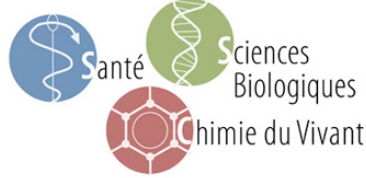




ECOLE DOCTORALE SSBCV



**Année 2017-2018 - Demande d'allocation doctorale
ED Santé, Sciences Biologiques et Chimie du Vivant (SSBCV) n°549**

1. Informations administratives :

Nom de l'encadrant responsable de la thèse : Sébastien ELIS
Unité : UMR PRC 7247 - INRA Centre Val de Loire
Equipe (*si unité multi-équipes*): Equipe Biologie intégrative de l'ovaire (BINGO)
Filière de rattachement : D
Email de l'encadrant : sebastien.elis@inra.fr

Co-encadrant éventuel (NB : limité à 1 seul co-encadrant(e)) :

2. Titre de la thèse : Effets et mécanismes d'action du bisphénol S sur les fonctions des cellules ovariennes de la granulosa

3. Résumé :

Le bisphénol A (BPA) est utilisé comme plastifiant dans l'industrie agro-alimentaire. Le BPA présente des effets délétères sur la fonction reproductive (hypothalamus et gonades) des mâles et des femelles. Chez les femelles, en ce qui concerne la folliculogenèse, le BPA se fixe sur le récepteur des estrogènes, affecte la formation des follicules primordiaux ainsi que la croissance folliculaire, inhibe la sécrétion d'estradiol dans les cellules de granulosa et augmente la sécrétion de progestérone. Le BPA a également un effet délétère sur la maturation de l'ovocyte et sur le succès de la gestation. Pour toutes ces raisons, l'usage du BPA a été interdit en France dans les biberons et l'industrie agro-alimentaire. De nouveaux analogues du BPA, tel que le bisphénol S (BPS), ont émergé, ceux-ci présentant des propriétés physico-chimiques leur permettant de remplacer le BPA. Actuellement, les données obtenues chez les rongeurs et les poissons suggèrent que les 2 molécules (BPA et BPS) ont des effets similaires sur l'organisme et d'intensité comparable. Il est donc important de confirmer et de préciser les effets observés chez les mammifères et notamment chez l'espèce humaine. Par ailleurs, le métabolisme des lipides est important dans les fonctions ovariennes, dans l'acquisition de la compétence ovocytaire et dans la régulation des fonctions des cellules de la granulosa. De plus, la proportion croissante de femmes obèses présentant des troubles de la reproduction (inclus dans des protocoles de fécondation *in vitro*) nous incite à inclure ce paramètre du statut métabolique dans l'étude.

Les objectifs de la thèse seront donc d'étudier *in vitro* les effets et mécanismes d'action du BPS sur les fonctions des cellules de granulosa humaines et ovines. Ils consisteront également à étudier *in vivo* les modifications d'expression de gènes de la stéroïdogenèse suite à une exposition prolongée chez la brebis adulte ainsi que les interactions avec le statut métabolique, puis les effets sur la population folliculaire de jeunes agnelles exposées *in utero*.

L'originalité du projet repose sur l'approche *in vivo* / *in vitro* et multi-espèces (modèle humain / modèle ovin) des effets du bisphénol S, sachant que le rongeur ne constitue pas un modèle suffisamment sensible pour être pertinent et extrapolé en terme de dose à l'humain.

De plus l'étude des effets du bisphénol S, après une exposition prolongée, en fonction du statut métabolique de l'individu constitue une deuxième originalité de ce projet, en cherchant à caractériser au mieux les implications de l'augmentation du nombre de femmes en surpoids ayant recours à la fécondation *in vitro*.

La thèse proposée consistera à étudier **1) les effets et mécanismes d'action du bisphénol S (BPS)** sur les cellules ovariