystèmes aquatiques. Les données de la littérature semblent indiquer que l'exposition aux chimiques augmenterait la susceptibilité aux pathogènes mais l'étude de la relation inverse et de co-expositions mérite également d'être investiguée. Outre le caractère novateur du choix du couple vNHI / MC / TBZ, nous produirons au travers de ce projet des données originales concernant les capacités d'accumulation et d'élimination des MC chez trois populations de TAC : saine, infectée par le virus de la NHI et exposée au TBZ. La prise en compte de ces phénomènes de multi-exposition est une approche importante permettant de prendre la pleine mesure de l'impact de co-contaminants sur un écosystème et sur la santé humaine et s'inscrit dans la démarche d'évaluation des risques.

Questions de recherche

ACHIM 3.3 - Prise en compte et caractérisation des multi-expositions et co-expositions en lien avec l'exposome : impacts des co-expositions à des agents microbiologiques et chimiques sur la santé humaine et les écosystèmes.

PE 4 - Étude des effets cocktails.

ABIO 5 - Impacts des co-expositions à des agents microbiologiques et chimiques sur la santé humaine et les écosystèmes.

L'environnement aquatique se caractérisant par la présence concomitante de différents types de contaminants, l'évaluation de l'effet de multi-expositions est particulièrement pertinent pour mesurer les impacts écotoxicologique et sanitaire dans ce type d'écosystème. En nous intéressant aux effets induits par une exposition complexe vNHI et/ou MC et/ou PE de la TAC, nous apporterons des éléments de réponse aux questions ABIO5 de la thématique « Agents biologiques », ACHIM 3.3 de la thématique « Agents Chimiques » mais également à la question OPE4 de la thématique « Perturbateurs Endocriniens ». L'approche expérimentale choisie permettra de déterminer si la co-exposition a un effet aggravant sur l'état de santé de la TAC, en intégrant une estimation du risque sanitaire pour l'homme lié à l'accumulation des MC dans le poisson.

Description des méthodes mises en œuvre

1. Préparation des contaminants

Le vNHI sera produit par inoculation de cellules EPC (Epithelioma Papulosum Cyprini) à 14°C. Une fois le tapis détruit, le surnageant de culture centrifugé sera titré selon la méthode de Kärber et le stock viral conservé à -80 C. *Microcystis aeruginosa* sera cultivée dans les conditions optimales de croissance et de production de toxines en colonnes de 120L jusqu'à atteindre les concentrations cibles en densité cellulaire et en MC pour les expérimentations d'exposition des TAC, de 0,2 à 2.10x6 cellules/mL et de 20 à 40 µg/L, respectivement. Les teneurs en MC seront évaluées au cours du temps par le biais de kits Elisa. La densité cellulaire sera suivie par comptage. Une solution stock de TBZ en suspension sera diluée extemporanément pour obtenir la concentration d'exposition souhaitée.

2. Exposition des truites aux contaminants

Les TAC juvéniles seront exposées à différentes combinaisons de contaminants, soit en cascade (TBZ puis MC ou vNHI ; MC puis TBZ ou vNHI ...), soit un simultané. Les conditions d'exposition seront ajustées sur la base de pré-tests. La MC sera donnée par voie alimentaire, le TBZ sera directement dilué dans l'eau (circuit fermé pendant 1h puis renouvellement d'eau avec prélèvements à différents temps afin de calculer la concentration d'exposition réelle moyenne) et l'infection au vNHI sera faite par balnéation de 3 heures avec 10E5 TCID50/mL de virus. Des truites non exposées et exposées de manière unitaire aux 3 contaminations serviront de témoins.

3. Cinétiques d'accumulation et d'élimination des MC chez les poissons

Des études d'exposition en conditions contrôlées seront menées afin d'établir les cinétiques d'accumulation et d'élimination des MC dans les organes clés des poissons (muscle, foie) chez les populations contrôles, exposées aux MC seules et co-exposées (alternance / co-exposition MC /vNHIet/ouTBZ). Elles comprendront l'évaluation des teneurs en MC libres et liées, lors des phases d'accumulation (7 jours) et de dépuración (21 jours) par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse basse résolution (LC-LRMS) et

la recherche des métabolites lors de la phase d'élimination par des approches non ciblées en spectrométrie de masse haute résolution (LC-HRMS).

4. Evaluation de l'état de santé des poissons après expositions multiples ou co-expositions

Outre la mortalité quotidienne, différents paramètres seront suivis en cinétique chez les TAC mono-exposées (vNHI, TBZ, MC) ou co-exposées : charge virale (culture cellulaire / RTqPCR), réponse immunitaire innée (formulation sanguine, phagocytose, complément, ...) et spécifique (anticorps anti-vNHI), défenses anti-oxydantes (dosages SOD, GT, ...).

Partenariat

CEVA - AQUAS

Responsable de l'équipe : M. Rémy Michel

ANSES - PBM

Responsable de l'équipe : M. Ronel Biré

ANSES - VIMEP

Responsable de l'équipe : M. Thierry Morin

Résumé COOLCOGNIRS - 2024_EST_146

Effet du port d'une veste refroidissante en condition chaude sur les réponses physiologiques et cognitives chez l'homme et la femme

M. Olivier Dupuy

Université de Poitiers - Faculté des Sciences du Sport - Poitiers

Projet complet - 24 mois

Budget : 149 656 € TTC

Objectif détaillé

Malgré un nombre croissant de femmes et de personnes plus âgées exposées à des contraintes thermiques chaudes dans le cadre de leur activité professionnelle, la compréhension de la thermorégulation de ces groupes d'individus et les effets d'un refroidissement corporel en condition chaude sur leurs performances physiques et/ou cognitives sont limités. Pour répondre à cette problématique, ce projet s'organise autour de deux objectifs principaux : 1) évaluer l'efficacité d'une veste de refroidissement (VR) lors d'un exercice physique en condition chaude et humide pour des sujets féminins en la comparant à des sujets masculins d'un même groupe d'âge et 2) évaluer cette même efficacité pour des participants et des participantes plus âgés, mais encore actifs professionnellement.

Originalité et/ou caractère novateur du projet

Bien que les premiers développements des VR remontent à plus de 50 ans, la recherche sur l'optimisation et l'usage efficace de ces systèmes s'est intensifiée dans la dernière décennie. Cependant, les études effectuées sur l'évaluation de ces vêtements chez des sujets humains ont majoritairement inclus de jeunes sujets masculins (18-45ans). L'absence de diversité dans les caractéristiques des sujets (notamment le groupe d'âge et le sexe) pour le même type de VR peut induire un biais concernant les résultats présentés dans la littérature. Certains travaux récents suggèrent qu'en raison de différences physiologiques et de perception de confort chez les hommes et les femmes, la diversité entre les sexes doit être prise en compte dans la conception des VR. Aujourd'hui la littérature sur la thermorégulation féminine est encore pauvre alors qu'elle est d'une importance capitale. Les résultats d'une étude exhaustive financée par l'Institut de recherche Robert Sauvé en santé et en sécurité du travail (Montréal, Canada) sur les moyens de gestion thermique intelligente dans les équipements de protection individuelle confirment que les conclusions des études sur les VR, pourtant très nombreuses, restent à confirmer dans des conditions d'exploitation réelles et avec d'autres populations concernant le sexe des participants et la moyenne d'âge. Également, bien que les effets de ce type de veste semblent efficaces sur plusieurs paramètres physiologiques, les effets sur nos performances cognitives ne sont pas clairs. De plus, étant donné que la thermorégulation féminine présente des particularités par rapport à celle des hommes, l'hypothèse de recherche tend à indiquer que l'utilisation d'une VR lors d'un exercice physique dans des conditions chaudes et humides aura également un impact bénéfique, mais néanmoins différent de l'impact observé chez les hommes d'un même

groupe d'âge. Des différences devraient également être observées entre les participants plus âgés.

Questions de recherche

CCLIM 1.1 - Impacts du dérèglement climatique sur la santé humaine, incluant les impacts sur la santé mentale, et des écosystèmes : impacts directs liés aux variations extrêmes de température (conséquences sanitaires immédiates et à long terme, en particulier sur les populations vulnérables et les travailleurs).

CCLIM 1.1 est la question de recherche la plus en adéquation avec ce projet. En effet, elle s'intéresse aux impacts directs liés aux variations extrêmes de température, dans un contexte de dérèglement climatique, et en particulier aux conséquences sanitaires sur les travailleurs. Les contraintes thermiques chaudes sont courantes en milieu professionnel, particulièrement pour les activités extérieures, dans une ambiance climatique où la moyenne des températures estivales ne cesse d'augmenter et les épisodes de canicule sont plus fréquents et plus intenses. L'exposition à des températures élevées induit des risques pour la santé des travailleurs comme l'épuisement, le coup de chaleur, la déshydratation ou les crampes. De plus, les conditions environnementales chaudes peuvent également avoir des effets négatifs sur les fonctions cognitives et une diminution de la productivité. Ces altérations ont un impact considérable sur la capacité des travailleurs à réaliser leurs tâches dans des conditions sécuritaires, car elles augmentent le risque de blessures et d'accidents du travail.

Cette exposition à des contraintes thermiques chaudes est exacerbée par la combinaison de la chaleur métabolique due au travail physique. Afin de protéger les travailleurs et les travailleuses à ces contraintes environnementales, des stratégies de dissipation de la chaleur existent. Des VR ont été conçus afin d'apporter une méthode efficace pour refroidir le corps dans des environnements chauds. En se basant sur un refroidissement micro-climatique axé sur la régulation de la température de la surface du corps, les VR ont été conçus afin de favoriser l'échange thermique du corps avec l'environnement. La première question de recherche consiste à vérifier si ce type de veste permet l'amélioration des fonctions cognitives du travailleurs en condition chaude, la seconde à savoir si les hommes et les femmes répondent de la même manière et enfin si l'âge modère les résultats précédents.

Description des méthodes mises en œuvre

La méthodologie employée a déjà été éprouvée lors d'un précédent projet financé par le Fonds de recherche du Québec - Nature et technologie (2015-MI-192784). Une campagne de mesure avec des participants humains sera réalisée dans une chambre climatique prévue à cet effet et maintenue à 30 °C et 60 % d'humidité relative. Il s'agira de vérifier l'impact du port d'une veste de refroidissement sur 1) la réduction du stress physiologique (fréquence cardiaque, consommation d'oxygène, oxygénation cérébrale et musculaire, température interne et de peau, pertes hydriques), 2) la perception du confort thermique, de l'effort physique et du bien-être et 3) l'amélioration des fonctions cognitives (tâches de prise de décision) de 60 femmes (30 entre 18 et 45 ans et 30 entre 45 et 65 ans) et 60 hommes (30 entre 18 et 45 ans et 30 entre 45 et 65 ans). Les participants effectueront avec une veste de refroidissement en mode MARCHÉ ou ARRÊT, un effort physique d'intensité similaire à une

charge de travail moyenne en conditions chaudes et humides. L'amélioration des capacités de récupération post-travail sera aussi étudiée.

La réalisation de ce projet est prévue sur une durée de 24 mois et sera pilotée par un chercheur postdoctoral soutenu par deux stagiaires de 1er ou 2e cycle. Les deux objectifs seront abordés en parallèle en commençant par une mise à jour de la littérature et le dépôt d'un dossier au comité d'éthique de la recherche clinique (4 premiers mois). Il s'agira ensuite de recruter les participants humains et de réaliser l'ensemble des tests qui vont s'échelonner sur un an environ. Les mois restants seront consacrés à finaliser les analyses de données et rédiger des articles scientifiques ainsi que le rapport final.

Partenariat

Université de Poitiers - Faculté des Sciences du Sport - Laboratoire MOVE (UR 20296)

Responsable de l'équipe : M. Olivier Dupuy

Université de Montréal - Ecole de Santé Publique - Département de santé environnementale et santé au travail

Responsable de l'équipe : M. Ludwig Vinches

Résumé CORSICA - 2024_RF_013

Effets combinés des RF à 26 GHz et de différentes radiations UV sur la peau et la cornée in vitro

Mme Emilie Puginier Pinet

Laboratoire IMS UMR5218 351 Cours de la Libération - Talence

Projet complet - 36 mois

Budget : 290 134 € TTC

Objectif détaillé

The objective of the CORSICA project is to investigate the in-vitro effects on human skin and eyes of the co-exposure between 5G modulated - radiofrequency fields (RF) at 26 GHz (at absorbed Power Density levels up to 10 W/m²) and ultraviolet (UV) radiations at different wavelengths (UV-A, UV-B, and solar)

(i) To assess the effects of a 26 GHz, 5G modulated signal alone or in combination with UV radiation on viability, reactive oxygen species (ROS) production and inflammation in skin and eye models

(ii) To assess the effects of a 26 GHz, 5G modulated signal alone or in combination with UV radiation on genotoxicity in 2D-3D skin models

(iii) To assess the effects of a 26 GHz, 5G modulated signal alone or in combination with UV radiation on irritation and muscin production (dryness) in cornea models

Originalité et/ou caractère novateur du projet

Over the past few decades, mobile telephony has experienced rapid deployment, with the introduction of the fifth generation (5G) beginning in 2020. In Europe, the initial frequency range selected for the introduction of 5G falls between 3.4 and 3.8 GHz. However, in the coming five years, the 26 GHz band, for which limited studies have been published, is scheduled for deployment.

The originality of the CORSICA project is to investigate, in vitro, the possible effects of a 5G signal at 26 GHz on the two main biological, superficial targets at such frequencies, that is the skin and in the eye, the cornea.

Moreover, there are few investigations of the effects of RF in combination with other exposures, and such studies do almost not exist using RF at 26 GHz. CORSICA will investigate the effects of a concurrent exposure of the human skin and cornea to RF and either solar, UV-B or UV-A radiations, also a routine occurrence in the daily life.

We find it very pertinent to study the possible interaction between RF exposure classified as a possible human carcinogen and UV and solar exposure categorized as a human carcinogen by the International Agency for Research on Cancer. Of note, high doses of UV radiation can have detrimental effects on the skin (burns) and the eye (photokeratitis), with sources including sunlight and artificial sources like UV lamps. Chronic exposures to UV radiation has the potential to inflict damage to the skin leading to tumor formation, as well as to the eye leading to cataract, and possibly to syndrome of Age-Related Macular Degeneration.

Questions de recherche

RFES 1.1 - Études in vitro, in vivo ou cliniques sur les mécanismes d'action de l'exposition (aiguë et chronique) du vivant aux radiofréquences, aux niveaux moléculaire et cellulaire, en tenant compte des évolutions d'utilisation de fréquences liées aux nouveaux usages et nouvelles technologies de communication. Les études s'intéressant aux bandes de fréquences nouvellement identifiées (pour la 5G par exemple) et encore peu étudiées (3,5 GHz, 26 GHz et au-delà, notamment) sont prioritaires.

RFES 1.5 - Études sur des modèles in vitro (de la peau, de la cornée, de la conjonctive, ...) de l'exposition aux fréquences supérieures à 10 GHz afin de mesurer des paramètres tels que la viabilité cellulaire et la génotoxicité, par exemple.

RFES 2.3 - Étude des effets des co-expositions aux radiofréquences se rapprochant des situations réelles d'exposition et permettant d'analyser l'effet combiné des radiofréquences et d'autres facteurs environnementaux (physiques ou chimiques) sur l'organisme.

CORSICA mainly aims to answer the questions RFES 1.1, 1.5, and 2.3.

RFES 1.1., RFES 1.5. Using 2D and 3D models of skin and cornea, we aim to evaluate the capacity of 5G RF signals at 26 GHz to participate in oxidative stress, inflammation, and cell death. We will address more biological endpoints in specific models such as genotoxicity for the skin models or mucin production for the cornea models.

RFES 2.3. Of note, 3D models are considered as an alternative for in vivo assays, in agreement with the 3R approach (Replace, Reduce, Refine), and provide models closer to the in vivo situation. CORSICA will investigate whether 26 GHz RF signals could alter the effects of UV radiation on ROS production and inflammatory response in skin and ocular models. To better understand the interaction between the two agents, we will test for different UV radiation (UV-B, UV-A, or solar UV) and for different RF exposure conditions (2 exposure and post-exposure timepoints, 3 RF exposure levels).

Description des méthodes mises en œuvre

The following models will be used :

- 2D skin cell cultures commercial (Lonza and Gibco).
- 3D Skin model will be obtained by Phenion (France).

The effects on viability (MTT), ROS production, inflammatory cytokines secretion (IL-1, IL-6, IL-8, etc by ELISA), epidermal architecture, apoptosis, DNA damage, antioxidant levels, protein oxidation / 8-oxoguanin levels will be followed at different time points post-irradiation. The T4 enzyme modified Comet Assay will be used for the detection of DNA damage including CPDs as the predominant form of DNA damage induced by UV-B.

- 2D cornea cell culture is commercial (ATCC), it is composed by normal human primary corneal epithelial cells.

- 3D models are either reconstructed cornea (Mattek) or cornea organoids. Cornea organoids are obtain from IMR-90.4 iPSC cells maintained by clonal propagation on growth factor-reduced Matrigel® in mTeSR1 medium under hypoxia.

The effects on viability, ROS production (flow cytometry), inflammatory cytokines secretion, antioxidant levels, apoptosis, and protein oxidation (Western blot) will be followed at different time points. Specific tests for mucin secretion (at the protein and gene levels) will be performed on 3D reconstructed cornea.

For all biological endpoints, positive (exposure to UV or chemicals) and negative (Sham-exposure) controls will be provided and data will be obtained on coded samples.

The first 10 months of the project will be devoted to setting all cellular models and their dosimetric characterization at 26 GHz and with the different supports for cell cultures, organoids, and reconstructed tissues. Experiments on the skin and the cornea will be performed in parallel in the two laboratories over the next 26 months, allowing for the exchange of setup or cell models, if needed. Indeed, the CORSICA consortium federates two teams internationally recognized as for their expertise in UV radiation bioeffects and/or in bioelectromagnetics, thus providing synergistic state-of-the-art technical competences. The possibility to exchange exposure setup and the capability to perform combined exposure to UV radiation leads to a strong added value component. The CORSICA research team will thus be composed of 5 researchers, 3 engineers and 2 technicians.

Partner 1: Bioelectronics team of the IMS laboratory - UMR 5218 CNRS (Bordeaux, France): cell culture facility, RF exposure setups, UV irradiator, biological tests, electronics and signal analysis, experimental dosimetry. Specifically, the in vitro 26 GHz exposure setup, a triple reverberation chamber, is currently designed within the RF Skin-UV project. The dosimetric characterization (simulations) of the exposure setup will be subcontracted to XLim (Limoges, France).

Partner 2: National Center for Public Health and Pharmacy (NCPHP), Unit of Non-Ionising Radiation (Budapest, Hungary): cell culture facility, UV irradiators, solar simulator SOL-500. Specifically, the 26 GHz exposure system consists of a horn antenna associated with RF devices in a box covered with an absorbing material.

Partenariat

CNRS - IMS

Responsable de l'équipe : Mme Emilie Puginier Pinet

National research institute for radiobiology and radiohygiene - Department of non ionising radiation

Responsable de l'équipe : M. Georges Thuroczy

Résumé CulexResist - 2024_EST_163

Surveillance de la résistance aux insecticides chez les moustiques du genre Culex en France

M. Haoues Alout
CIRAD UMR ASTRE - Montpellier cedex 5

Projet complet - 36 mois
Budget : 199 647 € TTC

Objectif détaillé

Mosquitoes of the Culex genus are globally spread in the tropical and temperate regions of the world and are the main vector of the emerging and re-emerging arbovirus, such as West Nile and Usutu viruses. They represent a problem for animal (equine and avian) health and conservation. Indeed, epizootic outbreaks have been more frequent since 2015 and caused significant declines in the populations of wild birds, and can lead to the loss of some emblematic species, such as strigiforms (rapace, chouette), particularly in zoos. WNV can also result in horse mortality and both viruses can cause neuroinvasive infections in humans. In metropolitan France, two members of the Culex pipiens complex coexist and hybridize: Cx. pipiens, Cx. molestus and their hybrid; while in the French overseas territories Cx. quinquefasciatus (another member of the complex) and Cx. nigripalpus are the main vector for WNV and USUV. These species have distinct ecological and overlapping ecological niches: Cx pipiens and nigripalpus are found in rural/natural area while Cx. molestus and quinquefasciatus are found in urban area. These widespread vectors have been controlled with insecticides since several decades to reduce the nuisance from their bites. The massive use of insecticides for mosquito and agricultural pest control have selected for resistant individuals, which carry one or several mutations that allow them to survive lethal doses. Nowadays, mosquito control in France relies only on two insecticides: Bti for larval control and deltamethrin against adult mosquitoes only during arboviral outbreaks. The referral 2020-SA-0029 of the ANSES proposed an integrated plan of resistance surveillance to monitor and prevent or slow down insecticides resistance in mosquito vectors but also highlighted the lack of data on the resistance status for Culex mosquitoes in the French territories.

The aim of this project is to fill this gap and will focus on three objectives: (1) to monitor the distribution the resistance mechanisms to the different insecticide families currently used or banned for Cx. pipiens spp in metropolitan France, and Cx. quinquefasciatus and Cx. nigripalpus in overseas territories; (2) assess the dynamics of resistance alleles between populations and species; and (3) assess the impact of urbanization on the distribution of these alleles in diverse landscapes.

Originalité et/ou caractère novateur du projet

In order to establish a plan to manage insecticide resistance as part of the vector-borne disease epidemic prevention, it is necessary to have knowledge of the mechanisms of resistance present in a given region and their frequency. Unlike Aedes mosquito, for which

insecticide resistance is monitored, very little work has been done on the insecticide resistance status of *Culex* mosquitoes as they are mainly vector of enzootic arbovirus. Using the most advanced sequencing technology, we will be able also to characterize the dynamic of several insecticide resistance alleles in several populations/species altogether. Analyzing the shared polymorphisms in resistant alleles among populations will allow to assess whether gene flow occurs between distant populations of the same species or between species. Such data will be valuable to vector control operators to mitigate the spread of insecticide resistance.

Questions de recherche

LAV 1 - Vecteurs & santé animale ou végétale : biologie, écologie, distribution et surveillance des vecteurs, relation hôte-pathogène, détection d'agents pathogènes, résistance.

This project will provide vector control operators, as well as public and veterinary health experts, with up-to-date data on the expected vector control efficacy. It will allow for the consolidation of surveillance system and prevention of disease transmission by providing complementary knowledge and expertise. This project thus **matches the priority theme "Vecteurs d'agent pathogènes et lutte anti-vectorielle"** and the question **"Vecteurs & santé animale ou végétale"**.

Description des méthodes mises en œuvre

Three rural/urban transect will be chosen in the Mediterranean coast, in La Réunion, and in Guadeloupe and will be split in three zones along the urban/rural gradient. In each zone, two localities will be selected for sampling mosquito populations. To avoid the sampling for sibling individuals, in each population, mosquito larvae will be sampled from five breeding sites (gutters and organic matter rich ponds). Then insecticide resistance will be monitored in a total of 18 populations. Part of the sampled larvae will be kept alive and reared for insecticide susceptibility tests on larvae and adults (bioassays, obj 1), while another part will be preserved in 70° alcohol for DNA analysis (obj 2 and 3). Mosquito larvae will be identified as belonging to the *Culex* genus.

Obj 1: Larval bioassays will be carried out using WHO protocols to rapidly and inexpensively assess the presence of resistance to a given insecticide family. 20 third instar larvae per replicate will be exposed to diagnostic doses corresponding to concentrations recommended to kill 100% of susceptible individuals: Dieldrin (CD): 0.01 g/l, Temephos (OP): 0.0003 mg/l, Chlorpyrifos (OP): 0.003 mg/l and Bti (200 µg/ml). Adult bioassays will be achieved using the WHO tube test with papers impregnated with deltamethrin (0.03% and 0.06%). As a control, groups of larvae/adult of the reference susceptible Slab strain will be exposed to the same insecticides. Mortality will be recorded 24 h after exposure and 3 replicates of each bioassays will be analyzed.

Obj 2: On surviving mosquitoes, we will use various well-established PCR assays to determine the main target mutations associated with resistance in *Culex* mosquitoes. For acetylcholinesterase modifications (ace-1 locus, OP and CX resistance), we will use the tests described by Weill et al. (2004) and Alout et al. (2007) for the G119S and F290V mutations, respectively. For changes in voltage-gated sodium channels (kdr mutations, PYR and DDT resistance), we will use the test described by Martinez-Torres et al. (1998) for the L1014F mutation. Finally, for GABA receptor modifications (Rdl locus, CD resistance), we use the test described by Tantely et al. (2010) for the A302S mutation.

Obj 3: For alcohol preserved mosquitoes, DNA will be extracted and targeted amplicon sequencing will be implemented for Culex mosquitoes and performed on target-site resistance genes according to the method described in (Albin et al. 2023). These data will be used to compute the allelic frequencies at each locus and second to assess the polymorphism associated with resistant mutations and infer the single or multiple origin of resistance, and to understand gene flow between populations.

Partenariat

ASTRE - Vecteur

Responsable de l'équipe : M. Haoues Alout

ISEM - EVAS

Responsable de l'équipe : M. Pierrick Labbé

PIMIT - DySIIs

Responsable de l'équipe : Mme Célestine Atyame Nten

Résumé Eat2AL - 2024_EST_014

Exposition à long terme à deux additifs alimentaires riches en aluminium (Al), le carbonate de calcium E170 et le pigment nacré d'aluminosilicate de potassium (INS176ii) : évaluation de la toxicité chronique sur les fonctions immunitaires et cognitives chez la souris, effets dose-réponse et conséquences en mélange

M. Eric Houdeau

INRA UMR 1331 Toxalim - Toulouse cedex 3

Projet complet - 36 mois

Budget : 199 925 € TTC

Objectif détaillé

Calcium carbonate (CaCO_3) is an anti-caking food additive (E170 in EU) also used as a white pigment, and a source of calcium for nutritional purposes, e.g., for fortified foods in infant formulae and as a dietary supplement in the general population. In July 2023, the European Food Safety Authority (Efsa) has re-evaluated the E170 for infants below 16 weeks of age. While the expert panel noted that there are no safety concerns as a source of Ca^{2+} , they claim that the unavoidable presence of Aluminium (Al) in its formula is of concern, and should be addressed regarding the total dietary Al intake in Human (Efsa 2023). Furthermore, E170 is also an alternative to food-grade titanium dioxide as a white colouring agent since the ban of E171 in EU (EC 2022). In addition, both French and EU food safety agencies agree on the presence of nanoparticles in the composition of E170 (ANSES 2020, Efsa 2023), which cannot be excluded due the formulation by grinding of the base limestone, or by precipitating free Ca^{2+} and CO_3^{2-} ions from the same source. Finally, concerns also relate to E170 ingested with other Al-containing food additives in their formulae, mainly the E554-559 series (sodium- or potassium- or calcium-Al silicate, and Al silicate) used quantum satis in many foodstuffs (Efsa 2008, 2020). Indeed, Al is neurotoxic, immunotoxic, and a materno-foetal passage occurs with cognitive and behavioural defects in animal studies (Efsa 2008). Extracted from limestone, CaCO_3 contains natural impurities, notably Al derived from clay minerals with a variable Al content (4-5%), linked to geo-origin. The (total) Al content reported in marketed E170 (65 samples) ranges from 11 to 720 mg Al/kg of additive (Efsa 2023), and its high solubility in gastric acids (95-100% at pH 3), makes E170 a significant contributor to total dietary Al intake in humans, i.e., about 50-100% to the weekly intake for which a tolerable weekly intake (TWI) of 1 mg Al/kg of body weight (bw)/week has been previously established. In addition, when considering additional Al-containing food additives, the widespread use of E555 (20% Al by molecular mass, at 0.3% soluble in gastric fluids but chronic; WHO 2011) as a carrier for E172 (iron oxide) and/or E171 (before its ban) for pearlescent effects (referred to as mica-based INS176, JECFA 2013) in foods and beverages, the overall Al dietary intake substantially exceed the TWI of Al, e.g., up to 300 fold in toddlers from the E555 use as carrier for E172 (Efsa 2020). To date, it is not possible

to conclude on the Al absorption and Al-related toxicity of these food additives that needs to be assessed in animal studies using relevant human levels of each of them.

The project Eat2AL aims to evaluate the fate of E170 and INS176ii (E555 coated with E172ii), alone and in mixture, and will explore whether Al from these ingredients given to mothers may favour neurodevelopmental and immune-related disorders in the progeny. We expect reliable scientific data to assist food safety agencies and public policy formulate recommendations on purity limits of E170 and INS176ii in Al content for a safe use in the general population, including developing children.

Originalité et/ou caractère novateur du projet

The novelty in Eat2AL lies in the ability to address the safety concerns recently highlighted by Efsa regarding the food additive E170, which has never been tested for toxicity as a source of Al that may contribute to substantially exceed the TWI for Al in the EU population (Efsa 2023).

In addition to a full description of the absorption, systemic fate and dose-effects of Al (immune- and nervous system-related, in comparison to Al Chloride (AlCl₃) as referent soluble Al) in mice chronically exposed to E170 via the diet, the originality of the Eat2AL project also lies in its ability to provide the first scientific data focusing on the group of E555-based pearlescent pigments. Indeed, E555 is mainly used as a component for pearlescent effects (146 of 151 products labelled with E555 in 2015-20: Mintel Global New Products Database) today considered as a new entity (INS176), which has not yet been evaluated as a food additive in accordance with EU regulations (Efsa 2020).

Questions de recherche

NANO 1 - Caractérisation, répartition et devenir, dans les compartiments environnementaux, des nanomatériaux auxquels sont exposés la population générale et les organismes vivants.

ACHIM 1 - Effets sur les écosystèmes et la santé humaine : notamment effets à faibles doses, effets cocktails et relation dose/effet.

ACHIM 3.2 - Prise en compte et caractérisation des multi-expositions et co-expositions en lien avec l'exposome : modèles in vitro et in vivo chez l'animal : développement d'indicateurs globaux « d'effets cocktail » d'une exposition chronique, identification d'espèces sentinelles, étude des effets synergiques et antagonistes des substances en mélanges.

ACHIM 1&3.2: Eat2AL will bring information on total Al intake from the food additives E170, and E555 coated with E172 (called INS176ii), alone (dose-effect) and in mixtures in the diet to study cocktail effects for a representative scenario in the human dietary exposome as sources of Al. All studies will be performed at human levels based on chronic exposure with **“Extended One Generation Repro-Toxicity Study” (OCDE EOGRTS)** and referent AlCl₃ to be relevant for food safety authorities.

NANO 1: Physicochemical characterisation of (nano)particles in these 2 additives from different commercial sources. Study of particle size of insoluble part in the gut lumen according to Guidance on (nano)risk assessment in food (Efsa 2021, ANSES 2022), and fate in systemic organs.

Description des méthodes mises en œuvre

YEARS 1&2 – Toxicokinetic of Al from E170 and INS176ii alone, and impacts on immune- and brain-related disorders compared to AlCl₃:

- Month 6: Physicochemical characterisation of Al-containing additives, i.e., % of Al in commercial samples (ICP-MS; P3) and particle size distribution (MET-EDX; P4).
 - Month 12: Implementation of EOGRTS in mice (P1&2) with standard diet vs. maximal human level for E170 and INS176ii in comparison to AlCl₃ at the TWI of Al or 10-fold above: assessment of i/ Al content in the foetus (Gestation day (G)18), mother milk (PND5-10), adult liver, spleen and brain (PND150) (P3), ii/ particle size measurement in foetal and F1 organs (MET-EDX; P4).
 - Month 14 (P1&2): i/ gut tolerance in basal conditions through inflammatory markers (cytokines, faecal Lipocaline-2), gut permeability (oral FD4), immune cell frequency (flow cytometry) at PND45 and 150, ii/ same endpoints in DSS-induced colitis (disease activity), iii/ behaviour/cognitive impairment at PND45 and 150 (Y-Maze test, Novel Object Recognition/Location tests), well-being (PhenoTyper), iv/ neuron populations and inflammation (hippocampus, prefrontal cortex) and activity (c-fos immunocytochemistry) at relevant time-points.
 - Month 24 (P1,2,3&4): Dose-response for E170 and INS176ii on relevant above endpoints.
- YEAR 3 – Effect of E170 plus INS176ii in mixture (one dose each from Year 2) on any relevant endpoints (P1&2) (Month 32), and assessment of Al accumulation/particle sizes due to cocktail exposure in foetal and F1 organs (P3&4) (Month 36).

Partenariat

INRAE - TOXALIM ENTéRisk

Responsable de l'équipe : M. Eric Houdeau

INSERM - Neurodol

Responsable de l'équipe : M. Frédéric Carvalho

LNE - Department for Biomedical and Inorganic Chemistry

Responsable de l'équipe : Mme Johanna Noireaux

Université de Rouen - Groupe Physique des Matériaux-GPM

Responsable de l'équipe : Mme Laurence Chevalier

Evaluation de l'impact des plastiques sur l'expression des gènes au cours du développement embryonnaire précoce chez l'humain

Mme Florence Eustache

APHP Hôpital Jean Verdier CECOS avenue du 14 juillet - BONDY

Projet complet - 36 mois

Budget : 199 888 € TTC

Objectif détaillé

Depuis plus de 45 ans, l'environnement des laboratoires de fécondation in vitro (FIV) ne cesse d'évoluer au fil des progrès scientifiques et techniques. En 2021, les enfants issus d'une Assistance Médicale à la Procréation (AMP) représentaient 3,7% des naissances en France. Mais les grossesses obtenues après transferts d'embryons sont plus à risque de pathologies placentaires et de petit poids de naissance. Une des évolutions majeures des pratiques en FIV est la généralisation de la culture prolongée (CP) permettant un développement embryonnaire in vitro jusqu'au stade de blastocyste au 5ème jour. Cette stratégie entraîne un allongement de l'exposition des embryons au même milieu dans des boîtes de culture en plastique à 37°C. Récemment, nous avons montré sur un modèle murin que l'utilisation de boîtes de culture en plastique entraîne des altérations massives de l'expression de plus de 1000 gènes placentaires avec un impact plus important chez les embryons femelles (Kouakou et al., 2023).

L'objectif principal sera d'évaluer chez l'humain 1/ l'impact des plastiques après CP sur le développement précoce de l'embryon avec l'analyse de l'expression de gènes, 2/ l'effet sexe, et 3/ de détecter la présence de perturbateurs endocriniens (PE) ou autres toxiques délivrés par les matériaux utilisés dans ces conditions de culture prolongée.

Originalité et/ou caractère novateur du projet

Afin de mimer la physiologie de l'implantation embryonnaire humaine, les embryons sont depuis 2015 mis en culture jusqu'au 5ème jour avant transfert intra-utérin. Cette CP des embryons se fait dans un milieu de culture commercial, sous huile, dans des boîtes en plastique sur un film hydrophobe à la température de 37°C, situation optimale pour la libération de molécules liposolubles connues comme PE, et ceci au moment épigénétiquement clé pour la mise en route du génome embryonnaire (4-8 cellules). Récemment, Togola et al. (2021) ont retrouvé la présence de Bisphénols au sein de boîtes en plastique utilisées pour la culture embryonnaire sans regarder les éventuelles conséquences sur l'embryon.

A l'heure actuelle, il n'existe pas de donnée systématique sur cette question dans la littérature internationale en dehors de notre travail effectué chez la souris récemment publié. Nous voudrions maintenant étendre ces données dans le contexte de l'espèce humaine. Notre laboratoire possède l'autorisation de travailler sur l'embryon humain. La mesure du niveau de ces PE ou autres toxiques dans le milieu de culture complétera le projet.

Questions de recherche

PE 1 - Développement de méthodes permettant d'investiguer des mécanismes d'action (y compris épigénétiques).

PE 4 - Étude des effets cocktails.

PE 7 - Construction d'outils pour relier expositions internes (imprégnation humaine) / expositions externes (Imprégnation environnementale) / impacts sanitaires (pathologies) en lien avec les perturbateurs endocriniens en vue notamment de construire des valeurs sanitaires de référence.

PE1 : L'évaluation agnostique des conséquences de l'exposition aux plastiques s'appuiera sur des approches transcriptomiques novatrices (Smart-Seq). Ces techniques permettront entre autre une compréhension approfondie des mécanismes d'action des PE sur le développement embryonnaire précoce.

PE4 : Il est probable que les boîtes en plastique utilisées libèrent simultanément différents PE. Nous évaluerons donc leurs effets combinés.

PE7 : Cette approche pourrait nous aider à établir des valeurs de référence pour le choix des boîtes utilisées, grâce aux mesures de concentration effectuées dans les milieux. À cette fin, une collaboration étroite avec l'équipe LABERCA a été établie. Si nos résultats sont confirmés, un lien pourrait être établi entre une exposition précoce aux PE et le risque de pathologie foeto-placentaire.

Description des méthodes mises en œuvre

Dans un 1er temps, nous mettrons au point sur embryons murins la dissociation cellulaire et les paramétrages nécessaires au séquençage ADNc de cellules uniques.

Ensuite, nous utiliserons des blastocystes humains donnés à la recherche pour la mise au point des approches techniques de dissociation cellulaire (isolement de chaque cellule après dissociation enzymatique du blastocyste dépellucidé). Puis des embryons J2 seront incubés après randomisation jusqu'au stade blastocyste soit dans des boîtes de culture en verre soit dans des boîtes en plastique. Des embryons issus de mêmes couples seront placés dans chaque condition dans le but de limiter les variations interindividuelles. Les blastocystes (J5) seront analysés par séquençage ADNc de cellule unique 'Smart-Seq', réalisant des banques de séquençage sur chaque cellule isolément et non sous forme de 'bulk' où les assignations à chaque cellule se réalisent a posteriori (chaque cellule isolée dans un micelle est en contact exclusif avec une bille couverte d'une séquence unique d'identification). L'approche 'Smart-seq' permet en outre d'obtenir une profondeur de lecture par cellule plus élevée que les approches bulk 'Chromium' conduisant à l'identification de transcrits rares (> 10000 / cellule). Cette profondeur permettra de classer les cellules par les approches de réduction de dimension classique (Uniform Manifold Approximation and Projection, UMAP) avec une très grande précision. Ainsi, notre projet permettra de caractériser les effets de la culture sur plastique par type cellulaire et non de façon globale. Des calculs de puissance nous ont permis de montrer que pour mettre en évidence des différences de l'ordre de 50% dans le niveau d'expression d'un gène donné, un minimum de 20 embryons cultivés en plastique et 20 en verre seront nécessaires. Des embryons humains sont disponibles conservés dans l'azote liquide : 120 embryons J2 et 80 blastocystes. Concernant l'effet du sexe, l'information sera disponible a posteriori grâce à l'analyse de séquençage ARN de cellule unique (transcrit de l'X inactivé XIST, exprimé chez les embryons XX exclusivement).

Parallèlement, les milieux de culture embryonnaire seront récupérés et stockés pour être analysés à la recherche de dérivés du plastique (bisphénols) par spectrométrie de masse/chromatographie en phase liquide (collaboration avec le laboratoire d'Etude des Résidus et Contaminants dans les Aliments).

La production des données de Smart-seq se fera en collaboration avec la plateforme génomique de l'Institut Cochin. L'analyse bioinformatique sera réalisée par la plateforme Genom'IC tandis que les interprétations biologiques seront menées par les responsables du projet ainsi qu'avec les chercheurs et ingénieurs bioinformaticiens de notre équipe de l'Institut Cochin.

Calendrier :

Mise au point de la technique sur le blastocyste de souris (1- 6 mois)

Récupération des embryons des différents centres d'AMP (7-8 mois)

Mise au point sur l'embryon humain (9-14 mois)

Mise en culture des embryons (15-21 mois)

Smart-Seq (22-28 mois)

Dosage des PEs : 8 mois

Analyses statistiques (29-31 mois)

Publications (31-36 mois)

Partenariat

INSERM - Institut Cochin, Des gamètes à la naissance : génomique, épigénétique et physiopathologie de la reproduction, U1016

Responsable de l'équipe : Mme Florence Eustache

INSERM - **Institut Cochin, plateforme Genom'IC, Destin, plasticité et reprogrammation cellulaire**

Responsable de l'équipe : M. Antoine Zalc

INRAE/Oniris - LABERCA, Laboratoire d'Etudes des Résidus et Contaminants dans les Aliments

Responsable de l'équipe : Mme Alicia Grivaud

Résumé EPiLEG - 2024_EST_240

Effet des Perturbateurs endocriniens sur LEGionella, bactérie **environnementale pathogène pour l'Homme**

Mme Ghislaine Descours

Centre National de Référence des Légionelles 103 Grande Rue de la Croix-Rousse - Lyon

Projet complet - 36 mois

Budget : 199 800 € TTC

Objectif détaillé

EPiLEG vise à étudier l'impact de trois perturbateurs endocriniens (PE), le triclosan (TCS) et deux phtalates, l'ATBC et le DBP, seuls et en association, sur la bactérie environnementale Legionella, agent de pneumonies sévères chez l'Homme.

Le projet permettra (i) de caractériser pour la 1ère fois la sensibilité d'une large population de légionelles à ces trois PE, (ii) d'identifier les réponses adaptatives de Legionella pneumophila (Lp) à une exposition prolongée à ces PE par évolution expérimentale et approche multi-omique et (iii) d'appréhender l'impact de ces PE sur divers paramètres de l'infection : prolifération de Lp, infectiosité pour les cellules humaines, réponse inflammatoire, sensibilité / tolérance de Lp aux antibiotiques (ATB).

Originalité et/ou caractère novateur du projet

Les PE regroupent un ensemble de composés chimiques interférant de façon délétère avec le système hormonal humain. Parmi eux, le triclosan (TCS), utilisé pour ses propriétés bactériostatiques, et les phtalates, assouplissants des plastiques, sont retrouvés dans de nombreux produits du quotidien : dentifrices, cosmétiques, textiles, emballages alimentaires... devenant des micropolluants environnementaux auxquels sont exposés les organismes vivants. L'évaluation de leurs effets directs et indirects sur la Santé représente ainsi un enjeu sanitaire majeur.

Lp est une bactérie intracellulaire qui colonise les environnements hydro-telluriques où elle est exposée à de faibles concentrations de PE (10⁻¹⁰ à 10⁻⁶ M). Après inhalation d'aérosols contaminés, elle infecte les cellules pulmonaires humaines, induisant une pneumopathie aiguë, la légionellose.

Le TCS possède une action antibactérienne directe en inhibant FabI, enzyme permettant la synthèse des acides gras et ainsi de la membrane cellulaire. Des mécanismes adaptatifs en réponse à une exposition au TCS sont décrits chez plusieurs espèces : mutations dans / en amont de fabI, surexpression chez E. coli et S. aureus, dérégulation d'efflux chez P. aeruginosa, parfois associés à une résistance croisée ou une tolérance accrue aux antibiotiques. Nos travaux préliminaires suggèrent un impact du TCS sur des régulateurs transcriptionnels globaux chez Lp (données non publiées, équipe 1). Les phtalates, sans posséder de cible bactérienne spécifique, induisent néanmoins une réponse bactérienne; chez Lp, une exposition de 24h au DBP et à l'ATBC à doses environnementales induit une augmentation des CMI de la lévofloxacine et des modifications de biofilm (publication

acceptée, équipe 2). Enfin, des études récentes suggèrent un effet pro-inflammatoire et une susceptibilité accrue aux infections pulmonaires liés à l'exposition à ces PE.

Lp étant naturellement exposée à de faibles concentrations de TCS et de phtalates dans son habitat naturel, les données de la littérature suggèrent un potentiel effet délétère de ces PE à la fois en amont et au décours de l'infection chez l'Homme. Dans ce contexte, le projet EPiLEG vise à évaluer les voies adaptatives de Lp en réponse à des expositions prolongées au triclosan, à l'ATBC et au DBP, seuls et en association, l'impact de ces PE sur la fitness bactérienne, l'infectiosité et la sensibilité de Lp aux ATB.

Questions de recherche

ACHIM 3.3 - Prise en compte et caractérisation des multi-expositions et co-expositions en lien avec l'exposome : impacts des co-expositions à des agents microbiologiques et chimiques sur la santé humaine et les écosystèmes.

PE 4 - Étude des effets cocktails.

ABIO 5 - Impacts des co-expositions à des agents microbiologiques et chimiques sur la santé humaine et les écosystèmes.

S'inscrivant dans le concept « One Health », le projet EPiLEG permettra d'évaluer l'impact de trois PE (triclosan, ATBC, DBP) présents dans l'environnement, seuls et en association, sur Lp. Reliant les thématiques de micropollution environnementale et de Santé humaine, les résultats permettront d'appréhender les enjeux sanitaires liés à l'impact de ces PE sur Lp dans son habitat naturel et en situation infectieuse chez l'Homme.

Description des méthodes mises en œuvre

Tâche 1 (9 mois). Sensibilité et réponse adaptative de Lp au TCS, à l'ATBC et au DBP.

La sensibilité de 150 souches environnementales et cliniques représentatives de la diversité génétique de Legionella sera évaluée. Les PE seront testés seuls et en association par microdilution. Les effets d'une exposition à long terme à ces 3 PE, seuls et en association, seront simulés par évolution expérimentale. Une évolution indépendante de 8 lignées (Lp « Paris ») par PE / association de PE sera menée sur 20 passages (3 mois) à concentration sub-inhibitrice (10⁻⁸ M) stable et croissante en fonction de l'adaptation de Lp. Un séquençage des génomes (Whole Genome Sequencing, WGS) sera réalisé sur les populations finales évoluées afin (i) d'identifier des mutations d'intérêt affectant des séquences communes entre lignées et (ii) d'évaluer la diversité génétique des populations de Lp au sein d'une lignée.

Tâche 2 (6 mois). Détermination de l'histoire évolutive des lignées avec mutations d'intérêt.

L'histoire évolutive génomique sera reconstruite par WGS sur les populations intermédiaires conservées. Les mutations seront recherchées dans les génomes disponibles dans la base de données de l'équipe LegioPath – CNR des Légionelles (4000 génomes) afin de définir si les patterns obtenus sont retrouvés dans ces isolats. Les mutants isogéniques d'intérêt seront reconstruits.

Tâche 3 (18 mois). Analyse de la réponse adaptative de Lp à l'échelle moléculaire par des approches multi-omiques adaptées aux résultats de la tâche 1, telles que (i) lipidomique et métabolomique pour l'étude de voies évolutives mutationnelles communes à plusieurs lignées impliquant FabI, RNAseq pour celles affectant des régulateurs transcriptionnels globaux ou des facteurs de virulence ; (ii) protéomique par approche bottom-up ciblée

complétant l'étude des voies mutationnelles, et approche globale pour la caractérisation des voies évolutives non mutationnelles.

Tâche 4 (12 mois). Analyse de la fitness, de l'infectiosité et de la diminution de sensibilité / tolérance aux ATB des souches évoluées.

A partir de la souche Paris WT et des clones évolués, nous conduirons (i) des expérimentations de compétition axénique (après marquage fluorescent), (ii) une étude de la sensibilité et de la tolérance aux ATB (fluoroquinolones, macrolides, rifampicine) en absence / présence de concentrations sub-inhibitrices de PE, (iii) des infections sur modèle cellulaire (macrophages) in vitro en absence / présence de PE (concentrations selon résultats de la tâche 1) seuls / en association afin de déterminer l'impact des PE sur le processus infectieux : multiplication intracellulaire, profil inflammatoire (dosages de cytokines) des cellules infectées.

Les équipes 1 et 2 disposent de données préliminaires consolidées (TCS, tâche 1 ; phtalates, tâche 4) permettant d'assurer la faisabilité et l'intérêt du projet.

Partenariat

Centre International de Recherche en Infectiologie, INSERM U1111, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, ENS de Lyon - LegioPath

Responsable de l'équipe : Mme Ghislaine Descours

Ecologie et Biologie des Interactions, CNRS UMR7267, Université de Poitiers - Microorganismes, Hôtes, Environnements

Responsable de l'équipe : M. Julien Verdon

Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS UMR 5280 - Institut des Sciences Analytiques

Responsable de l'équipe : M. Jérôme Lemoine

Évaluation de l'activité sur différents récepteurs nucléaires de dérivés halogénés de bisphénols utilisés en remplacement du bisphénol A

M. Pascal Carato

Université de Poitiers UFR de médecine et de pharmacie - Poitiers cedex 9

Projet complet - 36 mois

Budget : 200 000 € TTC

Objectif détaillé

Le but de ce projet est d'évaluer les effets obésogènes des dérivés halogénés de bisphénols utilisés en remplacement du bisphénol A (BPA). En effet, l'halogénéation peut changer les propriétés de liaison des bisphénols vis à vis de leurs cibles comme c'est le cas pour le BPA dont l'étude de la modulation de l'activité de récepteurs nucléaires (RN) montre qu'ils peuvent être des ligands des ERs (œstrogènes), du PXR (pregnane X) et du PPARgamma (peroxisome proliferator-activated). Etant donné le rôle de ces RN dans des mécanismes clés de l'obésité que sont la prolifération cellulaire, la différenciation adipocytaire ou adipogenèse et la réponse inflammatoire, nous étudierons leur modulation dans les cellules humaines adipocytaires par ces dérivés qui n'ont jamais été étudiés jusqu'à présents.

Nous proposons d'étudier l'halogénéation de bisphénols utilisés en remplacement du BPA (BPS, BPB, BPE, BPC, BPC II, BPF, BPAF, BPZ), du pergafast 201 afin de déterminer quels sont ceux formés en majorité lors de processus de désinfection (Equipe 1). Une étude in vitro de ces composés et de leurs dérivés halogénés sera réalisée (Equipe 2) afin de mesurer leur capacité à moduler (activer ou inhiber) l'activité transcriptionnelle des récepteurs ERalpha, ERbéta, AR et PPARgamma (lignées cellulaires bioluminescentes établies par l'équipe 2) que nous avons identifiés comme cibles du BPA et de ses dérivés halogénés dans le projet Halocomendis. Nous allons déterminer si les autres bisphénols partagent les propriétés du BPA et de ses dérivés halogénés. Les différents composés seront ainsi étudiés ; ce travail sera facilité par le fait que le partenaire 2 dispose d'une plateforme de criblage cellulaire. Les effets des ligands les plus actifs des ERs, AR et PPARgamma seront étudiés dans les cellules adipocytaires humaines hMADS qui sont des précurseurs mésenchymateux humains qui peuvent se différencier en adipocytes. La prolifération, l'adipogenèse et la réponse inflammatoire sont directement modulés par ces récepteurs et certains marqueurs clés de ces étapes sont des gènes cibles de ces RN. L'équipe 3 s'intéressera donc à ces 3 mécanismes.

Originalité et/ou caractère novateur du projet

Le BPA a été classé « substance extrêmement préoccupante » sur la base de ses propriétés de perturbateur endocrinien (PE) pour la santé humaine, notamment vis à vis de certains cancers, mais aussi de pathologies métaboliques comme l'obésité et le diabète de type 2. Ce composé présent dans l'environnement et notamment dans l'eau potable, forme des dérivés chlorés et bromés lors des étapes de décontamination de l'eau à destination de la consommation humaine. Le BPA est un activateur de nombreux récepteurs nucléaires (RN) comme ceux des estrogènes (ERalpha et ERbéta), des xénobiotiques (PXR et CAR) et un

inhibiteur du récepteur des androgènes (AR). Dans le projet ANSES 2017 Halocomendis, nous avons étudié les activités RN du BPA et de ses dérivés halogénés. Nous avons montré que l'halogénéation modifiait l'activité du BPA. L'halogénéation partielle (1 ou 2 atomes de chlore ou de brome) maintenait voire augmentait l'activité agoniste ERalpha et ERbeta, PXR et l'activité antagoniste anti-AR. Par contre, l'halogénéation plus complète (3 ou 4 atomes de chlore ou de brome) diminuait ces activités mais augmentait celle du récepteur PPARgamma, acteur majeur de la différenciation adipocytaire.

L'objectif de notre nouveau projet est d'étudier l'activité des dérivés halogénés d'un grand nombre de substituts de BPA (BPS, BPB, BPE, BPC, BPC II, BPF, BPAF, BPZ) et du pergafast 201. Nous étudierons comment le niveau d'halogénéation module l'activité des récepteurs, ERs, AR et PPARgamma. Cette étude sera complétée par l'utilisation d'un des modèles de différenciation adipocytaire humaine hMADS (human multipotent adipose-derived stem), précurseurs mésenchymateux qui peuvent se différencier en adipocytes). Les études portant sur les composés suspectés d'être obésogènes se focalisent souvent à la seule adipogénèse or la rosiglitazone qui augmente l'adipogénèse est connue pour avoir des effets insulino-sensibilisants. Dans cette étude, nous allons donc étudier d'autres mécanismes pouvant relier l'obésité à l'insulino-résistance comme la prolifération et l'inflammation. La prolifération, l'adipogénèse et la réponse inflammatoire de ces cellules étant, en outre, directement modulés par les récepteurs suscités, nous caractériserons les marqueurs clés de ces étapes et le rôle des RN dans cette modulation.

Questions de recherche

PE 1 - Développement de méthodes permettant d'investiguer des mécanismes d'action (y compris épigénétiques).

PE 2 - Étude des modes d'action en vue d'identifier une éventuelle perturbation endocrinienne en rapport avec le développement de pathologies métaboliques, hormonales, neuro-développementales ou de troubles de la reproduction (tels que l'infertilité), y compris sous l'angle des effets trans- et inter-générationnels.

PE 5 - Développement de biomarqueurs d'exposition et/ou d'effets à des substances perturbatrices endocriniennes avérées, présumées ou suspectées.

Ce projet permettra de mieux caractériser les effets obésogènes et inflammatoires potentiels des produits de substitution du BPA et de leurs dérivés halogénés en étudiant leurs effets sur la prolifération, la différenciation adipocytaire et la réponse inflammatoire. Ce sont des événements clés déréglés dans les maladies métaboliques notamment l'obésité. Ainsi, beaucoup de marqueurs de ces mécanismes sont des gènes cibles des voies ER, AR et PPARgamma. Cela permettra donc de proposer des biomarqueurs des obésogènes qui ciblent ces RN.

Description des méthodes mises en œuvre

L'équipe 1 (0-12 mois) qui possède des compétences en chimie organique réalisera la synthèse des dérivés chlorés et bromés des 6 bisphénols.

L'équipe 2 (6-24 mois) évaluera les activités ERalpha, ERbeta, AR et PPARgamma des différents composés. Ces composés seront testés à l'aide de lignées cellulaires bioluminescentes exprimant ces RN ainsi que le gène de la luciférase sous leur contrôle pour leur capacité à lier (tests de compétition avec des ligands tritiés) et activer ou inhiber (expression de la luciférase) ERalpha, ERbeta, AR et PPARgamma.

Pour les ligands les plus actifs, l'équipe 3 (18-36 mois) confirmera leur potentiel obésogène dans les cellules adipocytaires humaines hMADS, à savoir, les effets sur la prolifération (par comptage des noyaux par Hoechst), l'adipogenèse (coloration Oil Red O pour l'accumulation de lipides), l'expression des gènes adipogéniques (c/EBPa, PPARgamma, CD36, LPL, FABP4, leptine, adiponectine, PGC1a, PCK1) et inflammatoires (IL1a, IL8, MCP1, CXCL12) (RT-qPCR et WB). Les cytokines seront également dosées en cytométrie avec legendPlex. La modulation de ces biomarqueurs via les RN sera vérifiée par l'utilisation des antagonistes spécifiques. Les doses et les temps pertinents seront choisis après des études de dose-réponse et de cinétique qui permettront de réaliser des tests de cytotoxicité et de viabilité (MultiTox-Fluor Multiplex cytotoxicity assay).

Partenariat

Inserm CIC 1402 - IHES

Responsable de l'équipe : M. Pascal Carato

Institut de recherche en cancérologie de Montpellier (IRCM) - Plateforme de criblage en cancérologie

Responsable de l'équipe : Mme Marina Grimaldi

Inserm U1124 - MetaTox

Responsable de l'équipe : M. Xavier Coumoul

Evaluation de l'impact des pesticides sur la protéine Park7 et sur la neuroinflammation chez le poisson zèbre

M. Julien Dairou

Université Paris Descartes Laboratoire de Chimie et Biochimie Pharmacologique et Toxicologiques

Equipe: Chimie Bio-inorganique - Paris

Projet complet - 36 mois

Budget : 199 950 € TTC

Objectif détaillé

En 2012, la maladie de Parkinson a été reconnue en France comme une pathologie professionnelle pour les agriculteurs en raison de leur exposition majeure aux pesticides. Bien que l'association entre l'exposition à des pesticides et la maladie de Parkinson ait longtemps été un sujet d'étude dans le domaine de la santé environnementale, les données bibliographiques, ne permettent pas d'identifier clairement les mécanismes moléculaires/cellulaires mis en jeu dans ce lien.

Notre équipe (EQ1) a découvert un nouveau système universel de réparation de la glycation qui repose sur la protéine Park7. La glycation est la formation d'une liaison covalente entre des réducteurs endogènes dérivés du glucose (méthylglyoxal) et certains constituants des protéines et de l'ADN. Park7 est une déglycase ayant la capacité de réparer les biomolécules « glyqués » en agissant sur les premiers intermédiaires de glycation et en libérant ainsi les protéines et ADN natifs. Park7 joue ainsi un rôle majeur dans les processus d'anti-glycation et dans la prévention de la formation des produits de glycation avancés (AGEs). De plus cette protéine est impliquée dans la maladie de Parkinson, en effet les mutations invalidant sa fonction entraînent une augmentation du risque de développer la maladie.

Dans le projet TOXPARK financé par l'Anses, nous avons étudié l'effet de près de 150 pesticides sur l'activité Park7 en utilisant pour chaque composé, une gamme de concentration. Nos résultats montrent que 90% des pesticides sont sans effet sur l'activité Park7. En revanche, nous avons montré que 15 pesticides appartenant à des familles différentes, présentent une inhibition submicromolaire de cette activité. En collaboration avec l'équipe de Xavier Coumoul (EQ2), nous avons montré qu'un des mécanismes d'action passe par l'induction d'un stress oxydant ce qui constitue une composante majeure de la neuroinflammation observée dans les maladies neurodégénératives. Or des études récentes montrent l'implication de Park7 dans la protection de vis-à-vis de la neuroinflammation.

Notre projet a donc pour but d'étudier l'effet des pesticides, dont l'effet inhibiteur vis-à-vis de Park7 a été montré in vitro, dans un contexte cellulaire sur la lignée SHSY-5Y et in vivo avec le modèle zebrafish (EQ3), très utilisé en neurobiologie, en identifiant aussi des biomarqueurs communs entre ces modèles humain et poisson. Ces études permettront de mieux comprendre les effets biologiques de certains pesticides sur la perturbation de la voie de glycation dont la régulation est déterminante dans la maladie de Parkinson mais également de mieux comprendre le rôle de Park7 dans la neuroinflammation.

Originalité et/ou caractère novateur du projet

Dans le développement de la maladie de Parkinson, le stress oxydatif et la neuroinflammation jouent un rôle majeur. Le rôle de ces stress dans l'apparition de dommages à l'ADN et/ou de perturbations de certaines voies de signalisation pouvant conduire à une dérégulation de la prolifération ou de la mort cellulaire, ou à des altérations du système immunitaire, sont autant de mécanismes susceptibles de sous-tendre les effets des pesticides. En revanche, une seule étude fiancée dans le cadre du projet Anses TOXPARK a porté sur l'étude de la glycation dans un contexte d'exposition aux pesticides or celle-ci peut provoquer les mêmes effets qu'un stress oxydatif et/ou une neuroinflammation. Ce point est un des aspects clés originaux du projet en regard des récentes découvertes sur l'activité Park7 et de son inhibition par certains pesticides. De plus ce projet permettra l'étude de Park7 et de la voie de glycation chez le modèle zebrafish au cours de son développement. Aucune étude n'a abordé le rôle des expositions précoces aux pesticides dans l'apparition d'une maladie de Parkinson à l'âge adulte, que ce soit pendant la grossesse ou au cours de l'enfance ; ceci est probablement lié aux difficultés méthodologiques inhérentes à un suivi de personnes exposées, avec un âge tardif dans la survenue de la maladie. Nous proposons de modéliser le processus du rôle protecteur de Park7 au cours des stades précoces de développement à l'aide zebrafish qui peut être exposé très précocement aux pesticides mais avec une croissance rapide. Ainsi, ce modèle est particulièrement adapté et reconnu pour les études en biologie du développement et plus précisément du neurodéveloppement.

Questions de recherche

ACHIM 1 - Effets sur les écosystèmes et la santé humaine : notamment effets à faibles doses, effets cocktails et relation dose/effet.

ACHIM 5 - Évaluation de l'efficacité des moyens de prévention et de réduction des expositions aux contaminants chimiques présentant un risque pour la santé humaine et les écosystèmes.

Nous proposons une étude complémentaire in cellulo et in vivo de la glycation et de l'activité Park7 dans un contexte d'exposition aux pesticides. Les résultats que nous avons obtenus, montrent une inhibition de l'activité PARK7 à des concentrations en pesticides du même ordre de grandeur que celles auxquelles les populations sont exposées. L'étude des effets des pesticides sur le zebrafish nous permettra de confirmer ceux observés in vitro dans un modèle vertébré in vivo et également d'étudier la neuroinflammation dont Park7 est un acteur important.

Description des méthodes mises en œuvre

Le projet repose sur l'utilisation d'approches moléculaires, cellulaires et in vivo mises en œuvre par les trois partenaires dans le cadre de leurs activités de recherche.

L'EQ1 qui a mis en évidence l'activité Park7 fera la caractérisation in vivo de son inhibition par les pesticides à partir du matériel biologique fourni par les EQ 2 et 3.

L'EQ 2 dont l'expertise reconnue est la toxicologie cellulaire, a produit une lignée cellulaire SH-SY5Y Park7 knock-out dans le cadre du projet Anses TOXPARK qui a permis à l'EQ1, d'affiner ses mesures d'activité de l'enzyme. Cette lignée sera utilisé pour analyser le rôle de Park7 sur la différenciation de la lignée en neurones dopaminergiques. Différents marqueurs (voie de la glycation, stress cellulaires : oxydant et inflammation) et processus

cellulaires de toxicité (ex : apoptose) seront analysés après exposition aux pesticides pour attester du lien de causalité impliquant potentiellement Park7 – pesticides et neurodégénérescence dopaminergique.

En parallèle, l'EQ 3 va générer un modèle KO-Park-7 dans des lignées transgéniques marquant les neurones dopaminergiques Tg[dlx:GFP] qui sont touchés dans la maladie de Parkinson et dans les cellules microgliales/macrophages Tg[mpeg1:mcherry] pour suivre en temps réel les effets des pesticides sur la neuroinflammation. L'impact de ces pesticides sur le métabolisme et l'intégrité mitochondriale des embryons de zebrafish sera évalué. La lignée transgénique zebrafish Tg[Ubi:HyPer] exprimant un capteur H2O2 fluorescent sera utilisée pour évaluer le stress oxydatif.

Partenariat

Université Paris Cité - UMR8601 - Métabolisme Pharmacochimie et Neurochimie

Responsable de l'équipe : M. Julien Dairou

INSERM U1124 - METATOX

Responsable de l'équipe : M. Xavier Coumoul

INSERM UMR1141 - NeuroDiderot

Responsable de l'équipe : Mme Nadia Soussi-Yanicostas

Résumé ISMI - 2024_EST_218

Impact des rejets de stations d'épuration sur les sédiments estuariens : indicateurs microbiens pour une surveillance environnementale complète

M. Robert Duran

Université de Pau UMR IPREM5254 - Université de Pau, Bat IBEAS BP1155, 64013 Pau cedex - Pau

Projet complet - 36 mois

Budget : 199 680 € TTC

Objectif détaillé

Estuaries constitute key transition ecosystems with very high anthropogenic pressure. Wastewater treatment plants (WWTP) effluents discharge of emerging contaminants (ECs) is one of the elements contributing to it, which poses risks to local populations. Ecosystem resilience results in significant changes in biodiversity, which weakens self-depuration capacity. Studying changes in biodiversity can provide valuable insights into water quality deterioration, helping to develop suitable water management strategies.

Although multiple standardized bioassays covering different modes of action are available to assess aquatic ecosystem health, a cost-effective and reliable monitoring strategy for hazard and environmental risk assessment is still lacking for evaluating the toxicity of sediments. Due to different toxicity modes of action, more than one bioassay is needed for thorough risk assessment. A combination of in vitro, ex vivo and invertebrate in vivo assays is recommended for an integrated environmental health assessment of WWTP impact.

Microbial communities have emerged as attractive biomarkers of environmental state in recent decades since they are highly dynamic and sensitive to contaminants. High throughput sequencing technology allows the development of microbial community-based indexes that represent promising tools for environmental monitoring. ISMI hypothesizes that WWTP effluents are a source of EC accumulation in estuarine sediments, causing toxicity effects in receiving populations and altering microbial communities composed of generalist resilient and resistant microbial taxa. The specific objectives are:

- Characterize ECs in estuarine surface sediments adjacent to a discharge point of three WWTPs (highly and medium-low urbanized)
- Assess the toxicity of the impacted sediments by proposing an integrated index based on a battery of bioassays and microbial indexes
- Identify functional microbial biomarkers and bioindicator taxa in the impacted sediments and validate them in a mesocosm experiment.

Originalité et/ou caractère novateur du projet

ISMI key innovative aspects are to:

- constitute a unique international consortium with extensive expertise in microbial-ecotoxicology and toxicology of aquatic environments involving a UPPA-UPV/EHU co-supervision of a PhD student

-use the newest technologies in all parts of the work such as high throughput sequencing/omics for microbial community characterization and modern numerical statistical tools to identify microbial biomarkers

-implement an innovative holistic approach characterizing the three domains of life (Bacteria, Archaea, and Eukarya) tackling spatial (3 different estuaries in France and Spain) and temporal (2 seasons) variations

-propose a non-targeted approach evaluating a large range of parameters and contaminants (pharmaceuticals, organic and inorganic compounds)

-use a battery of bioassays to provide data to extrapolate the risk evaluation of existing sewage treatment systems for the human population

Questions de recherche

ACHIM 1 - Effets sur les écosystèmes et la santé humaine : notamment effets à faibles doses, effets cocktails et relation dose/effet.

ACHIM 3.1 - Prise en compte et caractérisation des multi-expositions et co-expositions en lien avec l'exposome : impacts des expositions à des substances chimiques en milieu de travail et en population générale, multi-expositions ou expositions cumulées, y compris médicamenteuses, à d'autres types de nuisances (nuisances physiques, biologiques, relationnelles, organisationnelles...).

ACHIM 11 - Caractérisation des niveaux d'exposition des écosystèmes pour la biosurveillance environnementale.

ISMI tackles AChem 1, 3 and 11 evaluating the impact of WWTP discharge on aquatic (micro)organisms. We will determine the composition of the ECs and evaluate their toxicity using ecotoxicological assays at different trophic levels (ACHEM 1). Focusing on the microbial communities impacted by WWTP will allow us to discover multidrug-resistant bacteria sources (ACHEM 3) and identify potential microbial bioindicators reporting environmental contamination as an alternative to other approaches (ACHEM 11).

Description des méthodes mises en œuvre

ISMI considering the feedback of last year submission focalize on the characterization of sediment's microbiome structure and function. It is organized around 5 tasks:

Task1: Chemical characterization (UPV/EHU) We selected three WWTPs with tertiary water treatment and contrasting daily discharge rates to the rivers of the Bay of Biscay basin (St Frédéric, Bayonne; Galindo, Bilbao; Guriezo, Cantabria) and collected sediments in the proximity, up and downstream from the discharge point in triplicates in two seasons (spring and autumn). The granulometry and physical-chemical parameters of sediments and their extracts will be determined using LC-MS/MS (pharmaceutical residues), liquid chromatography (UHPLC-Q) for ECs, ICP-MS for metals and metalloids.

Task2: Determination of ecotoxicity levels in estuarine sediments. Toxicity evaluation by a battery of in vitro bioassays (UPV/EHU) We will apply a set of test including Microtox, in vitro (CALUX or gene reporter) assays, algae biosassays, Zebrafish embryos (ZFET) and polychaeta tests.

Task3: Microbial community characterization (CNRS) The Microbial community will be analyzed by rRNA gene metabarcoding (Bacteria and Archaea – 16S, Eukarya – 18S) using MiSeq Illumina sequencing to reveal differences between up and downstream sites around WWTP discharge points. Shotgun metagenomics/transcriptomics will allow us to identify microbial functional responses to contaminants by contrasting each location with the

corresponding upstream sites. Multivariable statistical and network analyses will be performed to correlate microbial community organization and functional responses with physicochemical and ecotoxicological endpoints from the previous tasks. The Quality Ratio index will be applied to integrate the physicochemical parameters of the sediments and the microbiological functional response to classify the ecological risks of sediments to the benthic microbiota.

Task4: Validation of microbial biomarkers (CNRS) Sediments from a pristine site upstream of a WWTP will be collected to perform a microcosm experiment by exposing sediments for 21 days to the WWTP effluents, analyzing the changes in the microbial community structure and activity to follow the dynamic changes of the microbial community using the analytical approach from Task4.

Task5: Integration of microbiota responses, changes and biomarkers with ecotoxicity responses. Changes in microbiota populations and biomarkers will be classified according to the ecotoxicity observed in the sediment samples. An integrative statistical analysis, based on general linear models and numerical (network and multivariate) statistics will be applied to understand the differences in microbial community structures and biomarkers, ecotoxicity of sediments and physical-chemical characteristics of sediments.

Gantt (M=month)

Task1: done; Task2 & 3: M1 to M12; Task4: M13 to M27; Task5: M22 to M33; Reporting: M12, M24, & M36; Publication: M31 to M36

Partenariat

CNRS - IPREM

Responsable de l'équipe : M. Robert Duran

UPV/EHU - CBET, Cell Biology in Environment Toxicology

Responsable de l'équipe : M. Maren Ortiz-Zarragoitia

Mécanismes gliaux, métaboliques et inflammatoires associés aux dysfonctions de la reproduction induites par **l'exposition** environnementale aux phtalates

Mme Elodie Desroziers

Institut de Biologie Paris Seine 7-9 Quai Saint Bernard - Paris

Projet complet - 36 mois

Budget : 199 661 € TTC

Objectif détaillé

Les phtalates sont ubiquitaires dans l'environnement en raison de leur utilisation massive notamment comme plastifiants, dans les cosmétiques ou comme adjuvants dans les herbicides. Chez l'humain, l'exposition aux phtalates provoque des troubles de la fertilité en augmentant le risque d'altération de la spermatogenèse, de syndrome de dysgénésie testiculaire, d'anomalies pubertaires ; et, est associée à une diminution de la réserve ovarienne, à une augmentation du risque d'insuffisance ovarienne prématurée, de fausses couches... (Hlisnikova et al, 2020; Green, 2021). Les études animales ont montré les propriétés reprotoxiques et de perturbation endocrinienne de ces substances (ECHA 2005 ; 2019). Récemment, le partenaire 1 a montré que l'exposition adulte au di(2-éthylexhyl)phtalate (DEHP) à l'actuelle dose journalière tolérable (50 µg/kg/j), à une dose de l'ordre de l'exposition environnementale (5 µg/kg/j), ou à un mélange de phtalates contenant le DEHP, altère la régulation neuroendocrine et les comportements de reproduction chez la souris mâle et femelle (Adam et al, 2021 & 2022, Dombret et al, 2017 ; Ducroq et al, 2023). Il a été observé chez ces souris exposées une diminution de la neuroplasticité et une activation gliale associées à une augmentation de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (BHE) dans l'hypothalamus (Adam et al, en préparation ; Ahmadpour et al, 2021). Des analyses métabolomiques et protéomiques ont identifié une perturbation de la voie kynurénine du métabolisme du tryptophane (Ducroq et al, 2023; Adam et al, en préparation). Cela pourrait représenter l'événement initiateur des perturbations cellulaires menant aux altérations neuroendocrines et comportementales induites par l'exposition aux phtalates. La voie kynurénine est la voie majoritaire du métabolisme du tryptophane, un acide aminé essentiel apporté par la nourriture. Le tryptophane est métabolisé en kynurénine en périphérie et dans le système nerveux par les cellules gliales dont l'implication dans la physiopathologie de la reproduction a été documentée (Sati et al, 2021 & 2023 ; Desroziers, 2022). Les astrocytes produisent l'acide kynurénique (KA) et les microglies l'acide quinolinique (QA), métabolites agissant sur la neurotransmission, la neuroplasticité et le système immunitaire (Savitz et al, 2020). De nombreuses études suggèrent leur implication dans la neuroinflammation et la dysfonction de la BHE associées aux maladies psychiatriques et neurodégénératives (Savitz et al, 2020). Il est possible qu'ils soient au centre des dysfonctions reproductives induites par les phtalates, qui peuvent se lier et inhiber des enzymes de cette voie métabolique (Singh et al, 2018).

Ce projet visé à i) utiliser le modèle murin d'exposition au mélange environnemental de phtalates afin d'analyser les cellules gliales et la voie kynurénine de métabolisme du tryptophane et d'effectuer en parallèle des quantifications sanguines et urinaires des niveaux des métabolites de cette voie, de marqueurs inflammatoires et des niveaux des phtalates, et ii) effectuer ces même quantifications dans les fluides biologiques d'une cohorte humaine de couples présentant des troubles de la fertilité. Nous espérons ainsi identifier un ou plusieurs biomarqueurs pertinents pour l'exposition environnementale aux phtalates.

Originalité et/ou caractère novateur du projet

Le caractère original et novateur du projet réside dans :

- Les analyses cellulaires et moléculaires des acteurs gliaux liés à la neuro-inflammation induite par des doses environnementales aux phtalates.
- Le caractère translationnel (souris et humain) et l'analyse des deux sexes dans la même étude.
- La recherche de nouveaux biomarqueurs de l'exposition chronique aux phtalates pour l'évaluation du risque pour la santé humaine.

Questions de recherche

PE 2 - Étude des modes d'action en vue d'identifier une éventuelle perturbation endocrinienne en rapport avec le développement de pathologies métaboliques, hormonales, neuro-développementales ou de troubles de la reproduction (tels que l'infertilité), y compris sous l'angle des effets trans- et inter-générationnels.

PE 3 - Étude de la toxicologie des faibles doses et/ou de la relation dose/effet.

PE 5 - Développement de biomarqueurs d'exposition et/ou d'effets à des substances perturbatrices endocriniennes avérées, présumées ou suspectées.

Ce projet vise à répondre aux questions suivantes :

1. Quels sont les mécanismes moléculaires et cellulaires gliaux sous-tendant les dysfonctions du contrôle central de la reproduction ?
2. L'inflammation neurale et systémique sont-elles associées à l'altération de la voie kynurénine du métabolisme du tryptophane ?
3. Les métabolites de cette voie kynurénine et/ou les marqueurs d'inflammation peuvent-ils représenter des biomarqueurs de l'exposition aux phtalates ?

Description des méthodes mises en œuvre

Mois 1-18. Le partenaire 1 exposera une 1ère cohorte de souris adultes mâles et femelles au véhicule (groupe contrôle) et un mélange environnemental de phtalates (DEHP, DBP, ...) pendant 10 semaines aux doses décrites (Ducroq et al., 2023). Les cerveaux seront utilisés pour des immunohistochimies des astrocytes, microglies et mastocytes, afin d'analyser leur nombre, morphologie et association avec des marqueurs d'activité inflammatoire dans l'hypothalamus (Sati et al, 2021). De plus, nous effectuerons des co-immunomarquages pour des enzymes impliquées dans la voie kynurénine de métabolisme du tryptophane (indoleamine 2,3-dioxygénase et kynurénine aminotransférase) et du récepteur xénobiotique AhR activé par cette voie (Ducroq et al., 2023).

En parallèle, le partenaire 2 recrutera des couples infertiles. Leur niveau d'exposition aux perturbateurs endocriniens sera évalué par un questionnaire validé. Il s'agit d'une étude observationnelle monocentrique au cours de laquelle seront recrutés au cours d'une

consultation médicale 50 couples hétérosexuels infertiles (100 individus), consultant au centre de fertilité de Tenon. Les couples acceptant de participer à l'étude signeront les consentements et seront ensuite reçus pour remplir les questionnaires et effectuer les prélèvements de sang et d'urine. Des critères d'inclusion et d'exclusion seront appliqués. Les échantillons de sang et d'urines seront traités extemporanément et stockés en attendant des analyses groupées.

Mois 19-36. Les cerveaux de deux autres cohortes de souris seront disséqués pour les régions hypothalamiques impliquées dans la reproduction afin de réaliser une analyse suivie d'un criblage par cytométrie en flux des 3 types cellulaires sur lesquels des analyses de RT-qPCR de la voie kynurénine de métabolisme du tryptophane et des acteurs de l'inflammation seront réalisées. L'urine et le sang seront récoltés et ensemble avec l'urine humaine seront analysés pour mesurer les métabolites de phtalates, les métabolites de la voie kynurénine et des marqueurs d'inflammation systémique.

L'association entre l'exposition aux phtalates et la présence de marqueurs d'inflammation et/ou de métabolites de la voie kynurénine sera étudiée et comparée entre les deux espèces.

Partenariat

Neurosciences Paris Seine - Neuroplasticité des comportements de reproduction

Responsable de l'équipe : Mme Elodie Desroziers

Centre de recherche Saint-Antoine - Lipodystrophies, adaptations métaboliques et hormonales, et vieillissement

Responsable de l'équipe : Mme Charlotte Dupont

Résumé KINEMAC - 2024_EST_226

Exposition professionnelle aux médicaments anticancéreux des masseurs-kinésithérapeutes en établissements de soins : de **l'évaluation de la contamination interne à la mise en place d'une prévention co-construite.**

M. Antoine Villa

Assistance Publique Hôpitaux de Marseille Consultations de pathologie professionnelle - Marseille

Projet complet - 36 mois

Budget : 197 032 € TTC

Objectif détaillé

Un grand nombre de médicaments anticancéreux (MAC) sont classés « dangereux à la manipulation » par le NIOSH du fait de leur action cancérogène, mutagène et/ou reprotoxique. Les professionnels y sont exposés principalement par voie cutanée et les **sources d'exposition sont directes (manipulation des MAC) et indirectes** (via la peau, les excréta du patient, vêtements, draps, surfaces contaminées). Deux études françaises récentes rapportent une contamination interne par les MAC chez plus de 50% d'infirmières et aide-soignantes en services de soins. Cependant, certaines professions comme les masseurs-kinésithérapeutes (MK) **n'ont fait l'objet à ce jour d'aucune évaluation alors que**, dans leurs pratiques professionnelles, ils exercent des soins prolongés et appuyés (massages, drainages lymphatiques) en contact direct avec la peau de patients traités ; ces derniers éliminant les MAC par la sueur plusieurs jours après leur administration (données rapportées pour méthotrexate, doxorubicine, cyclophosphamide (20 µg/kg/j)). De plus, 2 études objectivent l'absorption de cyclophosphamide, doxorubicine, 5-FU et cisplatine à travers la peau, ce qui laisse présager une possible contamination interne des MK par les MAC, les gants n'étant pas portés en raison d'une baisse de la sensibilité du toucher et de l'inconfort pour le patient. Ainsi, nous avons montré dans une étude de faisabilité (2022), (1) une **contamination externe cutanée d'un MK par l'ifosfamide et l'étoposide après un massage cicatriciel chez un patient traité et (2) la présence d'ifosfamide dans les urines de ce MK** (l'étoposide urinaire n'a pas été recherché en l'absence de méthode analytique disponible).

L'objectif principal est d'évaluer la contamination interne par les MAC des MK lors de soins à des patients traités.

Les objectifs secondaires sont :

- 1- Développer **une méthode de haute sensibilité pour le dosage urinaire de l'étoposide**
- 2- Identifier les facteurs associés à la contamination interne et évaluer la contamination externe cutanée des MK après un soin exposant
- 3- Proposer des moyens de prévention en co-construction avec les MK et évaluer leur acceptabilité.

Originalité et/ou caractère novateur du projet

L'originalité est (1) de contribuer à l'acquisition de connaissances sur la contamination interne et externe de professionnels exposés aux MAC via la sueur de patients traités ; (2)

d'utiliser des méthodes analytiques (LC-MS/MS) de très haute sensibilité et spécificité pour la métrologie de surface cutanée et la biométrie urinaire.

Le caractère novateur tient (1) au développement d'une méthode pour le dosage urinaire de l'étoposide, aucune méthode n'ayant été publiée à ce jour ; (2) à l'étude de la profession des MK, ces derniers n'ayant fait l'objet d'aucune publication de contamination par les MAC, contrairement à d'autres professions ; (3) à la proposition de moyens de prévention transférables à toute la profession de MK en libéral (patients traités à domicile et en hôpital de jour).

Questions de recherche

ACHIM 2 - Caractérisation des expositions et étude, par voie expérimentale et épidémiologique, des impacts sur la santé en population générale, en milieu de travail en fonction de l'âge et du genre, et de populations sensibles peu étudiées.

ACHIM 4 - Développement de méthodes et outils de mesurage de l'imprégnation biologique des populations exposées aux produits chimiques, développement de biomarqueurs d'exposition et d'effets, détermination d'éventuelles fenêtres d'exposition critique.

ACHIM 5 - Évaluation de l'efficacité des moyens de prévention et de réduction des expositions aux contaminants chimiques présentant un risque pour la santé humaine et les écosystèmes

ACHIM 2- La population des MK étant très féminisée et en âge de procréer, une caractérisation des expositions aux MAC (classés reprotoxiques et cancérogènes) est nécessaire. Ceci répond aux objectifs du programme national de biosurveillance des expositions professionnelles (SPF et ANSES).

ACHIM 4- Une méthode de haute sensibilité pour le dosage urinaire de l'étoposide sera développée. Ce MAC appartient à la liste des substances cancérogènes publiée par l'ANSES (2021) dont un suivi est recommandé pour assurer la traçabilité des expositions professionnelles (PST 4). Ce nouveau biomarqueur complétera le panel de ceux actuellement disponibles pour évaluer les expositions professionnelles aux MAC.

ACHIM 5- Les données recueillies permettront d'identifier les facteurs associés à la contamination aux MAC et de proposer des moyens de prévention en co-construction avec les MK et évaluer leur acceptabilité.

Description des méthodes mises en œuvre

KINEMAC est une étude observationnelle, transversale, multicentrique (n=2 sites : APHM Marseille, CHU Bordeaux), intégrant des approches pluridisciplinaires.

Le nombre total de MK à inclure est de 20 sur 5 jours non consécutifs de travail (n=100 jours au total) sous l'hypothèse d'une prévalence de contamination interne de 55% (celle publiée pour les infirmières étant de 60,8%), au risque alpha de 5%, avec un niveau de précision de 20%. Chaque MK sera suivi 5 jours durant lesquels il aura effectué des soins à des patients ayant reçu dans les 4 à 48 h l'un des 7 MAC étudiés pour lesquels un biomarqueur urinaire d'exposition est disponible (cyclophosphamide, ifosfamide, méthotrexate, doxorubicine, épirubicine, daunorubicine, étoposide).

- Au cours de chaque journée d'observation d'un MK, un enquêteur recueillera des données (actes réalisés, moyens de protection) et 2 prélèvements urinaires (un en début de poste, un 6-10h après la fin de poste).

En 2022, à partir des données de reconstitutions des MAC des pharmacies hospitalières des 2 sites, l'étude de faisabilité a permis d'identifier 20 services de soins concernés par

l'exposition aux MAC étudiés. Pour l'ensemble des sites, 30 MK potentiellement exposés aux MAC ont été recensés, ainsi que 2400 actes par an de masso-kinésithérapie. La stratégie de recrutements des journées d'observations des MK a été élaborée avec 4 MK, 2 cadres de santé et 3 pharmaciens hospitaliers.

- La contamination externe cutanée par les MAC chez les MK sera étudiée au cours de l'observation de 70 actes de soins (n=10 actes/MAC) à l'aide de prélèvements surfaciques (avant-bras, visage et mains des MK), réalisés sur des jours différents de ceux pour évaluer la contamination interne (pour ne pas sous-estimer la contamination interne en réduisant la dose sur la peau).

- Les dosages urinaires et surfaciques seront réalisés à l'aide d'outils de haute sensibilité déjà en place au laboratoire en dehors de celui de l'étoposide qui sera développé dans cette étude.

- Les moyens de prévention relatifs à l'exposition aux MAC des MK seront co-construits avec eux et l'acceptabilité sera évaluée.

Calendrier :

Année 1 : dépôt des dossiers règlementaires, développement de la méthode analytique (étoposide urinaire), études de poste (approche ergonomique), construction d'une grille d'observation et d'un questionnaire

Année 2 : inclusion, recueil des données des journées d'observation et des prélèvements, dosages, codage,

Année 3 : analyse statistique, co-construction des moyens de prévention avec les MK et évaluation de l'acceptabilité, valorisation scientifique.

Partenariat

Assistance Publique Hôpitaux de Marseille - Centre Régional de Pathologies Professionnelles et Environnementales

Responsable de l'équipe : M. Antoine Villa

Université Aix Marseille - EA 3279 CERESS

Responsable de l'équipe : M. Pascal Auquier

CHU de Bordeaux - Laboratoire de pharmacologie et toxicologie

Responsable de l'équipe : Mme Mireille Canal Raffin

CHU de Bordeaux - Service santé travail environnement

Responsable de l'équipe : Mme Catherine Verdun-Esquer

Université de Bordeaux - Inserm U1219 - Equipe Epicene

Responsable de l'équipe : Mme Isabelle Baldi

Assistance Publique hôpitaux de Marseille - Service de médecin physique et réadaptation

Responsable de l'équipe : M. Pierre-Henri Haller

Modèle d'Apprentissage d'Extraction et de cLaSsificaTion des Résultats de campagnes d'expOsition EM

M. Serge Bories
CEA Leti\DSIS\STSC\LAP - Grenoble

Projet complet - 24 mois
Budget : 199 903 € TTC

Objectif détaillé

Bien que les systèmes émettant des champs électromagnétiques (EM) respectent les limites d'exposition, il demeure pertinent de pouvoir caractériser l'exposition réelle du public de manière fine afin de connaître son évolution sur le long terme et d'observer l'impact de nouvelles technologies et de nouveaux usages. L'instrumentation permettant l'évaluation de cette exposition, notamment celle prédominante issue du smartphone, a connu une amélioration constante ces dernières années : exposimètre in-situ type DEVIN, mobile à trace type NEMO, application logicielle type Xmobisense. Ceux-ci ont ouvert la voie à des campagnes de caractérisation d'envergure nationale (projet ANSES CORIOLIS) et internationale (projet européen SEAWave [2]) menées en autres par le consortium de cette proposition.

On rappelle que l'exposimètre voie montante DEVIN [1] développé par le CEA Léti, vise à caractériser la diversité et l'évolution à long terme de l'exposition EM des usagers de smartphones. La diversité nécessite un large déploiement dans une population représentative et donc un coût faible ainsi qu'une simplicité d'usage (autonomie, équipement miniature). La notion d'évolution à long terme requiert un instrument indépendant des versions logicielles et des technologies radio actuelles et à venir. Ce dernier point est à la fois un avantage puisque le DEVIN mesure directement une grandeur physique (puissance RF) et fonctionne quelle que soit la source RF (modèle de smartphone, tablette, console de jeux). Mais, cela peut se révéler un inconvénient du point de vue de l'analyse épidémiologique car, en l'état, le profil temporel de puissance RF ne peut pas être directement associé à un usage (ex on ne peut pas identifier un appel voix 4G uniquement sur base du profil de puissance RF) d'où sa complémentarité avec l'application Xmobisense dans la campagne Coriolis. Ce projet va donc étudier la possibilité d'extraire d'une mesure de puissance RF, des signatures permettant de catégoriser des scénarios type d'exposition en utilisant un apprentissage supervisé par réseau de neurones.

Originalité et/ou caractère novateur du projet

La nouveauté des campagnes CORIOLIS et SEAWave réside dans leur très large jeu de données brutes (profils temporels de puissance RF) enrichies d'informations complémentaires (géolocalisation, puissance voie descendante, position du mobile). Ceci ouvre la voie à de nouvelles analyses qui en retour permettront d'améliorer l'architecture de la prochaine génération d'exposimètres EM de type DEVIN. Ainsi ces post-traitements d'extraction automatisée de métriques pertinentes pour l'analyse de l'exposition (moyenne,

maxima, écart-type estimée à quelques Hz) permettront l'identification et la classification de scénarios type d'exposition. C'est l'objectif principal et novateur du projet MAELSTROEM.

Questions de recherche

RFES 4.1 - Recherches sur les protocoles de mesure de l'exposition dans les bandes 3,5 GHz et 26 GHz notamment, pour les technologies associées (5G, antennes actives, petites cellules, etc...), et en situation d'usages réalistes.

RFES 4.2 - Recherches sur les spécificités de l'exposition réelle des enfants et femmes enceintes aux radiofréquences en situation d'usage des dispositifs radioélectriques (tablettes, téléphones, etc.).

RFES 4.3 - Recherches sur la caractérisation de l'exposition des personnes dans le cadre du cumul d'expositions ou de situations d'expositions maximisantes : CPL, nouvelles technologies de communication, objets connectés, transports autonomes et connectés...).

Ce projet fait appel à la question de recherche sur la caractérisation des expositions (RFES 4.1 , 4.2 et 4.3) en développant l'instrumentation et l'analyse nécessaires aux caractérisations à grande échelle de l'exposition EM du grand public dans leur usage du quotidien (RFES 4.1). L'instrument DEVIN étant indépendant de l'appareil émetteur, il se prête aux spécificités d'expositions faibles mais longues par exemple console de jeux utilisées par les enfants (RFES4.2) ou dans le cadre de cumul (RFES4.3) tant que la source fonctionne dans les bandes Wifi ou cellulaires.

Description des méthodes mises en œuvre

Trois objectifs (sous-projets où les trois partenaires interagissent) sont identifiés :

1. Le premier porté par le CIRC consiste à **prolonger l'exploitation des données** recueillies dans le cadre du projet de recherche CORIOLIS/Smartphones. Ce projet, financé par l'ANSES en 2017, a permis le recueil de données très détaillées sur les expositions émises par les téléphones mobiles et reçues des antennes relais, auprès de plus de 300 volontaires en conditions de vie habituelles, dans quatre villes (Lyon et Caen en 2022, Rennes et Bordeaux en 2023). Ces volontaires ont utilisé les équipements Devins et, l'application Xmobisense ou XMobisensePlus. Ce jeu de données fournit une image de l'état des expositions radiofréquences contemporaines, et il constitue une ressource pour un nouveau projet de recherche (développé au paragraphe 2 ci-dessous). Le travail consiste à mettre en forme, organiser et sélectionner un grand nombre de mesures de différentes natures (mesures de puissance émise par le smartphone en appel vocal et hors appel vocal, tel qu'enregistré par le Devin, informations télécom et usages issus d'Xmobisense, géolocalisation). Durée estimée 18 mois (T0 à T0+18).

2. Le second objectif porté par le CEA Léti vise à **définir des scénarios type d'exposition EM** (ex appel vidéo sous conditions favorables de couverture, ou au contraire un usage à faible débit mais impactée par une liaison radio dégradée). Ces scénarios seront identifiés à partir de différentes métriques (rythme du signaling bref, structure des variations des niveaux) qui permettront de catégoriser et discriminer voire catégoriser des usages (ex. distinguer des appels voix ou voix sur IP, de la navigation internet d'envoi de fichiers...). Enfin l'apprentissage d'un réseau de neurones supervisé sera testé en l'entraînant sur une partie du jeu de données fournis par le CIRC . Durée estimée 24 mois (T0 à T0+24).

3. Enfin le dernier objectif porté par TPT, consiste à caractériser la relation entre les métriques de RSRP, RSSI et la puissance RF émise ; ceci à l'aide du système DEVIN, d'un mobile à trace NEMO et de l'Application Xmobisense mis en œuvre simultanément dans différentes configurations d'usage (appel voix, appel vidéo, transfert de fichiers par FTP, ...)

et différents environnements (urbain/rural, métro/fixe). La caractérisation des paramètres gouvernant la relation statistique entre les différentes métriques est donc nécessaire pour une meilleure maîtrise et une meilleure prédiction des expositions. Cette étape servira également de validation des résultats du second objectif. Durée estimée 12 mois (T0+6 à T0+18).

Partenariat

CEA - LAPCI

Responsable de l'équipe : M. Serge Bories

CIRC - ENV

Responsable de l'équipe : Mme Isabelle Deltour

Télécom Paris - Chaire C2M

Responsable de l'équipe : M. Joe Wiart

Résumé MAG - 2024_EST_179

La mélioïdose : une maladie à considérer en région Antilles-Guyane

Mme Karine Laroucau

Anses - Laboratoire de Santé Animale de Maisons-Alfort 23, avenue du Général de Gaulle -

Maisons-Alfort

Projet complet - 36 mois

Budget : 199 680 € TTC

Objectif détaillé

La mélioïdose, maladie infectieuse opportuniste endémique en Asie du Sud et du Sud-Est ainsi que dans le nord de l'Australie, est due à l'exposition environnementale à la bactérie tellurique *Burkholderia pseudomallei* (Bpm). La contamination des humains et des animaux a lieu par inhalation, ingestion ou contact cutané. Le diagnostic et le traitement sont complexes en raison de l'absence de caractéristiques cliniques pathognomoniques et de la résistance de Bpm à divers antibiotiques. Des facteurs de risque (e.g. diabète, maladies chroniques) accroissent la susceptibilité à la bactérie. Les modèles estiment à environ 165000 le nombre annuel de cas de mélioïdose dans le monde et 89000 décès, une mortalité comparable à celle de la rougeole. Toutefois, en raison d'un manque de sensibilisation des **médecins, de l'insuffisance** d'outils de diagnostic, et de la diversité clinique de la maladie (qui peut être chronique ou aiguë), ce nombre est probablement sous-estimé. Les **phénomènes météorologiques extrêmes (tempêtes, inondations...)** exacerbés par le réchauffement climatique favorisent la dissémination spatiale de la bactérie, ainsi que **l'exposition des hôtes, entraînant une augmentation des cas.**

En Afrique, en Amérique latine et dans les Caraïbes, les signalements de cas et les preuves environnementales augmentent. Depuis 1993, 21 cas humains ont été recensés aux Antilles ou de retour d'un séjour aux Antilles, tandis qu'en Guyane, aucun cas n'a été signalé à ce jour contrairement aux pays voisins. Notre projet "One Health" vise à évaluer la situation de la mélioïdose dans la région Antilles-Guyane avec (i) des analyses sérologiques dans les populations humaines et animales afin d'évaluer l'exposition et documenter des cas, et (ii) la **réalisation de prélèvements environnementaux pour tenter d'isoler Bpm.** Ces données doivent permettre **d'informer et sensibiliser les populations locales sur cette maladie très sévère.**

Originalité et/ou caractère novateur du projet

Une étude préliminaire réalisée par ce consortium, reposant sur un screening sérologique **à l'aide d'un test commercial chez différentes espèces animales** en Guyane, Martinique et Guadeloupe, a révélé des animaux séropositifs, suggérant une exposition à Bpm. Dans **2 élevages caprins, une étude ciblée (suivi de la réponse sérologique, de l'excrétion fécale, et de la contamination du sol)** a confirmé la présence de Bpm et permis l'isolement d'une souche environnementale. L'étude moléculaire des souches disponibles provenant des Caraïbes a par ailleurs permis d'identifier des marqueurs d'intérêt qui doivent désormais être validés.

Il existe aussi des arguments en faveur d'une étude en Guyane : 1) Une réanalyse des dossiers médicaux du CHU (2012-2018) a révélé trois cas possibles suite à l'isolement de *Burkholderia* sp. 2) Les orpailleurs constituent une population à risque, car ils sont originaires de régions du Brésil (dont Amapa et Ceara) où des cas de mélioïdose ont été signalés, et sont exposés à des environnements boueux. Leur mobilité géographique et le transport de bétail depuis le Brésil vers les sites d'orpaillage pourraient aussi faciliter l'introduction et la propagation de Bpm.

L'absence d'études sur la mélioïdose dans la région Antilles-Guyane entrave l'évaluation du risque en termes de santé publique, tant pour les populations humaines que pour les animaux. Ce projet "One Health" vise à consolider nos résultats préliminaires en combinant sérologie et recherche environnementale, et en élargissant le projet à l'analyse de sérums humains, permettant de maximiser la collecte et l'agrégation des données. L'objectif est de mobiliser des professionnels de la santé humaine et animale afin de dresser un état des lieux sur la situation de la mélioïdose, une maladie dangereuse, émergente et réglementée (en France, Bpm est classée comme Micro-organisme hautement pathogène par l'ANSM).

Questions de recherche

ABIO 2 - Exposition de la population générale et/ou des travailleurs aux bioaérosols et à différents agents biologiques (micro-organismes, toxines, moisissures, pollens, virus et bactéries pathogènes).

ABIO 3.1 - Comportement et devenir des agents pathogènes dans divers compartiments de l'environnement et effets potentiels sur la santé humaine : étude dans les milieux aquatiques et les sols

CCLIM 1.2 - Impacts du dérèglement climatique sur la santé humaine, incluant les impacts sur la santé mentale, et des écosystèmes : impacts indirects via le développement de maladies émergentes, d'amplification des allergies prenant en compte également les dysfonctionnements ou les inaccessibilités des infrastructures de santé.

Ce projet mobilise une équipe pluridisciplinaire autour d'une maladie émergente et négligée. Il s'inscrit dans les thèmes Agents biologiques (ABIO2 exposition de la population générale/des travailleurs à des bactéries pathogènes ; ABIO3 étude des agents pathogènes dans les milieux aquatiques et les sols) et Vecteurs, changement climatique et santé (CCLIM 1.2 impacts indirects via le développement de maladies émergentes). Le projet doit permettre de quantifier l'exposition des populations humaines et animales (enquêtes sérologiques) et d'évaluer la présence dans les sols et l'eau de la bactérie pathogène (méthodes moléculaires, culture) pour aider à l'évaluation du risque sanitaire, et guider le contrôle et la prévention de la maladie dans un contexte climatique favorable à l'expansion géographique de la mélioïdose, en particulier en milieu tropical.

Description des méthodes mises en œuvre

Le projet de 3 ans inclut 4 modules :

Module 1 (mois 1-30) : Screening sérologique chez l'homme (n=800) et l'animal (n=1500) et diagnostic microbiologique. Les sérums, accessibles par le biais de médecins et vétérinaires locaux, proviendront i) d'agriculteurs et vétérinaires volontaires, ii) de cohortes existantes (e.g. orpailleurs en Guyane (n=500)), et iii) de ruminants et équidés prélevés lors de campagnes de prophylaxie. Ils seront analysés à l'aide d'un test ELISA commercial et les sérums positifs seront confirmés avec un panel d'antigènes spécifiques. Les individus séropositifs symptomatiques feront l'objet d'analyses complémentaires (culture/PCR).

Module 2 (mois 6-30) : Screening environnemental. (i) Des sols (50 sites par département ; 3 points par site ; 2 saisons) et de l'eau (30 par département ; 2 saisons) seront collectés de

façon aléatoire dans les 3 départements. (ii) Des collectes aussi seront réalisées dans l'environnement des patients (n=10) et animaux séropositifs (n=30 fermes) répartis dans les 3 départements. Les échantillons de sols et d'eau seront analysés par culture et PCR.

Module 3 (mois 24-36) : Typage moléculaire. Les échantillons positifs seront caractérisés par MLST et les souches de Bpm (Modules 1 & 2) feront l'objet d'un séquençage complet. Des marqueurs moléculaires spécifiques (Guyane, Caraïbes) seront recherchés et un outil de typage sera développé afin d'aider à l'identification des cas locaux.

Module 4 (mois 24-36) : Agrégation des données et campagne d'information et de prévention à destination des agriculteurs et professionnels de santé (vétérinaires, médecins généralistes et spécialistes). Tables rondes multi-partenaires (GDS, ARS...) pour évaluer les actions de santé publique à mener auprès de la population générale.

Partenariat

ANSES - Laboratoire de santé animale

Responsable de l'équipe : Mme Karine Laroucau

IRD - UMR 242

Responsable de l'équipe : Mme Emma Rochelle-Newall

Institut Pasteur Guadeloupe - Laboratoire de Microbiologie clinique, CHUG, Institut Pasteur, Inserm

Responsable de l'équipe : M. Sebastien Breurec

Centre hospitalier de Cayenne - Département Recherche Innovation Santé Publique, Inserm1424

Responsable de l'équipe : M. Yann Lambert

Institut de Recherche Biomédicale des Armées - Unité de bactériologie, UMR-MD1-Inserm1261

Responsable de l'équipe : Mme Fabienne Neulat-Ripoll

Résumé MoBioM-Epi - 2024_RF_002

Liens entre usage de téléphones mobiles, altération de biomarqueurs et survenue ultérieure de cancers dans la cohorte UK-Biobank.

Mme Isabelle Deltour

Centre International de Recherche sur le Cancer Section Environnement et Radiation - Lyon cedex 8

Projet complet - 24 mois

Budget : 199 473 € TTC

Objectif détaillé

Ce projet interdisciplinaire propose d'utiliser les données de la cohorte UK Biobank pour étudier les éventuelles relations entre l'usage de la téléphonie mobile, la modification de biomarqueurs pour lesquelles l'effet des RF a déjà été questionné dans la littérature scientifique et le risque de certains néoplasmes également suspectés d'être associés à une exposition aux ondes radiofréquences (RF) (tumeurs cérébrales, abdominales et cancers de la peau).

Originalité et/ou caractère novateur du projet

La cohorte « UK Biobank » est une cohorte de plus de 500 000 personnes âgées de 40 à 69 ans à leur inclusion entre 2006 et 2010. Des dosages de biomarqueurs ont été effectués pour la quasi-totalité de la cohorte à l'inclusion et des informations sur le mode de vie ont été recueillies, dont l'usage de téléphones mobiles, la consommation de tabac, la situation sociale etc. Les événements de santé sont enregistrés au cours du temps.

Dans un premier travail exploratoire, Zhang et collègues ont analysé le risque de 25 sites de cancer dans cette cohorte en fonction de l'usage de téléphones mobiles. Ce travail a rapporté des excès de risque pour certains cancers de la zone abdominale (prostate, vulve, vessie) et des cancers de la peau non mélanocytiques. Ni les femmes, ni les hommes utilisateurs de mobiles n'avaient d'excès de risque de gliome par rapport aux non-utilisateurs (620 cas H+F, OR H = 0.9 CI : 0.7,1.2 ; OR F = 0.8 CI : 0.6,1.1). Bien que les questionnements scientifiques (CIRC, ANSES,...) se concentrent actuellement sur les longues utilisations et les usages les plus intensifs, aucun résultat par niveau ou par durée d'utilisation n'a été présenté pour ces cancers dans ce travail.

De nombreux marqueurs (de stress oxydant, d'inflammation, et de génotoxicité notamment) ont été étudiés en lien avec la téléphonie mobile. Les résultats ne sont pas toujours très clairs, principalement en raison des faibles effectifs étudiés. Par ailleurs, le lien entre la modification des marqueurs et l'apparition de cancers n'a pas été étudié. Comme souligné par les rapports de l'Anses sur les RF, très peu de travaux, souvent de mauvaise qualité, sur l'effet des RF sur d'éventuelles modifications de biomarqueurs ont porté sur l'humain.

La cohorte UK-BioBank offre une opportunité unique de pouvoir étudier conjointement l'effet de l'usage de mobiles sur la modification de biomarqueurs et, d'analyser à distance de ces dosages, si les personnes - ayant leurs marqueurs modifiés - ont déclaré un cancer, compte tenu de leurs autres facteurs de risque. Les analyses seront menées en tenant compte de la littérature (modélisation de l'exposition, catégorisation des tumeurs).

L'interdisciplinarité entre l'épidémiologie et la biologie représente un défi par rapport à d'autres travaux antérieurs.

Questions de recherche

RFES 1.1 - Études in vitro, in vivo ou cliniques sur les mécanismes d'action de l'exposition (aiguë et chronique) du vivant aux radiofréquences, aux niveaux moléculaire et cellulaire, en tenant compte des évolutions d'utilisation de fréquences liées aux nouveaux usages et nouvelles technologies de communication. Les études s'intéressant aux bandes de fréquences nouvellement identifiées (pour la 5G par exemple) et encore peu étudiées (3,5 GHz, 26 GHz et au-delà, notamment) sont prioritaires.

RFES 2.2 - Études épidémiologiques sur les effets éventuels des radiofréquences sur la santé, notamment : les cancers, les troubles de la fertilité, les maladies neurodégénératives, les troubles du rythme circadien et les effets à long terme des modifications physiologiques du sommeil. On s'intéressera particulièrement aux populations potentiellement les plus vulnérables aux radiofréquences (sujets épileptiques, enfants, etc.) ou moins bien documentées (femmes enceintes, sujets âgés) ou particulièrement exposées (travailleurs).

Ce projet adresse les questions de recherche d'effets physiologiques ou sanitaires des radiofréquences, en particulier les aspects RFES 2.2 études épidémiologiques du risque de cancer et RFES 1.1 études cliniques sur les mécanismes d'actions au niveau cellulaire.

Description des méthodes mises en œuvre

Notre projet mobilise les données déjà disponibles de UK Biobank pour lesquelles le CIRC a toutes les autorisations. 501 499 personnes ont renseigné leur historique d'utilisation du mobile et leur volume d'appels (heures par semaine), et plus de 100 000 d'entre elles ont répondu à nouveau à ces questions en 2012-2014-2019.

Concernant l'analyse des biomarqueurs, différents travaux antérieurs nous ont déjà permis de sélectionner a priori deux marqueurs d'intérêt : la longueur des télomères (marqueur d'immortalisation des cellules et de l'âge biologique) et la protéine C-réactive (marqueur d'immunosuppression). 472 478 participants ont eu une mesure de la longueur des télomères dans les leucocytes lors de leur inclusion dans la cohorte et un sous-échantillon (N=1 412) une 2ème mesure en 2012-13 ; la situation est similaire pour la protéine C-réactive. La sélection de marqueurs sera étendue sur base de la littérature scientifique sur les RF et de leur disponibilité dans la cohorte. Nous étudierons si les modulations des niveaux des marqueurs sont associées à l'usage de mobiles. Ensuite, nous analyserons la relation entre les niveaux sanguins des marqueurs et le risque de cancer, après ajustement sur les variables pertinentes (âge, ethnicité, tabagisme...).

Nous analyserons aussi le risque de tumeurs du cerveau, de tumeurs abdominales et de cancers de la peau en fonction de l'usage du mobile et en particulier : le risque de gliome, (bas grade, haut grade et glioblastome), méningiome et neurinome acoustique, les cancers de la vessie, de la prostate et de la vulve, et les cancers de la peau non mélanocytiques ; si possible, en fonction de leur localisation corporelle détaillée. Des modèles statistiques de type « time to event » dépendant du temps, appropriés à l'analyse de cohortes, seront utilisés et l'apport de modèles causaux à la question de recherche sera investigué. Une description des déterminants socio-économiques de l'exposition sera menée.

3 Work Packages

Le CIRC coordonne le projet et dirige le WP Cerveau

L'INSERM U1086 / Université de Caen dirige le WP Abdomen

Le CEA-SyMMES dirige le WP Biomarqueurs

Calendrier : 2 ans. Les données sont disponibles et toutes les autorisations nécessaires ont déjà été obtenues au CIRC.

Partenaires

- Equipe de recherche internationale CIRC coordonne le projet et le WP cerveau. Cette équipe de recherche apporte sa très grande expérience en recherche sur les radiofréquences et en analyses de cohortes. Chercheurs (I Deltour, J Schüz) + Statisticien + Postdoc. Le CIRC garantit la faisabilité du projet et réalise les analyses épidémiologiques des risques de tumeurs du cerveau et toutes les analyses statistiques des biomarqueurs (sous la direction du WP biomarqueurs)

- Equipe de recherche française INSERM U1086 Université de Caen dirige le WP Abdomen. Cette équipe de recherche apporte sa grande expérience en recherche sur les déterminants socio-économiques des risques de cancer et en exposition environnementale. Chercheur (O Dejardin) + ingénieur d'étude

- Equipe de recherche française CEA-SyMMES dirige le WP Biomarqueur. Cette équipe est experte dans la quantification des biomarqueurs **d'expositions dans des études humaines**, animales et in vitro. Les mécanismes étudiés sont principalement la génotoxicité, le stress oxydant et l'épigénétique. Chercheur : T Douki

Montant approximatif de la demande de subvention prévue : 200,000 €

Partenariat

CIRC - Branche épidémiologie de l'environnement et des modes de vie

Responsable de l'équipe : Mme Isabelle Deltour

Université de Caen - INSERM U1086-Université de Caen

Responsable de l'équipe : M. Olivier Dejardin

CEA - IRIG/DIESE/SyMMES/CIBEST, UMR 5819 CEA-CNRS-UGA

Responsable de l'équipe : M. Thierry Douki

Etude longitudinale sur le rôle des expositions environnementales multiples dans les inégalités sociales dans **l'asthme (étude EGEA)**

Mme Sofia Temam

Fondation d'entreprise MGEN pour la santé publique 3 square Max Hymans Paris 15e - PARIS

CEDEX 15

Projet complet - 36 mois

Budget : 229 784 € TTC

Objectif détaillé

The main aim is to assess the contribution of multiple environmental exposures to social inequalities in asthma (environmental justice). The project is based on the central hypothesis that longitudinal studies, allowing residential self-selection bias (RSSB) to be taken into account, are warranted to better understand the role of multiple environmental exposures in the generation or maintenance of social inequalities in asthma. The specific aims are:

- 1/ To evaluate the RSSB, we will a/ identify the individual determinants (baseline health status, demographic, socioeconomic, lifestyle, occupational history) of residential mobility of adults and children (who moves?) and b/ characterize the general external exposome profiles (social deprivation, air pollution, built environment, access to services, etc.) associated with moving using cluster-based analysis (how do they move?).
- 2/ To evaluate the interplay between social and environmental factors and asthma, we will study the identified residential exposure profiles in association with changes in asthma outcomes, considering how they move.

Originalité et/ou caractère novateur du projet

Studies on social inequalities in asthma have mainly relied on cross-sectional data that **limit the consideration of RSSB (Hedman 2012)**. This bias can occur when people's health or health-related behaviors (HRB) influence their choices to move to a particular area (VanLenthe 2007). It is likely to occur in the context of asthma, e.g., adults with asthma are more likely to have knowledge about the environmental triggers of their disease than people without asthma and may seek to avoid certain places of residence (Gautier 2017). Thus, it is important to understand such predictors of mobility into different types of neighborhoods to disentangle the effects of the RSSB from a hypothesized causal relationship between neighborhood context and health. It is known that socioeconomic factors are an important determinant of residential mobility, e.g., high socioeconomic position (SEP) people are more **likely to afford to live in "favorable"** environment than lower SEP people. However, the role of health and HRB is not well-understood, especially in relation with SEP which could increase social inequalities (Saucy 2023). Also, structural geographic factors, e.g., those patterning at a regional scale, are important to consider (Feuillet 2023) but understudied in the context of asthma.

Moreover, although studies found that living in socially deprived neighborhoods was associated with poor asthma outcomes, independently of the individual SEP (Temam 2019), the mechanisms of these social inequalities remain insufficiently understood. In addition to the social factors per se, the living environment has emerged as an important novel determinant to explain social inequalities in asthma. Compared to high SEP people, low SEP people may be exposed to more environmental hazards that trigger asthma (differential exposure hypothesis) (Temam 2017). In this context, the exposome concept which is an ideal to study complex multifactorial diseases such as asthma (Guillien 2021), offers also new avenues to better understand mechanisms of social inequalities in health (Deguen 2022). And to date, few studies have examined the interplay of social factors with the multitude of a priori protective or at-risk environmental exposures involved in asthma.

Questions de recherche

ACHIM 3.1 - Prise en compte et caractérisation des multi-expositions et co-expositions en lien avec l'exposome : impacts des expositions à des substances chimiques en milieu de travail et en population générale, multi-expositions ou expositions cumulées, y compris médicamenteuses, à d'autres types de nuisances (nuisances physiques, biologiques, relationnelles, organisationnelles...).

QT 5 - Prise en compte des approches multifactorielles (genre, situations socioéconomiques, facteurs géographiques, culturels et comportementaux...) des inégalités d'expositions aux risques sanitaires et environnementaux. Justice environnementale.

QT5: our interdisciplinary project will contribute to better understand the role of multiple environmental exposures in generating or maintaining social inequalities in asthma (environmental justice) thanks to a longitudinal exposome design well suited to examine the causal effect of neighborhood environments on asthma outcomes.

Our work will also contribute to better understand how health and health-related factors may drive “choices” of place of residence and thus exacerbate social inequalities in asthma.

ACHIM3: our interdisciplinary project will contribute to clarify the role of the external exposome on the evolution of respiratory health by using micro- and macro-level data to assess the joint effect of multiple environmental exposures and by identifying specific socioenvironmental profiles of exposure associated with poorer asthma outcomes.

Description des méthodes mises en œuvre

POPULATION: the project is based on the Epidemiological study of the genetics and Environment of Asthma (EGEA) including at baseline a group of asthma cases and their first degree relatives and a group of population-based participants (EGEA1, 1991-95, n=2,047), with a long follow-up (30 year follow-up ongoing), a high response rate (79% in the 20-year follow-up), an in-depth characterization of asthma and a large set of high-quality data collected repeatedly (sociodemographic, lifestyle, anthropometric, occupational and environmental variables).

MAIN PLANNED TASKS:

- Life course residential mobility –2024: identification and geocoding of all moving events of the participants, using the residential history (EGEA3) or mailing address at each follow-up. Additional information about reasons of residential mobility will be collected at EGEA4.

- Residential external exposome profiles –2024-25: characterization of the external exposome profiles resulting from residential moving by assessing the social and environmental exposures of the participants for each residential address, while considering

the spatiotemporal dimension of certain exposures (e.g., changes in the built environment or in neighborhood deprivation). This task will benefit from a large set of exposures already assessed in EGEA by GIS-based models or by questionnaires.

- Longitudinal asthma phenotypes –2025-26: characterization, in a longitudinal perspective, of two asthma phenotypes (changes in asthma symptom score and in asthma control) based on validated international definitions (Pekkanen 2005, Schatz 2006).

- Analyses –2024-26:

Aim 1a/ Study of the effects of individual characteristics (health status, demographic, socioeconomic, lifestyle and occupational history) on residential moving through logistic regression.

Aim 1b/ Characterization of groups of participants according to the residential external exposome profiles, based on similarities of residential moving (socially stable/upward/downward; healthy/hazardous environment, etc.) through cluster-based analysis.

Aim 2/ Study of the impact of residential exposure profiles identified on changes in asthma symptom score/asthma control, while considering the RSSB through marginal structural models (Bedard 2017).

Partenariat

Fondation d'entreprise MGEN pour la santé publique - FESP-MGEN

Responsable de l'équipe : Mme Sofia Temam

INSERM UMRS 1018 - Centre de Recherche en Epidémiologie et Santé des Populations (CESP), Equipe d'Epidémiologie Respiratoire Intégrative

Responsable de l'équipe : Mme Raphaëlle Varraso

INSERM Institute for Advanced Biosciences - Team of Environmental Epidemiology Applied to Reproduction and Respiratory Health

Responsable de l'équipe : Mme Valérie Siroux

Université de Caen Normandie - UFR SEGGAT, UMR CNRS 6266 IDEES

Responsable de l'équipe : M. Thierry Feuillet

Equit'Health - Equit'Health

Responsable de l'équipe : Mme Severine Deguen

ISGLobal - ISGLobal

Responsable de l'équipe : Mme Judith Garcia-Aymerich

Résumé PEMOC'H - 2024_EST_125

Perturbation neuro/Endocrinienne chez les Mollusques et Crustacés : Hypothèses fonctionnelles

M. Thomas Knigge
Université du Havre 25, rue Philippe Lebon - Le Havre

Projet complet - 36 mois
Budget : 187 928 € TTC

Objectif détaillé

Le système endocrinien des mollusques et crustacés est, dans les grandes lignes, bien décrit avec des glandes et hormones bien spécifiques. La glande optique (GO) des céphalopodes ou l'organe X/glande du sinus (XO/GS) des crustacés sont considérés comme l'équivalent de l'hypophyse des vertébrés. Toutefois, les hormones des invertébrés sont différentes de celle des vertébrés (comme les ecdystéroïdes des arthropodes par exemple) et ne partagent pas les mêmes récepteurs nucléaires. Il est donc improbable que les substances connues comme perturbateurs endocriniens (PEs) chez les vertébrés activent les voies de signalisation des invertébrés. La signalisation neurohormonale étant dominante chez les invertébrés, il est fortement probable que des substances neuroactives (SNAs) constituent des PEs pour les mollusques et crustacés. Le programme PEMOC'H propose d'augmenter notre compréhension des effets de ce type de potentielle perturbation endocrinienne (PE) sur la voie neuroendocrinienne au sein des céphalopodes et crustacés, maillons écologiques importants des écosystèmes aquatiques. Les objectifs définis sont 1/ la création d'une « boîte à outils » permettant d'évaluer les altérations dues aux SNAs, 2/ définir les LOEC sur la voie neuroendocrinienne pour les SNAs sur modèles invertébrés aquatiques et 3/estimer les effets cocktails des SNAs.

Originalité et/ou caractère novateur du projet

De nombreuses études d'écotoxicologie sur l'impact des PEs chez les invertébrés se sont focalisées sur la reproduction en présumant un rôle des hormones stéroïdes, rôle très controversé chez ces espèces.

Nous proposons une approche innovante pour analyser la causalité endocrinienne des supposés PEs chez des invertébrés afin de valider la nocivité des substances et leur potentiel PE dans les milieux aquatiques contaminés. Cette étude intégrative couvrira les niveaux moléculaire (gènes, omics), histologique, biochimique et neuro/hormonale jusqu'aux effets physiologiques afin de proposer des Adverse Outcome Pathways (AOPs).

L'originalité porte sur l'utilisation :

1) D'espèces appartenant aux deux taxa invertébrés ayant les systèmes nerveux et hormonaux parmi les plus évolués : un céphalopode (*Sepia officinalis*) et deux décapodes (*Carcinus maenas*, *Procambarus clarkii*). Ces espèces euryhalines permettent de couvrir le continuum eau douce-marine.

2) De micropolluants pharmaceutiques (antidépresseurs et psychostimulants) en tant qu'inducteurs d'une dérégulation neuro-hormonale (modulateurs de la sérotonine (5-HT),

noradrénaline et dopamine (DA)) et présents dans les eaux ainsi que d'autres substances décrites comme SNAs. Ces substances psychoactives étant présentes en faibles concentrations dans les eaux superficielles, leurs effets cumulatifs seront également étudiés.

3) **D'approches omics et d'expression de gènes, afin d'identifier des modifications** induites par les SNAs sur les voies de biosynthèse des amines biogènes dans les glandes GO (céphalopode) et XO/SG (crustacés).

Questions de recherche

PE 1 - Développement de méthodes permettant d'investiguer des mécanismes d'action (y compris épigénétiques).

PE 3 - Étude de la toxicologie des faibles doses et/ou de la relation dose/effet.

PE 4 - Étude des effets cocktails.

PE 1 : Développement d'une « boîte à outils » en écotoxicologie permettant de détecter la perturbation endocrinienne à différents niveaux chez les mollusques et crustacés aquatiques

PE 3 : Détermination avec précision des concentrations environnementales des SNAs induisant un effet (LOEC) sur des espèces mollusque et crustacé.

PE 4 : Etude des effets cocktails additifs ou synergiques des SNAs sur des mollusques et crustacés.

Au jour d'aujourd'hui, nous constatons un manque de méthodes permettant de prouver les mécanismes responsables d'une PE chez les mollusques ou les crustacés. Des études montrent qu'une telle PE dans ces taxa émane des effets des SNAs sur la synthèse et libération des neurohormones, y compris la fonction des amines biogènes en tant que hormones. Même si les SNAs sont présentes dans les eaux seulement à faibles concentrations, leur concentration totale peut atteindre de l'ordre du $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Les effets des antidépresseurs sont supposés être additifs. De plus, les SNAs peuvent activer différentes voies sérotoninergiques et dopaminergiques. Par conséquent, il est pertinent d'étudier les mélanges de ces substances.

Description des méthodes mises en œuvre

Nous combinerons des expositions et analyses en laboratoire et des prélèvements sur le terrain. L'approche expérimentale inclut des témoins positifs (amines biogènes) et négatifs (inhibition pharmacologique ou chirurgicale). Pour les trois espèces, des transcriptomes exploitables sont disponibles.

Paramètres mesurés :

- Dosage amines biogènes (5-HT, DA) par ELISA et/ou UPLC
- Expression gènes relatifs aux voies de synthèse des neurotransmetteurs & neurohormones (hormones de la concentration/dispersion des pigments ; hormone hyperglycémiant des crustacés, CHH ; hormone de l'inhibition de la mue ; FMRFamides)
- Analyses omics de GO et XO/SG
- Localisation et activité physiologique de neurones sérotoninergiques et dopaminergiques (électrophysiologique par enregistrements intracellulaires et sondes voltamétriques ; immunomarquage)
- Dosage CHH, 20-hydroxyecdysone, crustacean erythropore concentrating hormone, FMRFamide par ELISA

- Paramètres physiologiques : concentration/dispersion des pigments dans les chromatophores (seiches & crabes), métabolisme énergétique, osmorégulation, mue, gamétogénèse, comportements

- Paramètres du métabolisme énergétique (respirométrie, analyses biochimiques : glycémie, métabolisme aérobie et anaérobie), glande digestive (lactate déshydrogénase, citrate synthase, enzymes de stress oxydatif), branchies (osmorégulation), gonades (histologie quantitative) sur des crabes issus des milieux contaminés (STEP du Havre, Caen, Montpellier)

Durée du projet : 3 ans

Année 1 : Expositions pour détermination des LOEC ; début d'analyses omics expo. vs. témoin ; détermination des gènes d'intérêt

Année 1 et 2 : **Expositions d'1 mois (avec témoin pos./nég.) aux substances psychotropes seules et en mélange ; échantillonnage et analyses. Prélèvements en terrain et analyses.**

Année 3 : Analyses statistiques et AOPs ; valorisation (articles et congrès)

UMR-I02 SEBIO : expertise en endocrinologie de crustacés, PE, histologie et protéomique. 3 ECs, 1 PT

UMR EthoS : spécialisée en neurophysiologie/éthologie. 2 ECs, 1 PT

UMR 9190 Marbec : expertise en osmorégulation (poissons, crustacés) et rôle du système endocrinien et PE. 2 ECs, 2 PTs.

Laboratoire BIOSSE : expertise en écotox aquatique (crustacés et mollusques) par une approche moléculaire des mécanismes d'acclimatation et adaptation des invertébrés. 2 ECs

Partenariat

Université du Havre - UMR-I02

Responsable de l'équipe : M. Thomas Knigge

Université de Caen - UMR EthoS

Responsable de l'équipe : Mme Cécile Bellanger

Université de Montpellier - UMR 9190 Marbec

Responsable de l'équipe : M. Jehan-Hervé Lignot

Université du Mans - Laboratoire BIOSSE

Responsable de l'équipe : M. Vincent Leignel

Résumé PESTIPREDIS - 2024_EST_129

Conséquences de la dysbiose induite par un cocktail de pesticides sur les barrières intestinale et hémato-encéphalique, ainsi que sur la transformation des cellules épithéliales : rôle préventif des prébiotiques.

Mme Pietra Candela

LBHE rue Jean Souvraz - SP 18 - Lens

Projet complet - 36 mois

Budget : 199 950 € TTC

Objectif détaillé

Nos recherches ainsi que celles d'autres laboratoires sur des animaux indiquent qu'une exposition prolongée à certains pesticides pendant la grossesse altère le microbiote intestinal (MI), ainsi que la barrière intestinale (BI) et la barrière hémato-encéphalique (BHE), tant chez les mères que chez leur descendance. De plus, plusieurs études épidémiologiques sur des cohortes humaines, ont établi un lien entre l'exposition aux pesticides et le développement du cancer colorectal (CCR) (Matich et al, 2021). Un intérêt croissant s'observe quant à l'utilisation potentielle de prébiotiques, tels que l'inuline, ainsi que de postbiotiques comme les acides gras à chaîne courte (SCFAs), tels que le propionate et le butyrate, afin de prévenir la perturbation du MI et le dysfonctionnement de la BI et de la BHE, ainsi que le CCR. Bien que ces études confirment d'une part les dangers des pesticides et d'autre part l'effet préventif des prébiotiques, les mécanismes par lesquels ils agissent sur ces barrières demeurent non élucidés en raison d'incertitudes concernant les relations de cause à effet et la complexité des modèles utilisés, notamment in vitro. Au sein de ce projet, notre objectif est de déterminer les effets d'un cocktail de pesticides, comprenant l'Imazalil (fongicide), le Glyphosate (herbicide) et le Chlorpyrifos (organophosphoré), sur le MI, la BI, la BHE et le développement de CCR. Nous déterminerons la manière dont les SCFAs, atténuer significativement les dysfonctionnements constatés tant au niveau intestinal que cérébral, aussi bien chez les mères que chez leur progéniture. Trois questions principales seront abordées : (i) Quels sont les effets des métabolites microbiens suite à une exposition à un mélange de polluants à faible doses sur la transformation du phénotype intestinal, la perméabilité de la BI et de la BHE?, (ii) Quels sont les mécanismes moléculaires sous-jacents ?, (iii) est ce qu'une intervention précoce par une supplémentation en prébiotiques pourrait atténuer ces effets chez la mère ainsi que la susceptibilité de la progéniture au développement de maladies neuro-inflammatoires et au CCR ?

Originalité et/ou caractère novateur du projet

La nouveauté de ce projet réside dans la compréhension du mode d'action des pesticides et la détermination des cibles de ces molécules, qui seront considérées comme des **biomarqueurs**. L'originalité repose sur l'approche mécanistique proposée combinant 4 modèles humains distincts : (1) un simulateur d'intestin artificiel (SHIME® adulte, pour étudier le MI de la mère, et un baby SHIME® pour étudier le MI de son enfant), (2) un modèle de

cellules Caco-2 et HT29 (pour la BI) (3) cellules épithéliales de colon normal ainsi que des organoïdes de cellules intestinales (pour CCR) et (4) un modèle de co-culture de cellules endothéliales et de péricytes (pour la BHE). Ces modèles seront combinés.

Questions de recherche

CANCER 3 - Identification de facteurs de risques environnementaux ou professionnels des cancers.
ACHIM 1 - Effets sur les écosystèmes et la santé humaine : notamment effets à faibles doses, effets cocktails et relation dose/effet.
ACHIM 5 - Évaluation de l'efficacité des moyens de prévention et de réduction des expositions aux contaminants chimiques présentant un risque pour la santé humaine et les écosystèmes.

ACHM1: Les résultats expérimentaux des Partenaires 2 et 1, mettent en évidence les effets nocifs du Chlorpyrifos sur le MI, la BI et la BHE, tant chez les mères que chez leur progéniture. **L'estimation du risque pour ces populations ne peut pas être directement transposée de ces études car les mécanismes sont difficiles à décrypter in vivo. L'utilisation des modèles in vitro humains permettra la réalisation des courbes doses-effets et l'analyse de l'exposition chronique à des doses faibles des pesticides.**

ACHM5: En comprenant les facteurs prédisposant au déséquilibre du MI et aux maladies associées, telles que le CCR et les maladies dégénératives, des stratégies de prévention peuvent être développées avec un impact majeur en termes de santé publique.

Cancer: démontrer le lien entre l'exposition aux pesticides et le risque de néoplasie colique, et identifier de cibles membranaires en vue de les proposer comme biomarqueurs et/ou des stratégies thérapeutiques potentielles.

Description des méthodes mises en œuvre

Objectif 1 (M1-M16): nous confirmerons nos résultats préliminaires et éluciderons les mécanismes par lesquels les pesticides induisent : (a) une dysbiose et des (b) perturbations sur la BI, la (c) transformation du phénotype cellulaire, et (d) des perturbations de la BHE chez les femmes enceintes. Tâche 1: Les pesticides isolés ou en combinaison (à la dose **journalière admissible**) seront inclus dans l'alimentation du SHIME® adulte 1 fois par jour pendant 30 jours. Après exposition chronique à ce cocktail, les échantillons seront collectés et analysés à J0 (contrôle), J15 et J30 (effet chronique). Tâche 1.2 La composition du MI (culture bactérienne, qPCR, NGS) et les métabolites bactériens (dosage GC) seront analysés dans les différents compartiments du SHIME®. Les pesticides seront dosés (prestation-IMITOX (LC-MS/MS)). Tâche 2 : Effet de la **perturbation du MI sur l'intégrité de la BI et de la BHE** (partenaires 1 et 2) sera évaluée (test MTT, TEER, FITC-dextran..). Tâche 2.1 : **L'expression et la localisation des protéines des jonctions serrées** dans les deux modèles seront étudiées (qRT-PCR et Western blot et immunocytochimie). Tâche 3: Évaluer l'impact de la dérégulation du MI sur l'état du phénotype épithélial (Partenaire 3). Les processus cellulaires tel que la prolifération sera évaluée par les tests de MTT, et la cytométrie en flux. L'apoptose par l'annexe V, la migration par chambre de boyden. Le sécrétome sera analysé par Kit, et qPCR, et la morphologie cellulaire par Immunofluorescence. L'étude des voies de signalisation se fera sur analyse transcriptomique, et la validation des cibles se fera par les techniques de shRNA et/ou CRISPR-9. Objectif 2 (M8-M16) : Évaluer la stratégie préventive nutritionnelle (tous les partenaires) : tâche 4: après traitement de l'inuline, dans l'alimentation du SHIME®, (seule (contrôle) ou en co-exposition avec le cocktail de pesticides,

notre focus se tournera vers l'analyse de la composition du MI et la concentration de ses métabolites (dosage des métabolites microbiens GC en collaboration avec l'Université de Mons) chez les mères. Nous examinerons les mécanismes moléculaires et cellulaires par lesquels ces métabolites améliorent l'intégrité de la BI et de la BHE et réduisent le risque du développement du CCR (étude des voies de signalisation et validation des cibles cellulaires identifiés). Objectif 3 (M14-M24): nous évaluerons si une intervention précoce (traitement inuline) sur le MI peut réduire la susceptibilité de la progéniture (à partir d'un baby SHIME) au développement de maladies neuro-inflammatoires et au CCR (même techniques que obj.1-2).

Partenariat

Université ARTOIS - LBHE

Responsable de l'équipe : Mme Pietra Candela

Université UPJV - PERITOX

Responsable de l'équipe : Mme Hafida Khorsi-Cauet

UPJV - LPCM

Responsable de l'équipe : Mme Halima Ouadid-Ahidouch

Résumé PYRCOM - 2024_EST_184

Insecticides pyréthrinoides et développement cérébral : effets sur la différenciation des oligodendrocytes et la myélinisation

Mme Anne-Laure Schang
Université Paris 5 Faculté de Pharmacie de Paris - Paris

Projet complet - 36 mois
Budget : 189 000 € TTC

Objectif détaillé

Les pyréthrinoides sont des insecticides à large spectre utilisés pour lutter contre de nombreux nuisibles, tant dans le cadre domestique que pour le traitement des cultures. Moins toxiques que les précédents insecticides (organochlorés, organophosphorés), leur utilisation s'est généralisée ces dernières décennies, conduisant à l'exposition généralisée de la population (Etude Esteban, ARS 2021, Etude Pesti'home, Anses 2019). Peu persistants, mais omniprésents, les pyréthrinoides contaminent la population principalement par voie orale et franchissent les barrières physiologiques, notamment placentaire et hématoencéphalique, sous forme native ou métabolisée (Elser et al., Crit Rev Toxicol 2022 ; Starr et al., Toxicology 2014). Ces pesticides soulèvent des inquiétudes quant à une possible neurotoxicité développementale (NTD). Ils pourraient ainsi participer à l'apparition de troubles neurodéveloppementaux, qui touchent 5% des naissances par an (données HAS) et représentent un problème de santé publique majeur. Ainsi, dans la cohorte PELAGIE, une exposition infantile aux pyréthrinoides, notamment à la deltaméthrine, a été associée à un déficit cognitif à 6 ans (Viel et al., Environ Int 2015). Bien que les données restent limitées chez l'Homme, des études expérimentales soutiennent l'hypothèse d'une NTD des pyréthrinoides (Andersen et al., Environ Res 2022 ; Curtis et al., PNAS Nexus 2023). Il reste cependant de nombreuses questions en suspens, en particulier concernant les événements cellulaires et moléculaires sous-tendant ces effets toxiques.

Plusieurs mécanismes pourraient contribuer à la NTD des pyréthrinoides. Ils pourraient notamment agir en tant que perturbateurs endocriniens en affectant la production des hormones thyroïdiennes, qui jouent un rôle crucial au cours du développement cérébral (Andersen et al., Environ Res 2022 ; Zhang et al. Chemosphere 2022). Leurs effets délétères pourraient également reposer sur l'induction d'une neuro-inflammation impliquant en premier lieu l'activation des cellules immunitaires résidentes du système nerveux central (SNC) : la microglie (Hossain et al., Toxicol Sci 2017). Moins étudiés que les neurones dans les études de NTD, les oligodendrocytes, cellules myélinisantes du SNC, présentent un intérêt majeur dans le cadre de ce projet : d'une part, leur mise en place au cours du développement dépend étroitement de la signalisation thyroïdienne, et d'autre part, les précurseurs d'oligodendrocytes sont particulièrement vulnérables à la neuro-inflammation, qui peut perturber leur différenciation et compromettre la myélinisation du SNC. De plus, une étude récente a mis en évidence des effets toxiques de la deltaméthrine sur des oligodendrocytes in vitro (Koch et al., Front Toxicol 2022). Ainsi, la NTD des pyréthrinoides pourrait impliquer

des effets directs et indirects sur les oligodendrocytes, ce qui pourrait perturber la myélinisation et contribuer à la survenue de troubles neurodéveloppementaux.

Dans ce contexte, ce projet a pour objectifs : i) **d'étudier les conséquences de l'exposition** aux pyréthriinoïdes sur la différenciation des oligodendrocytes et la myélinisation ; ii) **d'explorer les mécanismes sous-jacents** à ces effets, incluant la neuro-inflammation et les perturbations thyroïdiennes.

Originalité et/ou caractère novateur du projet

A ce jour, les mécanismes cellulaires de NTD sont majoritairement étudiés dans les neurones. A l'inverse, il existe peu de données concernant l'effet des polluants environnementaux sur les oligodendrocytes et la myélinisation. En s'intéressant à ces aspects, ce projet contribuera à combler cette lacune. Plus précisément, ce projet pourrait contribuer à améliorer la connaissance des cibles cellulaires et moléculaires d'une exposition précoce aux pyréthriinoïdes dans le cerveau immature. Ces données pourraient être utilisées dans le but d'élaborer ou d'affiner les AOP décrivant les mécanismes de toxicité de ces insecticides sur le neurodéveloppement.

Questions de recherche

ACHIM 1 - Effets sur les écosystèmes et la santé humaine : notamment effets à faibles doses, effets cocktails et relation dose/effet.

PE 1 - Développement de méthodes permettant d'investiguer des mécanismes d'action (y compris épigénétiques).

Ce projet répond aux questions à la recherche ACHIM1 et PE1. Les effets des pyréthriinoïdes sur la santé, y compris à faibles doses et la relation dose-effet, seront évalués au travers de leurs impacts sur différents processus clés du neurodéveloppement in vivo et in vitro (ACHIM1). In vivo, les effets PE des pyréthriinoïdes sur la microglie, les oligodendrocytes et la myélinisation seront évalués et les mécanismes d'action seront notamment investigués par l'analyse du transcriptome des oligodendrocytes qui pourrait permettre d'identifier des voies de signalisation dérégulées (PE1).

Description des méthodes mises en œuvre

Ce projet utilisera en parallèle des modèles in vivo et in vitro (A=Année).

In vivo, des souris seront exposées à la deltaméthrine par voie orale pendant la gestation et la lactation (A1-A2). Deux doses seront utilisées : une dose faible proche de la DJT (0,01 mg/kg/j) et une dose ayant montré une NTD chez la souris (3 mg/kg/j) (Curtis et al., PNAS Nexus 2023 ; Tsakiridis et al., Food Chem Toxicol 2023). Les conséquences seront recherchées sur différentes cibles isolées par tri cellulaire magnétique (MACS) : activation microgliale (cytométrie en flux, Luminex), différenciation des oligodendrocytes (immunohistochimie, étude transcriptomique) et composition de la myéline (protéines, étude lipidomique). En effet, les lipides, principaux constituants de la myéline, représentent des marqueurs de choix pour étudier la myélinisation (projet Anses 2019 PE-Lipidom, Naffaa et al., Biochimie 2022). Concernant l'étude des perturbations endocriniennes, des dosages sanguins d'hormones thyroïdiennes seront également réalisés. Par la suite (A3), des approches pharmacologiques permettront d'évaluer le rôle de ces hormones dans les effets toxiques exercés par la deltaméthrine sur la myélinisation (Schang et al., Brain Behav Immun

2014), mais également d'évaluer l'implication de l'activation microgliale et de la neuro-inflammation (Van Steenwinckel et al., Brain 2019).

In vitro, les effets directs de plusieurs pyréthrinoïdes seront étudiés à différentes concentrations en exposant des cultures primaires murines microgliales et oligodendrocytaires à ces substances, puis en évaluant respectivement l'activation microgliale (cytométrie en flux, Luminex) et la différenciation des oligodendrocytes (immunocytochimie) (A1-A2). Enfin, nous évaluerons les effets exercés indirectement par les pyréthrinoïdes sur les oligodendrocytes via l'activation microgliale, en exposant les oligodendrocytes à du milieu conditionné de microglies préalablement exposées (A3).

Partenariat

Université Paris Cité - INSERM 1153 - équipe HERA

Responsable de l'équipe : Mme Anne-Laure Schang

Université Paris Cité - INSERM 1144 - équipe 2

Responsable de l'équipe : Mme Valérie Besson

Université Paris Cité - CNRS 8038 - C-TAC

Responsable de l'équipe : Mme Elodie Olivier

Développement d'un nouveau test expérimental sur le poisson zèbre pour étudier le rôle des polluants sur l'incidence des leucémies pédiatriques

Mme Catherine Lavau

INSERM Batiment 5, Faculté de Pharmacie, 2 ave Pr Léon Bernard - Rennes

Etude de faisabilité - 24 mois

Budget : 45 240 € TTC

Objectif détaillé

De multiples études épidémiologiques ont mis en évidence des associations entre la survenue de leucémies pédiatriques et l'exposition à des polluants environnementaux. L'exposition aux substances cancérigènes est particulièrement dommageable lors du développement embryonnaire et la majorité des leucémies pédiatriques résultent de lésions génomiques survenues in utero. Nous proposons d'établir un modèle de poisson zèbre (PZ) hautement sensible pour détecter l'effet de l'exposition embryonnaire à des polluants sur le développement ultérieur de leucémies. Le PZ, déjà largement utilisé en toxicologie, est pertinent pour étudier la leucémogénèse puisque son système hématopoïétique est très bien conservé comparé à celui de l'humain. Notre objectif est de développer un test in vivo adapté au criblage de substances, étudiées seules ou en cocktails, afin de fournir des données expérimentales sur l'implication des polluants environnementaux dans les leucémies de l'enfant.

Originalité et/ou caractère novateur du projet

Il n'existe pas, à notre connaissance, de test permettant d'évaluer chez l'animal les effets pro-leucémiques de substances chimiques. Nous proposons d'utiliser le PZ chez lequel on retrouve les principales lignées sanguines (myéloïde, lymphoïde et érythroïde), et les mécanismes moléculaires de leur régulation sont très bien conservés comparé à ceux de l'humain. De plus, le PZ se prête particulièrement bien aux études de toxicologie et des études de criblage de chimiothèques ont montré le haut degré de conservation entre ce modèle et les cellules humaines (PMID: 36151053). Nous proposons d'utiliser une lignée de PZ transgénique, la lignée Zebrabow, dans laquelle l'expression de protéines fluorescentes (PFs) confère aux cellules sanguines un « code-barres » colorimétrique qui permet de mesurer la contribution des différents clones, issus des cellules souches hématopoïétiques (CSHs), au système sanguin (PMID: 27870830). Grâce à ce modèle, nous pourrions mesurer l'effet de l'exposition à des polluants durant l'embryogenèse sur l'amplification clonale des précurseurs hématopoïétiques, phénomène qui correspond à une étape très précoce de la leucémogénèse.

Pour développer ce nouveau projet, nous avons formé une équipe composée de Catherine Lavau (CR, INSERM) qui a consacré près de 30 années de travaux de recherche sur les mécanismes de la leucémogénèse ; Laurence Huc (DR, INRAE) toxicologue spécialisée dans l'étude des effets cancérigènes des polluants ; et Normand Podechard (MC, Université

de Rennes) toxicologue possédant une expertise du poisson zèbre pour analyser les effets des polluants sur la santé.

Questions de recherche

CANCER 1 - Étude des risques de cancers liés à des expositions environnementales et/ou professionnelles aux substances, mélanges ou procédés potentiellement cancérigènes (entre autres avec une approche « vie entière »).

ACHIM 1 - Effets sur les écosystèmes et la santé humaine : notamment effets à faibles doses, effets cocktails et relation dose/effet.

Ce projet s'aligne pleinement avec les questions « Cancer 3 : Identification des risques environnementaux ou professionnels des cancers » et « Achim 1 : Effets sur les écosystèmes et la santé humaine : notamment effets à faibles doses, effets cocktails et relation dose/effet ». En effet, notre modèle a pour finalité de tester des substances chimiques de **l'environnement sur le développement des leucémies et permettra d'examiner les effets des cocktails et de multiples doses.**

Description des méthodes mises en œuvre

Dans la lignée transgénique Zebrabow, l'expression de protéines fluorescentes (PFs) rouge, jaune et bleue nécessite la recombinaison de motifs lox. Le croisement de cette lignée avec une lignée exprimant une recombinaison inductible dans les cellules hématopoïétiques **permet d'induire la recombinaison et l'expression des PFs dans les CSHs de l'embryon ; cette expression est maintenue dans la descendance des CSHs qui persiste tout au long de la vie du poisson.** Du fait de la présence de nombreuses copies du transgène codant pour les 3 PFs, **la recombinaison stochastique des séquences génère une large palette d'intensités de fluorescence.** Grâce à cela, chaque clone hématopoïétique issu d'une CSH peut être caractérisé par une « couleur », résultant du mélange des 3 PFs, qui lui est propre et qui peut être mesurée en microscopie confocale ou en cytométrie de flux (PMID: 27870830). Une analyse bio-informatique de clustering dans un espace à 3 couleurs permet de déterminer la taille des clones hématopoïétiques et donc **une sur-représentation anormale de l'un d'eux**, un signe précoce de la survenue de leucémie.

Pour tester l'effet de substances chimiques sur la clonalité hématopoïétique, nous exposerons des embryons/larves Zebrabow exprimant les PFs dans les CSHs pendant la période de 3 à 5 jpf (jours post fertilisation) qui correspond à la phase de développement embryonnaire des CSHs. Des groupes exposés au DMSO (véhicule des xénobiotiques) serviront de témoin. Après avoir élevé les poissons en conditions normales pendant 3 mois, les cellules sanguines seront analysées en microscopie confocale et en cytométrie de flux pour déterminer si les substances testées induisent une amplification clonale.

Nous utiliserons comme contrôle positif le 1-4 benzoquinone (un métabolite du benzène dont la capacité d'induire des leucémies est bien documentée chez l'humain), pour lequel un effet d'activation de la prolifération des cellules sanguines a été démontré chez le PZ (PMID: 30898970). Le modèle pourra également être validé en testant l'effet d'agents génotoxiques connus pour leur effet leucémogène.

Nous testerons les polluants pour lesquels des études épidémiologiques ont montré une association avec les cancers pédiatriques tels que la dioxine, les hydrocarbures aromatiques

polycycliques, et certains pesticides (e.g., ceux utilisés dans les cultures viticoles, PMID: 37850750).

Avant de tester les substances chimiques dans le modèle Zebrafish, nous déterminerons leur toxicité en étudiant l'effet d'une gamme de concentrations sur la viabilité des larves. Les études d'effets pro-leucémiques seront initialement réalisées en utilisant les doses maximales non toxiques de ces substances. Nous examinerons ensuite l'effet de doses correspondant à des expositions environnementales, notamment pour l'analyse d'effets cocktails. Ces concentrations seront déterminées à partir de données publiées telles que celles de Santé Publique France (étude Esteban).

Calendrier :

Élevage et sélection des poissons Zebrafish ayant des CSHs fluorescentes: mois 1 - mois 6.

Mise au point des méthodes de microscopie et de cytométrie pour détecter les clones hématopoïétiques : mois 6 - mois 12.

Élaboration des pipelines d'analyse bio-informatique des données : mois 9 - mois 14

Tests de toxicité des substances chimiques : mois 1 - mois 4.

Effets sur la clonalité hématopoïétique : mois 13 - mois 24.

Partenariat

IRSET, UMR1085 - SMS

Responsable de l'équipe : Mme Catherine Lavau

Etude de l'impact des radiofréquences de la 5G sur la fonction de reproduction masculine chez le rat

Mme Célia Ravel
IRSET INSERM 2 rue Henri Le Guilloux - RENNES

Projet complet - 36 mois
Budget : 198 873 € TTC

Objectif détaillé

L'équipe de Roosli en Suisse vient de montrer une association entre l'usage du téléphone portable et la diminution spermatique chez 2759 hommes (Andrology 2023). Toutefois, la littérature n'est pas unanime quant aux effets possibles des radiofréquences (RF) de la téléphonie mobile sur la fertilité: les études animales, en particulier, divergent. Les effets des nouveaux signaux relevant des RF de la 5G sur les organes génitaux, en particulier le testicule, sont donc mal connus. L'étude comparative des effets d'un signal à fréquence basse (900 MHz) et l'autre élevée (26 GHz), la première pénétrant dans les tissus, et la seconde théoriquement pas, n'a été explorée ni chez l'animal ni chez l'humain. Notre projet pose donc la question de l'impact d'une l'exposition chronique aux RF de la 5G sur le testicule de rat selon l'âge (adolescent vs adulte) et le type de signal RF (900 MHz vs 26 GHz).

Originalité et/ou caractère novateur du projet

1-Première étude comparative des effets d'un signal RF 5G utilisant une fréquence basse (900 MHz), pénétrant les tissus, et une fréquence élevée (26 GHz) qui ne le fait pas. A notre connaissance, aucune étude animale n'a étudié la reprotoxicité des RF de la 5G, en particulier dans la gamme millimétrique (26 GHz). L'exposition sera représentative d'une exposition athermique de type environnementale grâce à l'utilisation d'une chambre réverbérante permettant l'exposition corps entier d'animaux libres de se mouvoir.

2-Le choix d'une durée d'exposition aux RF couvrant deux cycles de spermatogenèse, soit une durée assez longue pour observer des effets potentiels sur la fertilité. Peu de travaux ont été réalisés sur une telle durée d'exposition et aucune avec un signal 5G.

3-Etude chez le rat adulte et juvénile, ce dernier n'ayant pas atteint la maturité sexuelle. Ce projet étudiera pour la 1ère fois, une éventuelle vulnérabilité des testicules liée à l'âge. L'adolescence est une période de fragilité rarement abordée chez l'animal. Chez l'homme, c'est la période où l'usage du téléphone mobile/des écrans s'accroît exponentiellement. Enfin, la question de l'existence de populations qui pourraient être particulièrement sensibles ou vulnérables (ex: femmes enceintes, enfants/adolescents) aux effets des RF de la téléphonie mobile n'est pas résolue et reste d'actualité (Rapport et Avis de l'ANSES sur les RF et la santé des enfants, 2016).

Questions de recherche

RFES 1.2 - Études réalisées, dans les mêmes conditions expérimentales, à plusieurs fréquences, afin d'évaluer la possibilité d'effets dépendants de la bande de fréquences.

RFES 2.1.4 - Études in vivo ou cliniques sur les effets éventuels de l'exposition (aiguë et chronique) aux radiofréquences, notamment : sur la fertilité, la reproduction et le développement sur plusieurs générations d'animaux

RFES 2.4 - Étude des effets des champs électromagnétiques sur le vivant dans les bandes de fréquences encore peu étudiées, notamment au-dessus de 2,5 GHz et en-dessous de 700 MHz, associées notamment aux déploiements de la technologie 5G et aux usages émergents concernant les objets communicants.

1- RFES 1.2 : En comparant une fréquence basse (900 MHz) vs une fréquence haute (26 GHz), l'interrogation portera sur la reprotoxicité potentielle de nouveaux signaux de la 5G aux propriétés biophysiques très différentes: l'un pénétrant dans les tissus (900 MHz) et l'autre pas (26 GHz). La possibilité que les effets des RF puissent dépendre de la fréquence a été peu abordée et les études in vitro, in vivo et chez l'Homme n'ont pas permis de conclure (Rapport et Avis de l'ANSES sur la 5G, avril 2021). A notre connaissance, les effets biologiques, physiologique ou sanitaire de la fréquence n'ont pas été étudié pour des signaux de la 5G.

2- RFES 2.1.4 : Etudier la reprotoxicité masculine des ondes électromagnétiques est pertinent du fait de la diminution importante de la fertilité masculine à travers le monde, et du fait de l'exposition particulière des testicules aux radiations des téléphones portables placés dans la poche du pantalon (chez les femmes, les ovaires semblent moins exposés).

3- RFES 2.4: - L'impact des RF de la 5G dans la gamme des ondes millimétriques (26 GHz) sur la santé, en particulier la fertilité, n'est pas connu. Si les effets des ondes millimétriques sur les tissus vivants ont été étudiés, ceux-ci concernent pour l'essentiel la gamme 40 à 60 GHz, le signal 26 GHz est totalement nouveau (Rapport et Avis de l'ANSES sur la 5G, avril 2021). De par sa faible pénétration dans les tissus (1-2 mm), les organes impactés par un signal RF à 26 GHz, sont l'oeil et la peau. Or, l'effet 'peau' du signal 26 GHz pourrait avoir une incidence systémique, notamment par un effet sur les adipocytes sous-cutanés qui synthétisent la leptine, dont l'action sur la spermatogenèse est directe, ou une incidence indirecte sur les micro-vaisseaux/cellules immunitaires de l'épiderme.

Description des méthodes mises en œuvre

L'étude in vivo (Equipe 2) sera organisée les années 1 et 2 du projet, à raison d'un semestre pour l'étude d'une fréquence (900 MHz ou 26 GHz) à un âge donné (début exposition à J30 ou J60), pour 3 groupes: Home cage (HC), Sham (chambre sans RF) et RF (chambre avec RF). L'exposition aux RF (2h/j, 5j/semaine) durera 106 jours, soit 2 cycles de spermatogenèse chez le rat (53 jours) et portera sur 2 cohortes de rats adolescents (J30, n = 24/cohorte/signal RF, n=8 rats/groupe) et 2 cohortes de rats adultes (J60, n = 24/cohorte/signal RF, n=8 rat/groupe). Le suivi et l'adaptation de la chambre réverbérante aux 2 signaux RF de la 5G ainsi que la dosimétrie seront assurés par l'Equipe 3. Au milieu et à la fin des expositions, du sang sera prélevé pour les dosages hormonaux de testostérone, LH, FSH, AMH, leptine. Ensuite, les rats seront mis à mort, les testicules et les épидидymes prélevés, pesés et analysés. Les testicules seront fixés pour analyse morphométrique quantitative (Equipe 1). Le nombre de cellules germinales/section de tube séminifère sera quantifié pour évaluer la spermatogenèse. Le tissu interstitiel sera analysé, en corrélation avec les résultats des dosages hormonaux. Toutes les analyses seront réalisées en aveugle. Ce travail permettra de mettre en évidence une

altération éventuelle de la spermatogenèse et de quantifier l'impact des RF de la 5G sur le testicule. Les études sur les testicules se répartiront à partir du 2e semestre de l'année 1 jusqu'au 1er semestre de l'année 3.

Ce projet s'articule autour de trois équipes aux compétences complémentaires. L'équipe 1 (IRSET) est spécialisée en biologie et physiologie de la reproduction, en santé du tractus uro-génital et fertilité en réponse à des expositions virales et chimiques (environnement et médicaments) et en bioélectromagnétisme. L'équipe 2 (LNCA) maîtrise les expositions de rats aux RF et la gestion de cohortes (Bien-être animal, éthique, mises à mort, prélèvements sanguins/organes, projet ANSES RADIODEP 2020-2024). Enfin l'équipe 3 (IT'IS Foundation) développe et maîtrise les systèmes d'exposition aux RF en chambre réverbérante, la dosimétrie, les technologies électromagnétiques et les études bio-expérimentales.

Partenariat

INSERM - IRSET 1085

Responsable de l'équipe : Mme Célia Ravel

CNRS -Université de Strasbourg - UMR 7364, LNCA

Responsable de l'équipe : Mme Anne Pereira De Vasconcelos

IT'IS Foundation Zurich - IT'IS

Responsable de l'équipe : M. Myles H. Capstick

Résumé RESILEPTO - 2024_EST_171

Réservoirs et Inégalités dans la Leptospirose en Nouvelle-Calédonie

M. Thibeaux Roman

Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie 110 bld Joseph Wamytan, - Nouméa

Projet complet - 24 mois

Budget : 199 992 € TTC

Objectif détaillé

Le projet RESILEPTO ambitionne de révéler les mécanismes sous-jacents aux disparités observées dans la distribution de la leptospirose en Nouvelle-Calédonie (NC). Cette zoonose grave est causée par les bactéries pathogènes du genre *Leptospira*. Dans les écosystèmes tropicaux, où elle est endémique, la maladie présente une incidence saisonnière, exacerbée par les pluies qui favorisent la propagation des leptospires pathogènes. Le changement climatique, avec ses effets sur les précipitations et les températures, est susceptible d'accentuer la distribution et l'incidence de cette maladie, à des régions jusqu'alors peu impactées.

En NC, l'incidence de la leptospirose est alarmante, avec en moyenne 45 cas/100 000 habitants et des zones hyperendémiques avec plus de 991 cas/100 000 habitants. L'impact sur les services de santé est considérable : en moyenne, 85 % des patients nécessitent une hospitalisation de 5 jours, et 34 % requièrent des soins intensifs pendant 4 jours. Les données épidémiologiques et de génotypage, révèlent des disparités marquées dans la répartition territoriale de la maladie. Le génotype *L. borgpetersenii* B1, associé aux souris, prédomine sur la côte Ouest, tandis que le génotype *L. interrogans* I5, est quasi exclusif à la côte Est. Étonnamment, le génotype I5 n'a pas encore été relié à un réservoir animal, alors qu'il a été détecté dans des prélèvements environnementaux, suscitant des interrogations sur son origine. La leptospirose touche principalement les zones rurales de NC. De 2011 à 2023, 71 % des cas de leptospirose touchaient des résidents de tribus, avec une incidence six fois plus élevée en province Nord qu'en province Sud (absente en province des Îles Loyauté). Ces constats suscitent des interrogations légitimes sur les facteurs sociétaux et les inégalités d'exposition. **Le projet se focalise sur l'analyse des interactions entre environnement, comportements humains et populations animales réservoirs.** Il vise à comprendre les disparités géographiques, génétiques, temporelles et sociales en NC, avec une attention particulière sur le génotype I5.

Originalité et/ou caractère novateur du projet

La leptospirose est une maladie complexe et emblématique d'une approche « une seule santé ». Dans cet esprit, ce projet se distingue par sa stratégie intégrée pour aborder les défis posés par les inégalités de la leptospirose, en intégrant les dimensions humaines, animales et environnementales. Cette méthode innovante réunit plusieurs experts, microbiologistes, vétérinaires, écologues, éthologues, sociologues et géographes humains, pour une compréhension exhaustive et nuancée de la leptospirose. L'originalité réside également dans la focalisation sur le génotype I5, qui questionne le dogme actuel en étant présent dans l'environnement sans pour l'instant avoir été relié à un réservoir animal. Enfin, ce projet

intègre une étude sociologique approfondie ayant pour but de révéler les facteurs clés d'exposition et de mieux comprendre la perception de la leptospirose parmi les populations touchées. Ce volet est essentiel pour garantir que les efforts de prévention soient scientifiquement solides, mais aussi culturellement sensibles et axés sur la communauté. En engageant directement les communautés les plus affectées par la leptospirose, ce projet devrait favoriser une réponse en santé publique plus inclusive et efficace, en résonance avec les populations locales et répondant à leurs besoins et préoccupations

Questions de recherche

ABIO 2 - Exposition de la population générale et/ou des travailleurs aux bioaérosols et à différents agents biologiques (micro-organismes, toxines, moisissures, pollens, virus et bactéries pathogènes).

CoEm 3 - Étude de l'émergence de pathologies liées à des expositions environnementales.

QT 5 - Prise en compte des approches multifactorielles (genre, situations socioéconomiques, facteurs géographiques, culturels et comportementaux...) des inégalités d'expositions aux risques sanitaires et environnementaux. Justice environnementale.

Le projet RESILEPTO s'aligne sur trois axes thématiques:

1. ABIO 2: RESILEPTO se concentre sur l'exposition de la population aux leptospires pathogènes, pour mieux comprendre la distribution de la maladie et à identifier les facteurs de risque, contribuant ainsi à une meilleure compréhension de la propagation de cette zoonose
2. CoEm 3 : Le projet se concentrera sur l'impact des facteurs environnementaux, en particulier le rôle des sols dans la persistance du génotype I5. Il étudiera aussi comment divers réservoirs animaux affectent la distribution des génotypes de leptospires pathogènes, permettant de mieux comprendre la dynamique éco-épidémiologique de la maladie dans différents environnements de NC
3. QT 5 : RESILEPTO examinera les inégalités d'exposition en prenant en compte des facteurs multifactoriels tels que les situations socioéconomiques, géographiques, culturelles et comportementales. Cette approche permet de comprendre comment ces inégalités influencent la dynamique de la maladie, en particulier dans les zones rurales et tribales

Description des méthodes mises en œuvre

La NC enregistre 80 % de ses cas de leptospirose humains durant les six premiers mois de l'année, période où se dérouleront nos investigations terrain (janvier-avril) sur les deux années du projet, dans les zones rurales de la côte Est impactées. L'équipe d'investigation, composée de membres de chaque partenaire, abordera simultanément les aspects environnementaux (IPNC), animaux (IAC, ANCB, DAVAR) et humains (DASS-NC et IAC Equipe TERAU).

- Étude des Réservoirs Animaux : Nous procéderons à un échantillonnage systématique d'animaux domestiques et sauvages pour identifier les réservoirs des différents génotypes de leptospires. Des prélèvements biologiques seront également collectés à l'unique abattoir de Nouvelle-Calédonie, notamment d'animaux d'élevage de la côte Est où le génotype I5 est prédominant. L'ANCB, en collaboration avec des associations de chasseurs, fournira des échantillons d'animaux sauvages (cerfs, cochons, chats harets, chiroptères) en lien avec leur actions de contrôle de la faune envahissante.

- Analyse Environnementale : Des prélèvements dans les zones à haute incidence permettront d'évaluer la contamination des sols et les conditions favorisant la survie des leptospires (physico-chimie et microbiote des sols). Nous mènerons des études sur la persistance et la viabilité des leptospires pathogènes en microcosmes de sols.
- Étude Sociétale et Comportementale : Des enquêtes qualitatives seront réalisées pour analyser les facteurs sociétaux et comportementaux liés au risque d'exposition et les perceptions de la maladie. L'IAC Equipe TERAU, déjà impliquée dans des études en lien avec la représentation et l'usage de l'eau, facilitera le déploiement de cette composante.
- Développement de Stratégies d'Atténuation du Risque : En collaboration avec les autorités sanitaires, nous élaborerons des stratégies de prévention adaptées aux spécificités locales, en intégrant les perceptions des communautés locales pour une approche de prévention plus inclusive et efficace

Partenariat

Institut Pasteur de Nouvelle Calédonie - Unité de Recherche et d'Expertise sur la Leptospirose

Responsable de l'équipe : M. Roman Thibeaux

IAC (Institut agronomique néo-Calédonien) - Equipe TERAU (Territoires, acteurs et usages)

Responsable de l'équipe : Mme Séverine Bouard

IAC (Institut agronomique néo-Calédonien) - EcoFaune (Ecologie de la Faune Sauvage)

Responsable de l'équipe : M. Fabrice Brescia

Direction des Affaires Sanitaires et Sociales de la Nouvelle-Calédonie - Département de Santé Publique-Bureau santé environnement

Responsable de l'équipe : Mme Florie Cheilan

Agence néo-Calédonienne de la Biodiversité (ANCB) - Pôle Menaces

Responsable de l'équipe : M. Patrick Barriere

Direction des Affaires Vétérinaires, Alimentaires et Rurales (DAVAR) - Service d'inspection vétérinaire, alimentaire et phytosanitaire (SIVAP)

Responsable de l'équipe : Mme Stéphanie SOURGET

Résumé SAFECHARGE - 2024_RF_008

Evaluation de l'exposition à proximité de stations de recharge pour véhicules électriques - Sécurité des dispositifs médicaux implantés

M. Lionel Pichon

GeePs Laboratoire de Génie Electrique de Paris - Gif-sur-Yvette

Projet complet - 24 mois

Budget : 156 000 € TTC

Objectif détaillé

The aim of this joint research project is to imagine a 3D simulation methodology that allows to characterize the human exposure to near charging stations for electric vehicles, both for wired installations and wireless facilities, and identify the risk of interaction with cardiac implantable electronic devices.

Pacemakers and implantable/cardioverter defibrillators are active implantable medical devices needed in case of cardiac arrhythmias. These devices, also known as cardiac implantable electronic devices (CIEDs), consist of a pulse generator and one or more leads that connect to the heart. The generator contains a battery and an electronic component that detects the heart's electrical activity and delivers electrical impulses when necessary. Over the past two decades, there has been a proliferation of electromagnetic field (EMF) sources that CIED patients may meet during their daily activities, and this trend is expected to continue. It is crucial to closely monitor the interaction between these new sources and the devices, as they can interfere with their functioning and potentially cause serious harm or even death to the patient.

As the cumulative supply of electric vehicles (EVs) worldwide increased significantly, the charging infrastructure is also developing. This has raised concerns about the effects of EMF generated from EV chargers on the human body. Charging may be performed in the traditional way by charging a battery with current using wired installations or by systems of wireless power transfer (WPT), in which power is transferred via EMF. The use of WPT charging systems is a promising solution for electrification transportation. In such a system, the energy is transferred wirelessly between two coils through the magnetic field generating EMF leakage around the system. Although implants at WPT frequencies are much shorter than the relevant wavelength, still their effects on the local field enhancement cannot be neglected.

To the best of our knowledge, realistic implantable devices in the vicinity of charging stations have not yet been exhaustively studied. Therefore, it is necessary to investigate the effects of implantable devices on human body tissues in the vicinity of high-power systems in the low frequency (LF) range considering realistic exposure scenarios.

Originalité et/ou caractère novateur du projet

The objective of the project was to assess the effects of medical implants in a human body exposed in a charging station for EV, considering various exposure scenarios. The aim is to imagine a 3D simulation methodology that allows to identify the risk of interaction between an external source and a CIED, considering the influence of the anatomy of the body, the different body tissues, and the working conditions of different CIEDs.

A 3D dosimetry computational approach gives reliable predictions but leads to heavy computations that must be repeated for each new configuration that is highly dependent on various parameters: size and geometrical characteristics of the source system, possible misalignment between transmitter and receiver, etc. The introduction of metamodeling techniques allows to manage the variability of parameters describing the electromagnetic problem and to quantitatively determine the contribution of each variable to the observed output. It allows fast sensitivity analysis.

The novelty of the project is twofold. First, a 3D simulation protocol will be developed to combine metamodeling technique with adequate multiscale methods to deal with high dimensions ratio involved by the exposure scenario. Such a step is mandatory to consider both the implantable device and the surrounding environment (human body, vehicle). Secondly, sampling techniques will be combined to metamodeling methods to provide at low cost a sensitivity analysis related to the exposure conditions (posture/position of human body, type of source, dimensions of implant).

Questions de recherche

RFES 4.3 - Recherches sur la caractérisation de l'exposition des personnes dans le cadre du cumul d'expositions ou de situations d'expositions maximisantes : CPL, nouvelles technologies de communication, objets connectés, transports autonomes et connectés...).

The project is linked to the question RFES 4.3. related to the characterization of exposure to high power transfer systems, either by wire (in charging stations) or wirelessly (using systems located above or under the road surface). In slow wired charging stations, the power supply varies typically from 1.5 kW to 22 kW. In fast wired charging stations, the power may exceed 22 kW and higher. For WPT systems, 85 kHz is the operating frequency in the European standards and typical transferred powers reach 3.7, 7.7, 11, and 22 kW and higher.

Many studies in the literature are dedicated to low frequency (LF) fields mainly used by power systems (50 Hz) and high frequency (HF) fields mainly used by telecommunication devices (GHz range). The use of intermediate frequency (kHz) fields by emerging technologies based on inductive coupling is rapidly increasing and therefore the interferences in CIEDs produced by such sources needs to be deeply investigated.

Description des méthodes mises en œuvre

The project will be composed of 4 workpackages:

1) Electromagnetic characterization of implanted CIEDs and computation of electric field induced in human body and voltages induced on CIEDs near a standard-size charging station (wired and WPT).

2) Characterization of the stray field from near-field measurements in the vicinity of a charging station. Both GeePs and Polito have developed test benches dedicated to static and dynamic WPT that are available for the project. They allow to quantify the stray field for a real environment.

3) Computation of induced electric field when the source magnetic field is deduced from measurements in case of a real system.

4) Analysis of the effect of uncertainties and/or variabilities related to the source and implants.

Aid: no hardware development is planned, and the project needs no aid for computational resources. Most of the demanded aid will be devoted to the salaries (or scholarships) of two postdocs and/or Msc graduates. The remaining part will be devoted to fees related to conferences and for travels required for the meetings.

Deliverables: Reports and publications will involve probability distribution of local observables (field enhancement around implant for example) versus exposure parameters (position of human body, posture, etc.). User-friendly software tools based on the obtained metamodel and quantifying a level of risk and/or exposure according to the main characteristics of the source configuration.

Partenariat

GeePs-CentraleSupélec - CEM

Responsable de l'équipe : M. Lionel Pichon

Potitecnico di Torino - Department of Electrical Engineering

Responsable de l'équipe : M. Fabio Freschi

L'hôpital malade de ses Bips: évaluation de la santé auditive des soignants (SAS)

M. Pascal Barone
CNRS Cerveau & Cognition CNRS UMR 5549 - Toulouse

Projet complet - 36 mois
Budget : 193 861 € TTC

Objectif détaillé

Les objectifs de notre projet sont au cœur du chantier gouvernemental d'amélioration de la santé du personnel soignant et par conséquent celle des patients. Généralement, les nuisances sonores en milieu professionnel sont responsables d'acouphènes et de pertes auditives qui limitent la communication et dont les conséquences s'étendent à des problèmes de troubles du sommeil, de fatigue cognitive et d'une mauvaise santé mentale. L'environnement des services hospitaliers comporte de nombreuses sources sonores (alarmes, appareil de monitoring, les ventilateurs, les respirateurs, systèmes de perfusion...) qui créent une exposition au bruit dépassant largement les seuils préconisés par l'OMS et alimentent stress et fatigue tant chez les patients que chez les soignants. Aux USA une méta-analyse rapporte une augmentation du niveau sonore des hôpitaux de plus de 10 dB LAeq et nos propres données recueillies au CHU de Toulouse dans une salle de surveillance post-interventionnelle montrent des niveaux de pointe supérieurs à 80/95 dBA SPL. Notre enquête pilote réalisée dans le service d'urgence pédiatrique a révélé une gêne chez plus de 60% du personnel à l'origine d'une fatigabilité accrue des agents. La diversité des sources sonores crée un environnement imprévisible et fluctuant qui aggrave la récupération des patients (stress, altération du sommeil...) et affecte la communication entre les soignants (diminution de la concentration et temps de réaction prolongés) pouvant conduire à une mauvaise interprétation des instructions. Notre étude se propose 1) de quantifier le niveau d'exposition au bruit d'un grand nombre de services hospitaliers 2) d'en évaluer l'impact sur la santé auditive et mentale du personnel 3) de dépister la présence de surdités cachées 4) de proposer des solutions ergonomiques d'amélioration sonore des conditions de travail

Originalité et/ou caractère novateur du projet

La perte auditive induite par le bruit est la conséquence d'une altération de plusieurs types de cellules cochléaires dont les cellules ciliées externes. Ces dommages sont associés à une augmentation des seuils d'audition sur laquelle repose principalement le diagnostic clinique. Ce type de perte survient généralement à la suite d'une exposition prolongée à des sons >85 dBA SPL, valeur de seuil critique autorisé par les autorités sanitaires. Or de nombreux sujets qui se plaignent de difficultés de compréhension de la parole dans des environnements bruyants ne présentent aucune altération des seuils auditifs et sont donc considérés comme normo-entendants. Ces observations pourraient correspondre aux symptômes de synaptopathie cochléaire décrite par Liberman et montrant que l'exposition au bruit peut conduire à la perturbation de la transmission synaptique entre cellules ciliées

internes et neurones ganglionnaires alors que les neurones auditifs restent intacts. De tels troubles font désormais partie du large spectre des neuropathies auditives (NA) donnant naissance à la notion de surdité cachée. Nous proposons que les soignants hospitaliers soumis à des accumulations sonores aversives pourraient présenter des symptômes de neuropathies auditives à l'origine de leurs difficultés et gêne au travail. Notre stratégie sera de démontrer l'impact délétère des environnements sonores des services de soins hospitaliers en dépit d'un seuil d'exposition jugé comme acceptable

Questions de recherche

NSON 1 - Évaluation des effets extra-auditifs pour la population générale et/ou les travailleurs (par exemple pathologies respiratoires, chronobiologie et perturbations du sommeil, risque cardiovasculaire, apprentissage scolaire, communications sociales) ainsi que pour les écosystèmes.

En lien avec la thématique NVSON1 notre proposition interroge sur les effets délétères de l'exposition continue à des niveaux de bruit pourtant en deçà des seuils réglementaires. Des travaux récents chez l'animal remettent en cause les seuils sanitaires d'exposition en rapportant des altérations des réponses auditives (tronc cérébral et cortex auditif) chez des sujets exposés à des niveaux continus de bruits récréatifs et ce sans changement de seuil auditif. Si une exposition prolongée à des sons inférieurs au seuil critique n'induit pas de lésions traumatiques des cellules cochléaires, elle induit des altérations de la physiologie auditive qui contribuent probablement aux déficits de compréhension de la parole dans le bruit. Notre hypothèse est qu'une NA induit également un déclin cognitif en raison de la pression exercée sur les ressources cognitives pour compenser le déficit des entrées auditives. La compréhension de la parole dans le bruit implique l'extraction et la ségrégation des flux sonores de l'environnement afin que le signal de parole cible soit perçu comme un objet unique. Cela nécessite un contrôle top-down impliquant des fonctions cognitives de haut niveau (fonctions exécutives) telles que l'attention et la mémoire de travail. L'impact de l'exposition au bruit sur ces aspects neurocognitifs sera également évalué chez les soignants

Description des méthodes mises en œuvre

Plusieurs services hospitaliers du CHU Toulouse seront ciblés sur une période de 2 ans: urgences pédiatriques, centre d'appels du SAMU, bloc opératoire, service de consultation, salle de réveil. Nous allons 1) quantifier l'exposition annuelle au bruit des soignants (dose normalisée LAeq8760h) 2) évaluer les déficiences auditives (GABO Gêne Acoustique dans les Bureaux Ouverts, SSQ, Speech, Spatial and Quality of Hearing Scale, F-Matrix parole dans le bruit) 3) Quantifier le bruit statistique des environnements de travail (bruit moyen, niveaux de pression acoustique de pointe, cartographie du bruit local) et de l'exposition individuelle (dosimètres personnels) 4) appliquer une large gamme d'approches électrophysiologiques (DPOAE, R-ABR, EcoG, réflexe musculaire de l'oreille moyenne, réponse d'enveloppe ou de suivi de fréquence...) dont la combinaison affinera le diagnostic de neuropathies 5) évaluer la fluence cognitive et les fonctions exécutives des soignants (Matrice de Raven, CANTAB) 6) la dernière année portera sur l'analyse des données par utilisation d'un algorithme de machine learning (K-means) appliqué aux marqueurs comportementaux et physiopathologiques pour séparer des groupes distincts de sujets et identifier des profils spécifiques de neuropathies auditives. Les mesures de protection des soignants seront adaptées en fonction des données acquises suivant les principes acoustiques ABC : Absorb-

Block-Cover. Le consortium associe 1) une équipe CNRS-CerCo spécialiste des neurosciences de l'audition 2) les services ORL et des pathologies professionnelles du CHU 3) l'équipe en Sciences Humaines CNRS-CLLE experte en ergonomie auditive et spécialiste de l'étude des nuisances sonores sur le comportement humain

Partenariat

CNRS - CERCO

Responsable de l'équipe : M. Pascal Barone

CHU de Toulouse - ORL

Responsable de l'équipe : M. Mathieu Marx

CNRS - CLLE

Responsable de l'équipe : M. Pascal Gaillard

Résumé SPIRIT - 2024_EST_216

Identification et hiérarchisation des sources de PFAS dans les environnements intérieurs

Mme Melanie Nicolas
CSTB 24 rue Joseph Fourier - Saint Martin d'Hères

Projet complet - 36 mois
Budget : 199 904 € TTC

Objectif détaillé

Les PFAS (substances per- et polyfluoroalkylées) représentent entre 5 000 et 10 000 substances. Ils sont utilisés dans de multiples procédés industriels en raison de leurs propriétés résistantes, antiadhésives ou encore imperméabilisantes. Surnommés polluants éternels du fait de leur persistance, ils sont omniprésents dans l'environnement. Bioaccumulables et toxiques, ils sont cependant très peu encadrés par la réglementation. Du fait des préoccupations grandissantes concernant l'impact de ces composés sur la santé humaine et l'environnement, un plan d'action ministériel a été mis en place (2023-2027) afin de renforcer la protection des occupants et de l'environnement. Une grande variété de PFAS peut être retrouvée dans les environnements intérieurs à la fois dans l'air et les poussières. Cependant, les sources d'émissions sont très nombreuses, variées et encore très peu renseignées.

L'objectif du projet est d'identifier les sources de PFAS dans l'air et les poussières des environnements intérieurs et de les hiérarchiser grâce au modèle CMB (chemical mass balance) afin d'identifier les leviers d'actions permettant de réduire l'exposition des occupants.

Les questions de recherche sont les suivantes :

Comment analyser les PFAS dans l'air (phases gaz et particulaire) et quels PFAS retrouve-t-on dans les environnements intérieurs ?

Quelles sont les sources de PFAS dans les environnements intérieurs ? Quels sont les PFAS natifs et émis ?

Quelle est l'exposition des occupants aux PFAS ? Comment la réduire ?

Pour y répondre, 3 lots sont prévus : 1) Développement de méthodes d'analyse et d'échantillonnage, dédiées à la mesure des PFAS dans les environnements intérieurs ; 2) Caractérisation individuelle de sources de PFAS, détermination de leurs teneurs et émissions, intégration des données dans le modèle CMB pour quantifier les contributions respectives ; 3) Réalisation d'une campagne pilote en environnements réels avec évaluation de l'exposition aux PFAS et application du modèle CMB pour hiérarchiser les sources.

Originalité et/ou caractère novateur du projet

L'originalité du projet repose sur une approche ciblée innovante intégrant le développement de méthodes d'analyse robustes (en- et hors-ligne), la détermination des teneurs natives des sources et de leurs émissions dans des chambres d'essais de différentes échelles, et l'utilisation du modèle CMB. Ainsi, par l'identification et la quantification des

sources de PFAS présentes des environnements intérieurs, celles-ci pourront être hiérarchisées et les niveaux de contamination associés renseignés afin de proposer des actions pour réduire l'exposition des occupants.

Questions de recherche

ACHIM 6 - Optimisation des protocoles d'évaluation des substances chimiques : amélioration et validation des méthodes, production de données utiles à la construction de valeur sanitaire de référence.

ACHIM 9 - Amélioration des connaissances sur les métabolites de substances chimiques, en particulier de produits phytopharmaceutiques et de PFAS : développement de méthodologie d'analyse pour leurs détections dans les différents compartiments sol/air/eau et compréhension des mécanismes de formation in natura ou lors des traitements, compréhension du comportement dans l'environnement, identification des traitements de potabilisation adaptés...

CoEm 2 - Étude de problématiques émergentes : risques chimique, physique et biologique induits pour l'Homme et l'environnement, caractérisation de l'exposition.

Le projet s'inscrit dans les questions ACHIM 9 et ACHIM 6 via notamment la métrologie des PFAS puisqu'il comprend le développement de méthodes d'analyse en- et hors-ligne, ainsi que la connaissance des sources de PFAS. La question CoEm 2 est également concernée par le projet.

Description des méthodes mises en œuvre

Le projet est organisé en 3 lots et implique deux partenaires (AMU-LCE et le CSTB) dont les compétences, expertises, moyens expérimentaux et analytiques sont complémentaires. Le LCE possède également une très bonne connaissance du modèle CMB tandis que le CSTB a une forte expertise en matière d'évaluation des émissions de polluants.

Le lot 1, coordonné par AMU-LCE, se déroule sur 18 mois et ambitionne d'élaborer une priorisation des PFAS d'intérêt sanitaire et la consolidation d'un socle analytique dédié. Par une étude bibliographique, la tâche 1 propose un inventaire des sources potentielles de PFAS dans les environnements intérieurs et des substances d'intérêt sanitaire associées. Les actions de la tâche 2 s'organisent autour du développement de méthodes d'analyse incluant la détermination de stratégies d'échantillonnages efficaces pour les phases gazeuse et particulaire, et l'association d'approche d'analyse en ligne et hors ligne pour l'identification des composés d'intérêt. Le consortium dispose de chromatographes liquides ultra-hautes performances et gazeux, couplées à des spectromètres de masse en tandem (QTOF et QQQ), à un spectromètre de masse très haute résolution (Orbitrap), et d'un PTR-MS (Proton Transfer Reaction – Mass Spectrometry). Ainsi, il sera possible de quantifier une large gamme de composés : ioniques, neutres, à chaînes courtes/ longues et les PFAS alternatifs.

Le lot 2, coordonné par le CSTB, permet de renseigner les sources et de valider le modèle CMB, grâce à deux tâches successives pour une durée globale de 12 mois. Au cours de la tâche 1, un panel de produits sources de PFAS et susceptibles d'être présents des environnements intérieurs, est défini sur la base de l'inventaire du lot 1. Les teneurs natives en PFAS de ces produits sources sont évaluées analytiquement et les substances pouvant être retrouvées dans l'air et les poussières sont identifiées en amont de la caractérisation des émissions de PFAS volatils dans des chambres d'essais. Les données obtenues, caractéristiques des sources de PFAS dans les environnements intérieurs, sont intégrées au modèle CMB, puis une étape de validation finale est menée via des expérimentations dans

une chambre d'émission à l'échelle 1:1 (AIR'IN - équipement de 30 m³, en inox, conditions réalistes, contrôlées et maîtrisées) avec confrontation des mesures et des prédictions CMB.

Enfin, le lot 3, d'une durée de 6 mois et piloté par le CSTB, verra la conduite d'une campagne pilote dans des environnements intérieurs réels (logements, crèches, commerces). Au cours de la tâche 1, une évaluation de la contamination de l'air et des poussières par les PFAS des environnements intérieurs sélectionnés sera réalisée avec déploiement des méthodes de prélèvements et d'analyse développées dans le lot 1. Ensuite, une application du modèle CMB pour chaque type de lieux constituera la tâche 2 afin d'identifier les sources responsables de la contamination des environnements intérieurs par les PFAS et de proposer des solutions de limitation.

Deux thèses, intégrant chacune un volet dédié à la métrologie des PFAS et mobilisant des équipements acquis via l'Equipex IMAGNE², sont adossées au projet : une thèse CIFRE à AMU-LCE et une thèse au CSTB financée en propre. Si les développements du lot 1 sont spécifiques à chaque plateforme analytique, la complémentarité des deux approches par l'association d'équipements haute résolution permettra une identification précise des PFAS, tandis que les lots 2 et 3 verront la mutualisation des travaux de doctorants au cours des phases expérimentales et opérationnelles.

Partenariat

Equipe 1 : CSTB - Direction Santé Confort

Responsable de l'équipe : Mme Melanie Nicolas

Equipe 2 : AMU-LCE - IRA

Responsable de l'équipe : M. Henri Wortham

Développement d'un biotest sur les stades précoces de la crevette *Palaemon serratus* comme outil d'évaluation du risque chimique en milieu marin : application à la famille des PFAS

Mme Céline Boulangé-Lecomte
UMR-I02 SEBIO 25, rue Philippe Lebon - LE HAVRE

Projet complet - 36 mois
Budget : 199 202 € TTC

Objectif détaillé

Le projet STRATA propose de développer un biotest sur les stades précoces de la crevette *Palaemon serratus*, basé sur la mesure d'effets à différents niveaux d'organisation biologique, comme outil d'évaluation des risques chimiques chez les invertébrés marins. Les stades larvaires constituent une étape critique dans le cycle de vie des organismes et jouent un rôle clé dans le recrutement et la dissémination des populations. Or, ces stades **présentent souvent une grande sensibilité aux polluants**. En dépit de l'intérêt des crustacés décapodes pour la biodiversité, les effets chroniques de la contamination sur la phase larvaire sont très peu documentés. Par ailleurs, les biotests in vivo actuels, reposant principalement sur le suivi de traits de vie, ne renseignent pas sur les modes d'actions d'intérêt en évaluation des risques. Pour pallier ce manque, le biotest consistera à coupler un suivi des traits de vie et du comportement (réponse sensible et précoce) tout au long de la phase larvaire et une caractérisation fine du mode d'action des contaminants au moyen d'une approche protéomique ciblée multiplexée (MRM). Une attention particulière sera portée aux designs expérimentaux (i.e. grand nombre de concentrations) pour permettre l'utilisation d'outils de modélisation dose-réponse à haut-débit (DRomics ; Delignette-Muller et al., 2023) en vue de décrire des réponses potentiellement non-monotones et le calcul de **BenchMark Doses (BMD)** selon les récentes recommandations de l'EFSA. Le projet permettra alors la production de valeurs guides robustes exploitables par les politiques publiques. Le biotest sera mis en œuvre pour évaluer la toxicité de PFAS (per et polyfluoroalkylés). Ces composés, retrouvés dans l'ensemble des écosystèmes, sont jugés préoccupants du fait de leur persistance, de leurs capacités à s'accumuler dans les organismes et de leurs effets sur leur santé (e.g. reprotoxicité, stress oxydatif, perturbation métabolique, immunotoxicité, altération du développement). Le projet souhaite ainsi répondre aux priorités de recherche récemment définies dans le domaine de l'évaluation du risque environnemental des PFAS, en comblant le manque de données (i) chez les invertébrés (90 % des études portant sur le poisson) et (ii) pour le milieu marin (10 % des études de la littérature). L'étude se concentrera sur 2 contaminants distincts : un PFAS modèle (e.g. PFOS) qui permettra de comparer les réponses observées aux données de la littérature et un substitut (e.g. F-53B) largement moins documenté, pour répondre à la nécessité d'élargir le panel encore trop restreint des PFAS classiquement étudiés.

Priorities for the Environmental Risk Assessment of Per- and Polyfluorinated Substances. Environ Toxicol Chem. 2023 Nov;42(11):2302-2316. [doi: 10.1002/etc.5729](https://doi.org/10.1002/etc.5729). Epub 2023 Sep 15. PMID: 37589402

Originalité et/ou caractère novateur du projet

Le projet vise à proposer un biotest pour l'amélioration de l'évaluation du risque en milieu marin chez une espèce de décapode - la crevette bouquet *P. serratus* - présentant un fort intérêt écologique et socio-économique. Il propose de concentrer les efforts sur les stades larvaires, stades clefs en termes de sensibilité aux contaminants et de dynamique des populations. Ce biotest a pour ambition de décrire – non seulement les effets individuels (traits de vie / comportement) – mais aussi les mécanismes moléculaires à l'œuvre des composés testés. Il se positionne dans la droite ligne du programme européen de recherche et innovation « PARC » qui vise à concevoir une évaluation des risques des substances chimiques de nouvelle génération. Le projet propose de démontrer la pertinence de ces travaux à l'aide de composés d'intérêt environnemental et sociétal fort, les PFAS. Il permettra de fournir des valeurs guides en appui des acteurs en charge de l'évaluation du risque associé à cette famille de contaminants. Il contribuera à combler le manque de données disponibles concernant la toxicité des PFAS (i) chez les invertébrés pour (ii) le milieu marin, (iii) en élargissant le panel de molécules classiquement étudiées.

Questions de recherche

ACHIM 6 - Optimisation des protocoles d'évaluation des substances chimiques : amélioration et validation des méthodes, production de données utiles à la construction de valeur sanitaire de référence.

Le présent projet permettra de définir des protocoles d'évaluation des composés de la famille des PFAS adaptés aux invertébrés aquatiques et de proposer des valeurs de référence en appui des politiques publiques pour l'évaluation du risque des PFAS en milieu marin.

Description des méthodes mises en œuvre

Tâche 1 : Effets sur le développement larvaire (mois 1 à 12)

Les larves de *P. serratus* seront exposées de l'éclosion à la métamorphose (30 jours, 20°C) sur un gradient géométrique de 10 concentrations, incluant des concentrations environnementales. Le protocole d'exposition sera validé grâce aux dosages des contaminants dans le milieu. La survie, le parcours de développement (e.g. durée des différents stades larvaires), l'occurrence de malformations, le succès de métamorphose et le taux de croissance seront monitorés tout au long de cette période.

Tâche 2 : Effets sur le comportement natatoire (mois 18 à 30)

Le comportement natatoire sera suivi, à différents stades larvaires, à l'aide d'un outil de screening à haut-débit (DanioVision / EthoVision XT). Après une phase de développement chez des individus non exposés, les comportements exploratoires (nage basale) et de fuite seront étudiés après exposition aux PFAS via le suivi de divers paramètres e.g. vitesse de nage, distance parcourue, préférences de zone (thigmotaxie, phototaxie).

Tâche 3 : Analyse fonctionnelle par protéomique ciblée (mois 12 à 24)

Les modes d'action des composés seront décrits à l'aide d'une approche de protéomique ciblée (NanoLC-MS/MS) via le dosage multiplexé de peptides. La première phase du travail visera à la sélection, à partir de l'atlas protéique précédemment caractérisé chez *P. serratus*,

d'une centaine de protéines d'intérêt couvrant un large spectre de fonctions physiologiques e.g. détoxification, immunité, osmorégulation, mue & régulation hormonale (Leprêtre et al., 2023). L'analyse protéomique sera déployée sur le stade juvénile.

Tâche 4 : Détermination de valeurs guides (mois 24 à 36)

La modélisation dose-réponse des endpoints étudiés sera réalisée de façon automatisée à l'aide de l'outil DRomics pour les données protéomiques et d'un outil dérivé de DRomics pour les traits de vie et le comportement, adapté à la nature de ces données (outil DRing en développement). Elle permettra de définir des valeurs guides (BMD) pour chacun des contaminants.

Partenariat

Université Le Havre Normandie - UMR-I02 SEBIO

Responsable de l'équipe : Mme Céline Boulangé-Lecomte

INRAE Lyon - Laboratoire d'écotoxicologie

Responsable de l'équipe : M. Davide Degli Esposti

UCB Lyon VetAgroSup - UMR 5558 CNRS LBBE

Responsable de l'équipe : Mme Marie Laure Delignette-Muller

Université de Lorraine - UMR 7360 LIEC

Responsable de l'équipe : Mme Elise Billoir

Résumé Transepfas - 2024_EST_118

Interactions des PFAS émergents à courte chaîne avec le transportome des xénobiotiques: Caractérisation et implications potentielles pour la santé humaine

M. Olivier Fardel

Université de Rennes 1 Faculté de pharmacie - Rennes

Projet complet - 36 mois

Budget : 99 424 € TTC

Objectif détaillé

Les substances perfluoroalkylés et polyfluoroalkylés émergentes à courte chaîne (ePFAS) sont des composés chimiques proposés comme substituts aux PFAS historiques à longue chaîne comme le PFOA et le PFOS. Ces PFAS historiques sont en effet largement répandus **dans l'environnement et maintenant bannis pour leur rémanence et leur toxicité**. Les ePFAS sont néanmoins également persistants et pourraient exercer des effets délétères pour la santé humaine. Ils peuvent ainsi de ce fait apparaître comme préoccupants. Leurs interactions possibles avec des cibles cellulaires/moléculaires humaines restent cependant relativement peu caractérisées. En particulier, si des interactions du PFOA et du PFOS avec des transporteurs membranaires de xénobiotiques (constituant le « Xenobiotic Transportome ») ont été décrites, peu de données sur ce point sont connues pour les ePFAS, bien que les transporteurs jouent un rôle majeur et de mieux en mieux reconnu dans la toxicocinétique et les effets délétères de polluants chimiques. **L'objectif de notre projet est donc de caractériser les interactions possibles de 9 ePFAS d'intérêt avec le transportome de xénobiotiques, en analysant (i) l'inhibition de l'activité de ces transporteurs par ces ePFAS, (ii) la prise en charge (transport) potentielle des ePFAS par ces transporteurs et (iii) la relevance des effets observés pour la toxicocinétique et la toxicité des ePFAS, en lien avec leurs concentrations humaines liées à une exposition environnementale et avec la possibilité d'effets cocktails des mélanges d'ePFAS. Les PFAS historiques, incluant le PFOA et le PFOS, seront étudiés en parallèle pour comparaison.**

Originalité et/ou caractère novateur du projet

Notre projet vise à étudier des polluants d'actualité (les PFAS, en ciblant plus particulièrement les ePFAS émergentes à chaîne courte) et le transportome de xénobiotiques, dont la **relevance et l'importance pour les médicaments est maintenant bien établi, mais qui reste pour l'instant largement sous-étudié** en ce qui concerne les polluants, en dépit de l'importance des transporteurs pour la toxicocinétique et pour d'éventuels effets toxiques. Notre projet apparaît donc bien novateur (en s'intéressant à des polluants émergents et préoccupants) et original (en ciblant le lien transportome-polluants, actuellement peu documenté dans la littérature internationale). L'attention qui sera portée à la relevance pour l'exposition humaine des données *in vitro* obtenues constitue de plus un point novateur fort du projet, basé sur la transposition aux polluants d'outils/méthodes développés pour l'extrapolation *in vitro-in vivo* (IVIVE) dans le domaine des médicaments.

Questions de recherche

ACHIM 1 - Effets sur les écosystèmes et la santé humaine : notamment effets à faibles doses, effets cocktails et relation dose/effet.

CoEm 2 - Étude de problématiques émergentes : risques chimique, physique et biologique induits pour l'Homme et l'environnement, caractérisation de l'exposition.

Notre projet est en lien avec la question « CoEm 2. Étude de problématiques émergentes » puisque les polluants chimiques étudiés sont émergents et préoccupants et la thématique « transportome » est aussi une problématique émergente pour les polluants. La question « ACHIM 1. Effets sur les écosystèmes et la santé humaine » est aussi concernée car nous étudierons les effets de faibles doses d'ePFAS et caractériserons les doses-réponses et les effets cocktails (effets de mélanges d'ePFAS).

Description des méthodes mises en œuvre

Notre projet, d'une durée de 36 mois et mono-équipe, comprendra 3 Work-Packages (WP).

Les ePFAS représentatives à courte chaîne étudiées seront les PBFA, PFPeA, PFPA, PFHxA, PFBS, PFHxS, HFPO-DA (aussi connue comme GenX), 6:2-FTOH et 6:2 FTSA. L'ensemble de ces ePFAS a été détecté chez l'homme, souvent à des concentrations notables. Des PFAS à longue chaîne (PFOA, PFOS, et aussi PFOPA et 8:2-FTOH) seront analysées en complément.

WP1 (Mois 1-18) : Evaluation des effets inhibiteurs des ePFAS sur l'activité de transporteurs d'efflux "ATP-binding cassette" (ABC) (P-glycoprotéine, MRPs et BCRP) et d'uptake "solute carrier" (SLC) (OATPs, OATs, OCTs, MATEs) dans des lignées cellulaires ou clones (HEK) surexprimant ces transporteurs, à l'aide de substrats fluorescents de référence et de substrats physiologiques. Pour les transporteurs impactés, les effets concentrations-dépendants des ePFAS (détermination des IC50) ainsi que l'action de mélanges d'ePFAS seront analysés. Une éventuelle inhibition temps-dépendante des transporteurs, en réponse à un traitement subaiguë, sera également recherchée, ainsi que le mécanisme compétitif ou non de l'inhibition.

WP2 (Mois 6-24) : Analyse du transport des ePFAS dans les lignées cellulaires et clones surexprimant les transporteurs d'intérêt ABC et SLC, en présence ou en absence d'inhibiteur spécifique des transporteurs ; l'accumulation cellulaire des ePFAS sera aussi étudiée en parallèle dans des cellules contrôles n'exprimant pas les transporteurs. L'accumulation intracellulaire des e-PFAS sera mesurée par LC-MS/MS, disponible au laboratoire. Les paramètres du transport (Km) seront déterminés.

WP3 (Mois 18-36) : Etude de la relevance des données obtenues dans les WP1 et WP2:

(i) en prédisant l'inhibition in vivo des transporteurs par les concentrations humaines d'ePFAS en se basant sur les outils/méthodes développés pour la prédiction in vivo de l'inhibition des transporteurs par les médicaments (faisant notamment appel au ratio concentration plasmatique des ePFAS /IC50).

(ii) en utilisant des modèles intégrés de transport hépatique (Cellules HepaRG) et intestinal (Cellules Caco-2), pour analyser les effets des PFAS (utilisés seuls ou en mélange pour les effets cocktails) sur le passage de molécules de références (composés physiologiques et/ou médicaments), pour déterminer la contribution des transporteurs au transport des PFAS dans ces modèles et pour préciser la balance transport actif/transport passif des ePFAS. L'implication des transporteurs dans les effets toxiques des ePFAS sera

aussi précisée dans les modèles d'intérêt en étudiant ces effets toxiques (mesurés par des tests de viabilité) en présence ou en absence d'inhibiteurs du transport. Les éventuels effets d'une exposition subchronique (3 jours) aux ePFAS sur le niveau d'expression et d'activité des transporteurs dans ces modèles (notamment les cellules HepaRG) seront de plus analysés (notamment par RT-qPCR).

La faisabilité de notre projet repose sur le fait que les clones et lignées cellulaires surexprimant les transporteurs membranaires de xénobiotiques sont disponibles au laboratoire et sont validés, ainsi que les modèles cellulaires de barrière et les méthodes de mesure de l'activité des transporteurs. Nous disposons aussi de l'équipement (LC-MS/MS) et des méthodes analytiques requis pour le projet.

Partenariat

INSERM U1085/Irset - Equipe 1 Xenobar
Responsable de l'équipe : M. Olivier Fardel

Nouvelles stratégies d'évaluation des effets de substances

phytosanitaires sur le système nerveux, le microbiote et le comportement

M. Thierry Charlier

Universite de Rennes 1 INSERM U1085-IRSET - Rennes

Projet complet - 36 mois

Budget : 199 997 € TTC

Objectif détaillé

Les objectifs de ce projet sont de valider des approches méthodologiques et expérimentales visant à élargir le cadre contextuel actuel des études d'impact de produits phytosanitaires sur le système nerveux des vertébrés, y compris des humains. Dans le cadre de cette demande et sur base de notre expertise, nous focaliserons ce projet sur l'impact potentiel à long terme de substances phytosanitaires sur le développement du système nerveux et sur les comportements d'interactions sociales. Une réflexion est actuellement engagée au niveau réglementaire dans la réévaluation des approches méthodologiques pour définir l'impact potentiel des substances sur le système nerveux et sur le comportement. Nous proposons ici, en utilisant le glyphosate comme substance modèle, une approche holistique de façon à définir si la substance étudiée peut affecter certains comportements fondamentaux pour la survie et la reproduction des individus et les circuits cérébraux associés. Par ailleurs, nous proposons d'évaluer les effets des substances via un impact potentiel sur le microbiote intestinal et sur le système immunitaire, ce qui aura pour conséquence une altération du système nerveux et des comportements, approche qui n'est à l'heure actuelle pas implémentée au niveau réglementaire. Il est important de noter que tous les mécanismes biologiques investigués dans le cadre de ce projet sont extrêmement bien conservés et les connaissances acquises ici permettront une réévaluation des effets des phytosanitaires potentiel chez les vertébrés de la faune sauvage, des animaux d'élevage et chez les humains. Pour ce faire, notre projet se structure autour de 3 objectifs complémentaires :

Objectif 1 : Nous définirons si les mères et leur descendance, mâle et femelle, montrent une altération de la neurocircuitrie et des comportements d'interaction sociale après une exposition périnatale au glyphosate.

Objectif 2 : Nous développerons et validerons des approches méthodologiques pour qualifier et quantifier la distribution de produits phytosanitaires au sein de plusieurs régions du cerveau in situ.

Objectif 3 : Nous analyserons le microbiote intestinal chez les mères et chez leur descendance. Par ailleurs, nous analyserons également les acides gras à chaînes courtes et les cytokines plasmatiques, médiateurs des effets du microbiote intestinal sur la neuroplasticité et sur le comportement.

Originalité et/ou caractère novateur du projet

Les approches classiques en neurotoxicologie sont à l'heure actuelle trop restrictives et ne prennent pas en compte la complexité du système nerveux, qui implique une interaction forte avec les systèmes périphériques, tels que le système endocrinien, le système immunitaire et le microbiote intestinal et les conséquences sur le comportement. L'originalité de notre projet repose sur le développement d'une démarche globale d'investigation de l'impact de substances phytosanitaires en combinant une approche physiologique multifactorielle et diverses méthodologies multidisciplinaires afin d'évaluer les effets de substances phytosanitaires sur le système nerveux et le comportement. Cette réflexion permettra de définir de nouvelles stratégies pour évaluer un impact de substances phytosanitaires sur les interactions sociales, fondamentales en santé humaine, pour le bien-être animal en milieu d'élevage et pour la survie et la reproduction des vertébrés de la faune sauvage.

Questions de recherche

ACHIM 4 - Développement de méthodes et outils de mesurage de l'imprégnation biologique des populations exposées aux produits chimiques, développement de biomarqueurs d'exposition et d'effets, détermination d'éventuelles fenêtres d'exposition critique.

- Est-il possible de définir des cibles cellulaires plus spécifiques dans le système nerveux central en lien avec un impact potentiel de substance phytopharmaceutiques sur le comportement social? Certains aspects de neuroplasticité doivent être envisagés pour mettre en évidence un impact ciblé des molécules. Nous postulons que certains de ces effets affecteront des comportements nécessaires à la survie et la reproduction
- Est-il possible de visualiser les substances phytosanitaires directement au niveau des tissus cibles ? Certaines zones du cerveau pourraient être ciblées plus spécifiquement, seules des approches de spectrométrie de masse sont capables de définir cette localisation
- L'impact de molécules phytosanitaires peut-il être associé à la physiologie des individus? Le sexe, le microbiote et le système immunitaire pourraient moduler l'impact de substances phytosanitaires sur le cerveau et le comportement.

Description des méthodes mises en œuvre

Dans le cadre du développement d'une démarche globale d'investigation de l'impact de substances phytosanitaires, nous utiliserons le glyphosate comme molécule modèle pour en tirer des enseignements à la fois en terme de connaissances fondamentales mais également méthodologiques pour pourront être utiles à l'évaluation d'autres produits phytosanitaires. Nous combinerons une approche physiologique multifactorielle et diverses méthodologies complémentaires et multidisciplinaire afin d'évaluer les effets potentiels de substances phytosanitaires sur le système nerveux et le comportement. Nous utiliserons le rat comme modèle d'étude, une espèce sociale dont les bases en neurobiologie du comportement d'interaction sociale sont similaires chez les animaux d'élevage et les humains. Ici, les mères seront exposées à différentes doses de glyphosate (seul ou formulation, sur base de la NOAEL 1/10 et 1/100) par voie orale durant la gestation jusqu'à la fin de l'allaitement. Toutes les analyses seront réalisées sur les mères et leur descendance, mâle et femelle et toutes les approches technologiques sont maîtrisées, assurant la faisabilité du projet.

1a. Comportement: y compris les aspects moteurs, l'anxiété, et les interactions sociales (comportement maternel chez les mères traitées, jeux chez les juvéniles, comportements social et sexuel et préférence du partenaire chez la descendance adulte). Mois 0-6 et 18-24

1b. Analyse du cerveau: développement et l'architecture de diverses régions du cerveau: plusieurs noyaux de l'hypothalamus (comportement sociaux), le système limbique (émotions) et les zones neurogéniques, en quantifiant par immunofluorescence l'expression de plusieurs protéines (neuronale, gliales et microgliales). Mois 6-34

2. Analyse de l'incorporation in vivo. Détection in situ par technique de MALDI/ESI après conjugaison. Mois 18-34

3a. Analyse du microbiote intestinal: Les fèces des mères et leur descendance seront collectées à divers moments du traitement et la composition du microbiote analysée par technique de séquençage du gène de l'ARNr 16s. Mois 6-30

3b. Analyses des médiateurs: Stéroïdes, Cytokines et acides gras à chaînes courtes. Mois 6-12 et 24-30

Partenariat

IRSET - COCOON

Responsable de l'équipe : M. Thierry Charlier

BIOSIT - ImPACcell

Responsable de l'équipe : M. Rémy Le Guével

UMS BioCore, Nantes Université - Plateforme de Spectrométrie de Masse

Responsable de l'équipe : M. Mikaël Croyal

Résumé TEMPAIR-BREAST - 2024_EST_154

Modélisation temporelle de l'exposition aux polluants atmosphériques et risque de cancer du sein : Une analyse **vie entière des fenêtres critiques d'exposition.**

Mme Karen Leffondre
Université de Bordeaux ISPED - Bordeaux cedex

Projet complet - 36 mois
Budget : 199 507 € TTC

Objectif détaillé

Le cancer du sein suscite des préoccupations liées à des facteurs environnementaux, dont la pollution de l'air. Les études épidémiologiques ne disposent généralement pas de mesure d'exposition vie entière, et se concentrent souvent sur une intensité moyenne ou une dose cumulée d'exposition sur une fenêtre temporelle réduite. L'objectif est d'estimer l'association entre l'exposition vie entière à des polluants atmosphériques, en particulier ceux à effets perturbateurs endocriniens, et le risque de cancer du sein. L'approche vie entière permettra d'étudier les fenêtres critiques telles que celles liées au développement des tissus mammaires (in utero, puberté, grossesses et transition ménopausique). Les questions spécifiques sont

Q1. Quel est l'impact relatif de l'exposition aux polluants atmosphériques reçue pendant les fenêtres de susceptibilité définies a priori (in utero, puberté, grossesses et transition ménopausique) sur le risque de cancer du sein ?

Q2. Quels sont les profils de trajectoires d'exposition vie entière aux polluants atmosphériques perturbateurs endocriniens et sont-ils associés au risque de cancer du sein ?

Q3. Quelle est l'association entre la dose cumulée d'exposition tout au long de la vie aux polluants atmosphériques perturbateurs endocriniens et le risque de cancer du sein, et quel est le poids relatif des doses reçues tout au long de la vie ?

Originalité et/ou caractère novateur du projet

Les principales originalités de ce projet résident dans

- **La pleine exploitation statistique de données d'exposition vie-entière.** Pour les années entre 1990 et le diagnostic de cancer du sein (1991-2011) nous utiliserons les données d'exposition au dioxyde d'azote, à l'ozone et à 13 polluants sous forme particulaire (benzo[a]pyrène, polychlorobiphényles (PCB) 153, cadmium, dioxines, ammonium, carbonate de calcium, carbone suie, chlorure, nitrate, nitrate de calcium, poussières, sodium, sulfate) autour de la résidence, du lieu de travail et des trajets domicile-travail, obtenues à partir de Land Use Regression et de modèles de dispersion atmosphérique (CHIMERE)(1). Pour les années de la naissance à 1990, nous utiliserons des indicateurs basés sur un système d'information géographique, calculés à la résidence des femmes et corrélés à chaque polluant atmosphérique. Les données seront fournies par le projet CLEOPART.

- L'utilisation d'approches statistiques innovantes, notamment un modèle conjoint à classes latentes (JLCMM)(2), permettant la description et l'identification de profils de

trajectoires d'exposition vie entière, et l'estimation de leur association avec le risque de cancer du sein (Q2). Nous utiliserons également un indice cumulé d'exposition pondéré (WCIE)(3), permettant non seulement d'estimer l'association entre la dose cumulée d'exposition tout au long de la vie et le risque de cancer du sein, mais également d'estimer le poids de chaque dose d'exposition reçue, en fonction du moment de la vie où elle est reçue (Q3). Ces deux approches complémentaires permettront d'identifier des périodes de vulnérabilité sans poser d'a priori, contrairement à l'approche étudiant la dose à chaque période prédéterminée (Q1). Elles nécessiteront des extensions des méthodes et logiciels déjà existants qui pourront bénéficier à d'autres études sur les expositions chroniques environnementales.

- Des réflexions méthodologiques sur le choix des variables d'ajustement via l'utilisation de graphes acycliques orientés et sur l'interaction potentielle avec le niveau socio-économique.

Questions de recherche

CANCER 1 - Étude des risques de cancers liés à des expositions environnementales et/ou professionnelles aux substances, mélanges ou procédés potentiellement cancérigènes (entre autres avec une approche « vie entière »).

PE 6 - Études sur les niveaux d'exposition et évaluation des risques pour les travailleurs (expositions directes) et pour la population générale (expositions directes et indirectes par exemple via l'alimentation), et en particulier pour les populations vulnérables ou sensibles avec la détermination d'éventuelles fenêtres d'exposition critique.

AIR 2 - Liens entre pollution de l'air et effets sanitaires : recherche sur de nouveaux outils (bases de données sur la qualité de l'air par exemple, systèmes capteurs, modélisation, biomonitoring...) visant à améliorer l'étude de la relation dose-réponse utile à l'évaluation des risques.

CANCER1. Les données d'exposition vie entière aux polluants atmosphériques et l'utilisation de méthodes statistiques avancées prenant en compte toutes ces informations, nous permettra d'étudier de façon unique la relation dose-effet entre les polluants et le risque de cancer du sein.

PE6. Nous étudierons en particulier les polluants à potentiels effets perturbateurs endocriniens. Les méthodes d'analyse prévues sont toutes orientées vers la recherche de fenêtres d'exposition critiques. L'étude de l'interaction avec le niveau socio-économique nous permettra d'évaluer la vulnérabilité des plus défavorisées.

AIR2. Le projet développera une modélisation précise de l'exposition individuelle quantitative remontant jusqu'à la naissance avec une attention particulière portée à la relation dose-réponse. Il contribuera au développement de nouvelles méthodes statistiques en libre accès pouvant être utilisées pour toute relation dose-réponse entre exposition environnementale chronique et risque de cancer.

Description des méthodes mises en œuvre

Nous utiliserons les données de l'étude cas-témoins XENAIR(4), nichée dans la cohorte française E3N ayant inclus, en 1990-1991, 98995 femmes nées en 1925-1950. Les cas étaient les femmes nouvellement diagnostiquées d'un cancer du sein en 1990-2011 (n=5455). Un témoin par cas a été sélectionné au hasard parmi les femmes de la cohorte encore suivies et indemnes de cancer du sein au moment du diagnostic du cas, de même département de

résidence, d'âge, et de statut ménopausique à l'inclusion. L'historique résidentiel depuis la naissance a été recueilli pour 2876 cas et 3616 témoins qui feront l'objet des analyses.

Pour Q1, nous utiliserons pour chacun des 15 polluants atmosphériques, un modèle de régression logistique, incluant un indicateur d'exposition au polluant sur chaque fenêtre d'exposition définie à priori (in utero, puberté, grossesses, transition ménopausique). Il permettra d'estimer la cote de cancer du sein associée à une augmentation de la dose d'exposition propre à chaque fenêtre. Les effets potentiellement non linéaires seront étudiés grâce à des fonctions splines (M1-12).

Pour Q2, le JLCMM tiendra compte de la distribution de chaque polluant, de la forme des trajectoires individuelles d'exposition depuis la naissance, pour une sélection de polluants potentiellement perturbateurs endocriniens. Il est déjà implémenté dans un package R(5) pour les données de cohorte et nécessitera une extension aux données cas-témoins (M13-24).

Pour Q3, le WCIE tiendra compte des erreurs de mesure de chaque polluant perturbateur endocrinien, et sera étendu à la prise en compte d'effets potentiellement non linéaires, et des outils de mesure différents avant et après 1990 (M25-36).

Toutes les données d'exposition seront consolidées en 2024. Chaque question nécessitera 12 mois de travail pour le développement de la méthode et son implémentation dans un package R (Q2-3), l'application aux 15 polluants (Q1) ou aux polluants perturbateurs endocriniens (Q2-3).

Partenariat

Inserm U1219-BPH - Equipe Biostatistique

Responsable de l'équipe : Mme Karen Leffondre

CLCC Léon Bérard - Départ. Cancer et Environnement

Responsable de l'équipe : Mme Delphine Praud

Inserm U1018CESP - Equipe Exposome et Hérité

Responsable de l'équipe : Mme Elodie Faure

Résumé TESTISOME - 2024_EST_177

Exposition environnementale vie entière à des polluants à effets perturbateurs endocriniens et risque de tumeur germinale du testicule

Mme Béatrice Fervers

Centre Léon Bérard Département Prévention Cancer Environnement - Lyon

Projet complet - 36 mois

Budget : 208 935 € TTC

Objectif détaillé

L'incidence des tumeurs germinales du testicule (TGT) avec néoplasie germinale in situ (NGIS), cancers les plus fréquents chez les hommes de 15 à 45 ans, a beaucoup augmenté depuis 30 ans. Le pic d'incidence chez les hommes jeunes et le NGIS, précurseur commun présent chez les jeunes enfants, suggèrent une origine précoce des TGCT. L'exposition à des perturbateurs endocriniens (PE) au début de la vie est soupçonnée d'augmenter le risque de TGT-NGIS à l'âge adulte. Ces substances pourraient aussi jouer un rôle important durant certains moments clés du développement comme la puberté. De plus, la population est exposée à des agents multiples, mais leur effet combiné sur la santé humaine reste mal connu.

Dans ce contexte, la présente recherche examinera l'hypothèse d'une association entre l'exposition environnementale à des PE d'intérêts (i.e. certains pesticides agricoles et polluants atmosphériques) tout au long de la vie et le risque de TGT-NGIS, sur la base de l'étude nationale TESTIS, conduite par l'équipe 1, porteuse du projet.

Nous testerons l'hypothèse d'une association plus forte 1/ pour les expositions aux PE d'intérêt pendant des fenêtres de sensibilité spécifiques (FSS) : in utero, petite enfance, puberté ; 2/ pour les expositions combinées à ces PE ; 3/ pour les sujets porteurs de certains variants génétiques a) associés à un risque accru de TGT-NGIS, b) associés à la métabolisation des hormones sexuelles.

Originalité et/ou caractère novateur du projet

L'étude TESTIS multicentrique est l'une des plus grandes études cas-témoins sur les TGT-NGIS, visant à étudier l'association entre expositions précoces aux PE (sources diverses : professionnelle, parentale, domestique, environnementale) et le risque de TGT-NGIS à l'âge adulte. Les mères des sujets ont été incluses pour étudier les expositions in utero, ainsi que l'hypothèse d'un effet combiné d'expositions durant des FSS. La caractérisation des expositions environnementales aux PE (i.e. pesticides agricoles ; polluants de l'air à effets de PE : Benzo(a)pyrène (BaP), cadmium, polychlorobiphényle 153 (PCB 153) et des dioxines), repose sur des indicateurs de densité agricole à une échelle fine, des indicateurs socio-démographiques, et des modèles land use régression et SIG qui seront affinés. Cette étude sera la première à considérer l'impact combiné des expositions à ces PE. Les interactions gènes-environnement (GE), mal connues, seront investiguées afin de mieux comprendre les

mécanismes biologiques par lesquels ces PE seraient impliqués dans le développement de ces cancers.

Questions de recherche

CANCER 1 - Étude des risques de cancers liés à des expositions environnementales et/ou professionnelles aux substances, mélanges ou procédés potentiellement cancérigènes (entre autres avec une approche « vie entière »).

CANCER 4 - Interactions gènes/environnement/comportement, mécanismes épigénétiques.

ACHIM 2 - Caractérisation des expositions et étude, par voie expérimentale et épidémiologique, des impacts sur la santé en population générale, en milieu de travail en fonction de l'âge et du genre, et de populations sensibles peu étudiées.

CANCER1 : L'étude du risque de TGT-NGIS associé à l'exposition environnementale à différents PE, vie entière et durant des FSS constitue une piste majeure de recherche. Les PE multiples peuvent agir par le biais de mécanismes communs ou synergiques, même à des niveaux d'expositions faibles, pour activer les voies biologiques et métaboliques impliquées dans la cancérogénèse. ACHIM2 : Ce projet permettra d'estimer le risque de TGT-NGIS et ces expositions. Il permettra de mieux comprendre les interactions entre les expositions aux polluants atmosphériques et pesticides PE et leur impact combiné sur le risque des TGT-NGIS. CANCER4 : Les études GWAS ont identifiés plus de 20 loci de susceptibilité aux TGT. Ces loci suggèrent une perturbation de la différenciation des cellules germinales primordiales dans le développement des TGT. Des polymorphismes de gènes impliqués dans le métabolisme hormonal ont été associés au risque de TGT et pourraient modifier l'association entre l'exposition à des PE, dont certains pesticides, et le risque de TGT.

Description des méthodes mises en œuvre

Ce projet utilisera les données des 454 cas de TGT, et 670 témoins, nés entre 1969 et 1999, et recrutés dans 20 centres hospitaliers universitaires de France métropolitaine (2015 à 2018) dans le cadre de l'étude TESTIS. Les mères des participants ont été incluses et des échantillons de sang ont été prélevés à l'inclusion (60% des participants). Les entretiens téléphoniques ont permis notamment de recueillir l'histoire résidentielle, permettant de reconstituer les expositions vie entière.

Les hypothèses seront abordées dans 3 workpackages (WP) :

WP1 : Évaluation des expositions environnementales aux PE d'intérêt tout au long de la vie

1) Exposition agricole : Nous croiserons la densité par grande catégorie de cultures à échelle communale déjà construite depuis 1970 et une matrice culture exposition française afin d'estimer une probabilité d'exposition à différents pesticides PE, en particuliers aux organochlorés.

2) Exposition aux polluants de l'air : des indicateurs d'expositions à des polluants PE ont été développés dans le cadre d'autres projets. Nous disposons d'estimations des concentrations atmosphériques de fond du BaP, du cadmium, du PCB 153 et des dioxines pour la période 1990-2011 sur le France entière. Ces données sont en cours d'extension sur la période récente (2012-2018). Nous disposons par ailleurs d'estimations d'exposition aux rejets industrielles de dioxines et de cadmium (1990-2018). Des modèles de prédiction des grandes familles de polluants sur la période 1969-1990 seront développés dans le cadre du présent projet.

WP2 : Risque de TGT-NGIS associé aux expositions aux PE au début et tout au long de la vie

L'association entre l'exposition environnementale aux PE sera estimée séparément lors des FFS et cumulée sur la période d'étude (1969-2018). Les trajectoires d'exposition seront considérées à l'aide de modèles conjoints à classes latentes permettant de mettre en évidence des profils d'exposition longitudinaux. Les effets de l'exposition simultanée à de multiples PE seront évalués à l'aide de modèles spécifiques (BKMR et WQS). Les modèles seront ajustés sur des facteurs de confusion potentiels.

WP3 : Analyse des interactions gènes-environnement

Les prélèvements sanguins des sujets seront génotypés par l'équipe 2 à l'aide d'une puce GSA afin d'identifier les variants génétiques associés à un risque accru de TGT-NGIS (n=39 polymorphismes) et à la métabolisation des hormones sexuelles (n=25 polymorphismes). Il s'agit d'une étude de réplication avec l'identification de polymorphismes déjà connus. Ensuite des analyses d'interaction GE seront conduites, à l'aide d'approches spécifiques.

Calendrier

Année 1 : Extension des indicateurs d'exposition (WP1) et génotypage des échantillons (WP3)

Année 2 : Analyses des associations entre PE et risque de TGT-NGIS par FFS et vie entière

Année 3 : Analyses multi-expositions et risque de TGT-NGIS, et interaction GE

Partenariat

Centre Léon Bérard - Département Prévention Cancer Environnement

Responsable de l'équipe : Mme Béatrice Fervers

Commissariat à l'énergie atomique - Centre national de recherche en génomique humaine

Responsable de l'équipe : M. Jean-François Deleuze

Évaluation du diamètre aérodynamique et du coefficient d'absorption massique **comme nouvelles métriques pour l'étude** de la toxicité des particules fines carbonées contenant un taux **d'organiques variable**

M. Jérôme Yon

CNRS UMR 6614 - CORIA 675, avenue de l'Université - SAINT ETIENNE DU ROUVRAY

Projet complet - 36 mois

Budget : 199 992 € TTC

Objectif détaillé

De nombreuses études ont permis l'établissement d'un lien clair entre particules fines (PM_{2,5}) et santé. Les indicateurs d'expositions reposent sur des mesures de concentrations massiques dans l'air pour deux gammes de tailles d'aérosols (PM₁₀ ou PM_{2,5}). Ces informations, bien que pertinentes sont assurément insuffisantes car les particules les plus fines contribuent peu à la fraction massique alors qu'elles peuvent induire des effets sanitaires notables du fait de leur surface spécifique importante et de leur pouvoir de pénétration élevé dans l'arbre respiratoire. Un autre paramètre à considérer est la composition chimique (et en particulier la teneur en composés organiques de type HAP) qui joue un rôle prépondérant dans l'impact sanitaire. Il est donc important d'explorer la pertinence d'autres métriques que la fraction massique. Parmi les métriques étudiées pour les particules carbonées (carbone noir/brun) dans la communauté atmosphérique, le MAC (mass absorption cross section) nous renseigne de leur capacité d'absorption à même masse. Ce dernier est assez bien établi pour le carbone noir et moins bien pour le carbone brun. Il intervient pour interpréter les mesures optiques et joue un rôle fondamental dans les modèles de réchauffement climatique. Cette grandeur macroscopique dépend assurément de la teneur en composés organiques (OC/TC) et se présente donc comme une grandeur d'intérêt pour l'étude de la toxicité de ces particules. Le potentiel oxydant (PO) des PM est également considéré d'intérêt. En effet, des substances chimiques peuvent induire un stress oxydant conduisant à une altération cellulaire. Bien que de nombreuses études ont permis de mettre en évidence l'intérêt d'une telle mesure, très peu de données existent sur le lien éventuel qui pourrait exister entre le PO et la taille des PM et aucune étude à ce jour n'a associé des mesures de MAC à des mesures de PO.

Par conséquent, le présent projet vise à évaluer la pertinence de l'emploi du MAC comme paramètre influençant sur la toxicité des particules grâce à une approche paramétrique expérimentale associant des mesures optiques, des mesures de PO et des mesures cellulaires.

Originalité et/ou caractère novateur du projet

Le consortium possède une expérience antérieure dans l'exposition de cellules pulmonaires à des particules de combustion générées par un brûleur miniCAST pour des combustibles gazeux et liquides (projet PUFbio / Anses, EST 2017-190). Fort de cette expérience, il envisage de reprendre le protocole précédent en ajoutant la sélection des

particules par leur diamètre aérodynamique. Un classificateur à haute efficacité de transmission (AAC, couvrant la gamme de diamètre 25nm–5µm) sera utilisé. Le comptage **amont et aval à l'exposition cellulaires des particules** permettra d'évaluer le nombre ou la masse déposée. La réponse biologique des cellules exposées à des PM de diamètres différents (à même masse ou même nombre) sera comparée pour étudier les différences induites par la taille des particules.

Le deuxième aspect novateur consiste à associer les mesures cellulaires à la mesure du MAC. Le flux de PM sélectionnées en taille sera partagé entre une voie d'analyse toxicologique et une seconde permettant la mesure des propriétés optiques d'extinction et de diffusion de la lumière par les PM. Cela sera possible grâce à une cellule optique précédemment développée par le CORIA. La mesure optique du MAC pourra rendre compte de la composition des PM en composés organiques sans avoir recours à un prélèvement et une **analyse chimique qu'elle soit ciblée ou macroscopique (OC/TC)**. Une possible dépendance de ce paramètre au diamètre des particules sera également explorée. Ce projet, par essence pluridisciplinaire, associe des compétences liées aux aérosols de combustion, à leurs impacts toxicologiques et aux grandeurs d'intérêt pour la communauté des sciences atmosphériques.

Questions de recherche

AIR 2 - Liens entre pollution de l'air et effets sanitaires : recherche sur de nouveaux outils (bases de données sur la qualité de l'air par exemple, systèmes capteurs, modélisation, biomonitoring...) visant à améliorer l'étude de la relation dose-réponse utile à l'évaluation des risques.

AIR 3 - Évaluation des effets sur la santé de l'exposition à la pollution atmosphérique en incluant en particulier des « métriques » d'exposition autres que la masse des PM10 et PM2,5, pour les particules ultrafines (PUF), le carbone suie (black carbon), le carbone organique et les éléments métalliques.

AIR 4 - Indicateurs pertinents pour l'évaluation des expositions chroniques et/ou cumulées à la pollution de l'air (intérieur / extérieur).

Ce projet, délibérément axé sur les particules de combustion, répond au volet AIR. Les **métriques investiguées visent à améliorer l'étude de la relation dose-réponse utile à l'évaluation des risques sanitaires (Air 2) en se focalisant sur des sources de pollution atmosphérique de type particules ultrafines (PUF), carbone suie (black carbone), carbone organique (Air 3)**. En ce sens, le projet vise à identifier des indicateur/s pertinents pour l'évaluation des expositions chroniques et/ou cumulées à la pollution de l'air (Air 4).

Description des méthodes mises en œuvre

La tâche 1 (CORIA) sera consacrée au montage et à la prise en main du dispositif expérimental constitué d'un générateur de suie (miniCAST), d'un classificateur en diamètre aérodynamique (AAC) et d'une cellule optique développée par le CORIA permettant la mesure de sections efficaces d'extinction et de diffusion de la lumière. On identifiera trois points de fonctionnement du brûleur permettant de générer des PM représentatives du black carbone, brown carbone et un point intermédiaire et ceci pour différents diamètres. Une analyse OC/TC sera réalisée par un prestataire. La tâche 2 (CORIA) consiste à déterminer les propriétés radiatives (MAC) des PM pour les 3 points de fonctionnement et en fonction de leur diamètre aérodynamique (gamme 25–500nm). **Cette tâche permettra d'observer une possible dépendance du MAC à la taille des PM et à leur composition chimique.** La tâche 3 pilotée par le consortium consistera à mettre en place un protocole permettant de contrôler

la masse d'aérosol déposée sur les cellules pulmonaires à l'interface air-liquide (Vitrocell®) pour un même diamètre aérodynamique. On utilisera une microbalance (QCM) et des mesures de concentrations en nombre de particules (compteur optique). Ces mesures seront complétées par des analyses de clichés de microscopie électronique. Au terme de cette tâche, les temps d'exposition associés à chaque point de fonctionnement (de composition différente) seront déterminés. La tâche 4 (ABTE) vise à montrer une éventuelle corrélation entre le nombre de MAC et la toxicité cellulaire et acellulaire. Les mesures acellulaires consisteront en l'évaluation du PO (déplétion en antioxydants et test de réduction du DTT). Les mesures cellulaires seront évaluées après différents temps d'exposition sur des cellules pulmonaires en culture (lignée de cellules bronchiques à l'interface air-liquide). La toxicité cellulaire sera évaluée par des mesures de marqueurs de stress oxydant, d'inflammation et de la réponse AhR (aryl hydrocarbons receptor). La tâche 5 (consortium complet) vise à analyser l'ensemble des résultats et à les valoriser.

Partenariat

UMR 6614 CORIA - Métrologie des Aérosols

Responsable de l'équipe : M. Jérôme Yon

ABTE - ToxEMAC

Responsable de l'équipe : Mme Christelle Monteil

Résumé TOXIMET - 2024_EST_202

Spéciation, bioaccumulation et rétroactions biologiques : vers un nouveau modèle prédictif de la TOXicité de METaux et de leurs cocktails

Mme Charlotte Catrouillet

Institut de physique du globe de Paris 1 rue de Jussieu - Paris

Projet complet - 36 mois

Budget : 199 992 € TTC

Objectif détaillé

Il est nécessaire de développer un nouveau modèle de toxicologie en collaboration étroite entre géochimistes et écotoxicologues. BLM (Biotic Ligand Model) est le modèle majoritairement utilisé pour évaluer les risques toxicologiques de substances (ex : métaux, Me) vis-à-vis d'organismes vivants. Ce modèle, et tous ceux couramment utilisés, comporte de nombreux problèmes dans sa conceptualisation, ce qui limite son utilisation pour évaluer les risques toxicologiques en milieu naturel et expérimental complexe. BLM est divisé en 3 parties distinctes, présentant chacune des limites :

SPECIATION (différentes formes physiques et chimiques). La production de ligands organiques par les organismes vivants sous stress métallique n'est pas prise en compte dans BLM. Seule la concentration finale en matière organique ([MO]) est déterminée et considérée comme de la MO humique (modèle WHAM). Or, les propriétés des MO fraîchement produites diffèrent des humiques. Par exemple, sous stress métallique, des composés organiques thiolés (ex : cystéine, phytochélatines) sont produits mais leur présence et leur interaction avec les Me n'est pas prise en compte dans les modèles actuels.

LA BIOACCUMULATION est modélisée comme la sorption des Me sous leur forme libre en solution, à un seul ligand « biotique » fictif. Or, suivant le comportement chimique d'un Me, celui-ci va interagir avec différents organes de l'organisme. Par exemple, (1) Hg interagit avec les composés thiolés (cystéine) dans les organismes vivants, (2) Pb va interagir avec de nombreuses molécules du vivant et (3) les terres rares (REE) interagissent avec les pompes calciques de l'organisme. Un seul ligand biotique ne prend pas en compte ces spécificités et ne peut prédire les effets cocktails.

LA TOXICITE est calculée à partir de la concentration en Me complexé au ligand biotique. Avec cette conceptualisation, le modèle ne peut calculer la toxicité de mélanges de Me.

Dans ce projet, nous développerons, en collaboration entre géochimistes et écotoxicologues, un nouveau modèle de toxicité, libre de droit, prenant plus précisément en compte la spéciation des Me, leur bioaccumulation et leur toxicité. Il est basé sur les hypothèses suivantes :

1) La toxicité d'un Me dépend de sa spéciation, qui dépend de son comportement chimique. Ainsi, les Me sont classés en 3 catégories :

- les Me « mous », ayant une forte affinité pour les composés thiolés. Ils regroupent les Me les plus toxiques comme Hg, Cd, Ag, mais aussi des contaminants émergents Au, Pt, Tl et Pd ;

- les Me « durs », ayant une forte affinité pour les composés avec l'oxygène (carboxyliques et phénoliques), tels que Na, Mg, REE, Al, Fe, In, etc.

- les Me « intermédiaires », ayant une forte affinité pour les amines, comme Co, Ni, Cu, Zn et Pb.

2) La toxicité de cocktail de Me est additive lorsqu'ils font partie du même groupe chimique, et non additive lorsqu'il y a un mélange de Me mous et durs, par exemple.

Originalité et/ou caractère novateur du projet

Le modèle développé dans ce projet a pour but de prendre en compte la toxicité de cocktails de Me, ce qui est mal pris en compte dans les modèles actuels. L'un des aspects le plus novateur est la prise en compte de la rétroaction des organismes vivants face à un stress métallique avec la production de ligands organiques qui modifie la spéciation des Me.

Questions de recherche

ACHIM 1 - Effets sur les écosystèmes et la santé humaine : notamment effets à faibles doses, effets cocktails et relation dose/effet.

ACHIM 6 - Optimisation des protocoles d'évaluation des substances chimiques : amélioration et validation des méthodes, production de données utiles à la construction de valeur sanitaire de référence.

Ce projet répond aux questions à la recherche suivantes : ACHIM6 puisqu'il a pour objectif le développement d'un modèle permettant l'évaluation de l'impact des Me sur la santé des écosystèmes. Il permettra de mieux modéliser les effets toxicologiques des Me sur un organisme vivant modèle. ACHIM1 : dans cette étude, nous étudierons les effets de cocktails de Me sur une algue et les relations doses/effets en prenant en compte la spéciation des Me.

Description des méthodes mises en œuvre

L'espèce vivante considérée sera l'algue d'eau douce, *Raphidocelis subcapitata* (ISO 8692 : 2012) qui produisent des molécules organiques sous stress métallique. Six Me ont été choisis : 2 mous (Cd et Ag), 2 durs (La et In), 2 intermédiaires (Co et Ni). Le projet est présenté chronologiquement sous forme de 6 grandes étapes (E1-6), sur 36 mois (M1-M36).

E1 : Modélisation (IPGP, M1-M6). Une revue de la littérature sera réalisée afin de construire une base de données des constantes de réaction pour les Me étudiés, adaptée au milieu nutritif lors d'expériences écotoxicologiques. Des simulations seront réalisées avant toute expérience afin de calibrer les expériences à réaliser avec les algues. Par exemple, la valeur de pH expérimental sera choisie afin de contraindre la spéciation des Me au cours des expériences (ex : éviter la précipitation de solides mal définis).

E2 : Expériences écotoxicologiques (LIEC, M3-M12). Des mélanges Me-algues seront réalisées au LIEC. Les cibles des Me seront identifiées par méthodes micro/nano-XRF aux synchrotrons SOLEIL et ESRF (les porteurs sont familiers de ces analyses). Enfin, les concentrations en Me bioaccumulées et les effets toxiques sur les algues (EC10, EC50, indicateurs morphologiques, etc...) seront déterminés.

E3 : Réactivité des ligands produits (IPGP, M7-M19). En parallèle, des expériences écotoxicologiques, les ligands organiques produits par les organismes vivants seront identifiés (ex : composés thiolés, carboxyliques/phénoliques, amines), quantifiés et caractérisés. **Des expériences de complexation avec les Me étudiés permettront d'alimenter** la base de donnée des constantes de réaction nécessaire à la modélisation (voir E6).

E4 : Expériences écotoxicologiques sous forme de complexes (LIEC, M13-M21). Les expériences de E2 seront reconduites en complexant artificiellement en amont les Me avec **les ligands organiques produits par les algues. Cette étape permettra d'étudier l'effet de la** complexation par les ligands organiques sur la bioaccumulation et la toxicité des Me.

E5 : Expériences écotoxicologiques en mélange (LIEC, M22-M30). Les expériences seront réalisées dans un 1er temps avec des Me du même groupe chimique, puis de différents groupes.

E6 : Modélisation écotoxicologique (IPGP, M20-M36). Le modèle de toxicité sera divisé en **3 parties. La spéciation sera prise en compte via le couplage d'un modèle thermodynamique** (complexation Me-ligands) **et d'un modèle cinétique** (production des ligands). Trois types de ligands biotiques seront modélisés selon la catégorie chimique de Me. Les résultats expérimentaux de E1-5 permettront de paramétrer la complexation Me-ligands organiques et la sorption à des ligands biotiques.

Partenariat

Institut de physique du globe de Paris - IPGP UMR 7154

Responsable de l'équipe : Mme Charlotte Catrouillet

Université de Lorraine - LIEC UMR 7360

Responsable de l'équipe : Mme Carole Leguille

Résumé TOXMIX - 2024_EST_009

Identifier l'impact de la synergie toxique entre les contaminants environnementaux sur les systèmes neurologiques et cardiovasculaires.

M. Chris Jopling

INSERM Institut de Génomique Fonctionnelle - Montpellier

Projet complet - 36 mois

Budget : 199 680 € TTC

Objectif détaillé

Persistent environmental contaminants, such as phthalate plasticizers and perfluorinated acids, have been the subject of intense scrutiny in recent years. These compounds have also been associated with neurological and cardiovascular abnormalities. Despite the major inroads that have been made into understanding how these chemicals can impact human health, it is apparent that these chemicals are present as a mixture rather than individually in the environment. However, at present no mixture toxicity research has been performed to determine whether there is a toxic synergy between phthalates and perfluorinated acids. A recent INERIS document outlined a list of "substances pertinentes a surveiller" (SPAS) in surface water. In particular perfluorinated acids and phthalates have been given a high priority. Four molecules (Perfluorohexanoic acid (PFHxA), perfluorooctanoic acid (PFOA), diisobutyl phthalate (DIBP), and phthalate dimethyl (DMP) are concomitantly found in all the geographic regions studied. While data outline the pathological risks associated with exposure to each compound, the impact of their mixture toxicity on the environment and the relevance to the human-exposome are lacking. This represents a critical knowledge gap as it is apparent that these chemicals are present in water bodies across France as a mixture rather than individually.

Specific aims-

Our specific aim is to determine whether subacute mixtures of PFHxA, PFOA, DIBP and DMP result in synergistic effects that can impact neurological and cardiovascular systems. To address this, we will employ zebrafish larvae as an effective in vivo model in conjunction with cutting-edge technology. Evidence already indicates that individually these chemicals can cause various neurological and cardiovascular defects. However, the effects of subacute mixtures at environmentally relevant concentrations remain unknown.

Originalité et/ou caractère novateur du projet

Previous studies have utilised zebrafish larvae to assess the effects of exposure to either PFHxA, PFOA, DIBP and DMP alone. However, as far as we know, there are no studies describing the effects of mixtures of these chemicals on neuro/cardiovascular systems. We will tackle these existing knowledge-gaps by using zebrafish larvae in conjunction with cutting-edge technology to determine the effects that exposure to subacute mixtures of PFHxA, PFOA, DIBP and DMP have on the neuro/cardiovascular systems. We believe this

study will provide an in-depth analysis of the synergistic effects of PFHxA, PFOA, DIBP and DMP exposure which will serve as a basis for future epidemiology studies.

Questions de recherche

ACHIM 1 - Effets sur les écosystèmes et la santé humaine : notamment effets à faibles doses, effets cocktails et relation dose/effet.

ACHIM 3.2 - Prise en compte et caractérisation des multi-expositions et co-expositions en lien avec l'exposome : modèles in vitro et in vivo chez l'animal : développement d'indicateurs globaux « d'effets cocktail » d'une exposition chronique, identification d'espèces sentinelles, étude des effets synergiques et antagonistes des substances en mélanges.

Our data will provide an assessment of the physiological effects of PFHxA, PFOA, DIBP and DMP exposure ranging from the whole organism to cellular analysis and down to the transcriptome. This data will highlight cells and genes which are affected by exposure to mixtures of PFHxA, PFOA, DIBP and DMP. In particular our study will meet the aim highlighted in Agents chimiques- Une attention particulière est à porter notamment sur les composés perfluorés (PFAS), les ions perchlorate, les pesticides et leurs métabolites.

Description des méthodes mises en œuvre

WP1. Effects of PFHxA, PFOA, DIBP and DMP exposure on behaviour and cardiovascular physiology.

Behavior analysis- After 5 days of exposure to the contaminant mixture, zebrafish will be transferred to a 24 well plate. We will record locomotor activities using a DanioVision observation chamber coupled with Ethovision video tracking. Cardiac analysis- After 5 days of exposure to the contaminant mixture we will subsequently record highspeed movies of the beating zebrafish hearts. Movies will be analysed using both Heartbeat Analyser and MicroZebraLab.

Using both these approaches, we will identify the most effective PFHxA, PFOA, DIBP and DMP mixture concentrations which will be used in all subsequent WPs. Furthermore, we will also obtain valuable information regarding the synergistic effects of PFHxA, PFOA, DIBP and DMP mixtures.

WP2. Effects of PFHxA, PFOA, DIBP and DMP exposure on neuro/cardio electrical activity.

Optical mapping- We will use voltage and Ca²⁺ sensors with a non-invasive optical mapping system to record the fluorescent signals on the whole heart or brain surface, within the larvae in vivo. Zebrafish will be exposed to the mixtures of PFHxA, PFOA, DIBP and DMP based on the results of WP1. We will analyze data of frequency of depolarization (heart rate and brain spikes) and measure the spatiotemporal development of electrical signals in the brain and heart.

WP3. Effects of PFHxA, PFOA, DIBP and DMP exposure on neuro/cardiac tissue/cell structures.

In vivo 2-photon microscopy- In parallel, we will examine the effects elicited by exposure to PFHxA, PFOA, DIBP and DMP mixtures identified in WP1 at the cellular level. We will use zebrafish transgenic reporter lines expressing fluorescent proteins in specific brain and cardiac cell types. All transgenic lines are currently available in the JOPLING lab. In vivo whole brain and cardiac Z-stack images will be acquired using a 2-photon microscope. 3D cellular

maps will be generated using IMARIS software. We will quantify the neurovascular and cardiovascular cell structures in the 3D domain.

WP4. Effects of PFHxA, PFOA, DIBP and DMP exposure on neuro/cardiac cell transcriptomes.

Single nuclei RNAseq- To determine what effect exposure to PFHxA, PFOA, DIBP and DMP mixtures has on the transcriptome we will perform single nuclei RNAseq (snRNAseq) on brain and cardiac samples. Using the PFHxA, PFOA, DIBP and DMP mixtures identified in WP1, we will treat zebrafish larvae from 1hpf to 5dpf then collect brain and cardiac tissue. Samples will be pooled and dissociated, FAC sorted to remove debris, then passed to our genomics platform (MGX Montpellier) which will perform the snRNAseq (10x Genomics). This data will give a unique insight into the cells most affected by PFHxA, PFOA, DIBP and DMP exposure and the changes that occur in their transcriptomes.

Partenariat

Institut de Génomique Fonctionnelle - Cardiac development, disease and regeneration

Responsable de l'équipe : M. Chris Jopling

Institut de Génomique Fonctionnelle - CEREBROVASCULAR AND GLIA RESEARCH

Responsable de l'équipe : M. Nicola Marchi

Institut de Génomique Fonctionnelle - CARDIOPROTECTION, PHYSIOPATHOLOGY OF HEART RYTHM AND ISCHEMIA

Responsable de l'équipe : M. Angelo Torrente

Résumé WOODTOX-ALI - 2024_EST_028

Evaluation in-vitro de la toxicité pulmonaire des particules primaires et secondaires émises par le chauffage résidentiel au bois

Mme Benedicte Trouiller
Ineris Parc Technologique Alata - Verneuil-en-Halatte

Projet complet - 36 mois
Budget : 199 521 € TTC

Objectif détaillé

Le chauffage résidentiel au bois contribue majoritairement aux concentrations de particules fines (PM_{2.5}) observées dans l'air ambiant, notamment en hiver. Cette source est également responsable d'émissions d'espèces organiques, plus ou moins volatiles, qui sont transformées dans l'atmosphère par des processus de photo-oxydation en aérosols organiques secondaires (AOS) contribuant significativement aux concentrations de PM_{2.5}. Les effets toxicologiques des émissions de combustion du bois, notamment secondaires, sont encore mal connus. L'approche cellulaire in vitro, alternative à l'expérimentation animale, est très adaptée à l'étude de la toxicité des PM. La méthodologie conventionnelle à partir de PM collectées sur filtres puis extraites et mises en contact avec les cellules par submersion, souffre d'importantes limites ne permettant pas de rendre compte de façon réaliste de leurs effets. L'exposition à l'interface air-liquide (ALI) permet de simuler plus fidèlement les conditions physiologiques réelles d'exposition aux aérosols. Les objectifs du projet WOODTOX-ALI seront d'évaluer puis de comparer la toxicité pulmonaire des émissions primaires et secondaires (vieillies) d'un poêle à bûches et d'étudier les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués. Les relations entre la caractérisation physico-chimique détaillée des phases gazeuse et PM, et les réponses biologiques seront investiguées.

Originalité et/ou caractère novateur du projet

L'originalité du projet est de proposer une évaluation de la toxicité pulmonaire de particules primaires et secondaires (générées par simulation expérimentale d'un vieillissement atmosphérique) obtenues en conditions réelles d'utilisation d'un poêle à bûches. Celle-ci sera étudiée à partir d'expositions à l'ALI d'un modèle innovant d'épithélium alvéolaire humain, prenant en compte l'aérosol total (fractions gazeuse et PM₁) sans l'altérer. La caractérisation physico-chimique détaillée des aérosols auxquels seront exposés le modèle cellulaire et les mécanismes de toxicité cellulaire et moléculaire étudiés apporteront des éléments novateurs sur les composés chimiques impliqués.

Questions de recherche

CANCER 6 - Identification et/ou validation de biomarqueurs pour évaluer les risques dans des situations d'exposition environnementales ou professionnelles.

AIR 3 - Évaluation des effets sur la santé de l'exposition à la pollution atmosphérique en incluant en particulier des « métriques » d'exposition autres que la masse des PM₁₀ et PM_{2,5}, pour les particules ultrafines (PUF), le carbone suie (black carbon), le carbone organique et les éléments métalliques.

AIR 5 - Évaluation des effets (additivité ou interaction) de mélanges de substances présentes dans l'air (intérieur / extérieur) intégrant les mécanismes de formation des polluants atmosphériques secondaires à partir de polluants primaires ; étudier l'effet d'irritation sensorielle.

Le projet WOODTOX-ALI s'inscrit dans une thématique de qualité de l'air en ciblant les particules de combustion du bois (incluant Black Carbon, carbone organique, PUF) et en explorant des métriques de toxicité (stress oxydant, inflammation...) rendant compte de leurs effets sur la santé (AIR 3). Il adresse aussi bien les particules primaires que secondaires (émissions vieilles), et l'étude de l'impact du mélange complexe d'aérosols totaux (phases gazeuse et PM) (AIR 5). Il permettra d'identifier les voies de signalisation dérégulées et des biomarqueurs, selon le type d'émissions, afin de mieux évaluer les risques dans des situations d'exposition environnementale (CANCER 6).

Description des méthodes mises en œuvre

Tache 1 (S1-S2) : Génération et caractérisation physico-chimique des aérosols primaires et vieillis

Le projet WOODTOX-ALI s'appuie sur les essais de combustion résidentielle au bois et de vieillissement qui seront réalisés dans le cadre du projet WOODNIGHT, financé par l'ADEME, et menés sur le banc de combustion de biomasse de l'INERIS. Les effluents de combustion d'un poêle à bûches (hêtre) (Ecodesign 2022, 7 kW), utilisé dans des conditions les plus représentatives possible de l'usage réel, seront dilués (facteur 20 à 50, prise en compte des phénomènes post combustion, $[PM1]_{dilués}=500-5000 \mu g/m^3$) puis vieillis dans un réacteur d'oxydation à écoulement (Oxidation Flow Reactor, OFR) dans différentes conditions d'oxydation simulant les processus atmosphériques diurne ou nocturne générant des particules secondaires (radicaux OH ou NO₃, vieillissement équivalent à 1 jour ou 1 nuit, T°C ambiante, 40-70 % humidité relative). Le projet WOODNIGHT comprend une caractérisation physico-chimique détaillée des phases gazeuse (COVs, CO, NO_x...) et PM1 (masse, granulométrie, nombre, forme, BC, EC-OC, anions/cations, analyse moléculaire), en temps réel et en différé, aussi bien sur les émissions primaires que vieilles. Dans le cadre du projet WOODTOX-ALI, une caractérisation complémentaire de substances toxiques d'intérêt (métaux, HAP et dérivés nitrés et oxygénés, nitrophénols, composés carbonylés) en phase gazeuse et/ou PM1 sera conduite.

Tache 2 (S1-S4) : Exposition des cellules ALI aux aérosols primaires et vieillis et caractérisation des effets toxicologiques

L'exposition de cellules pulmonaires aux émissions primaires et vieilles sera réalisée de façon simultanée au moyen de deux systèmes ALI, en amont et aval de l'OFR. Elles seront conduites sur toute la durée d'un essai simulant une journée type de chauffage par un particulier (i.e sur 8h, n=3 par condition). En amont de l'exposition des cellules, un denuder permettra d'éliminer les oxydants utilisés pour le vieillissement des émissions. Le modèle sera une coculture des lignées hAELVi et A549 (pneumocytes type I et II) récemment caractérisée à l'INERIS. Une attention particulière sera portée sur la détermination de la masse de PM déposée à la surface des cellules (analyse de traceurs chimiques et mesures SMPS). Une analyse par microscopie à transmission/spectrométrie de masse ionique apportera des informations sur la morphologie et la composition chimique des PM au sein des cellules exposées. Outre les biomarqueurs de cytotoxicité conventionnels (Bleu Alamar, LDH), permettant d'ajuster la dose d'exposition (mortalité < 30%, dose visée 0,1-1 $\mu g PM1/cm^2 = 10-$

100× dose réelle pour obtenir des réponses biologiques détectables), le stress oxydant/nitrosant (DCFDA, glutathion), la génotoxicité (lésions primaires de l'ADN, 8-OHdG, g-H2AX), les dommages aux protéines (carbonylées) et aux lipides (4HNE), l'inflammation (voie NFkB, TNFa, IL1B, IL6, IL8), et l'expression différentielle des gènes (séquençage ARNm), seront investigués (3 à 72h après exposition) afin de déterminer les voies de signalisation dérégulées et des marqueurs spécifiques de la toxicité des émissions primaires vs vieilles, avec comme référence l'air de dilution.

Tache 3 (S4-S5) : Analyses des liens entre les réponses biologiques et la caractérisation physico-chimique détaillée

Les liens entre les réponses biologiques et la caractérisation physico-chimique seront étudiés à partir de différentes approches statistiques (ACP, hiérarchisation, etc.). Les résultats permettront de mettre en évidence les substances jouant un rôle majeur sur les différents indicateurs de toxicité étudiés, et les marqueurs spécifiques, selon la composition des PM1.

Partenariat

INERIS - TEAM

Responsable de l'équipe : Mme Benedicte Trouiller

INERIS - ANAE

Responsable de l'équipe : M. Alexandre Albinet

Université du Littoral Côte d'Opale - Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant, Equipe Chimie et toxicologie des émissions atmosphériques

Responsable de l'équipe : M. Frédéric Ledoux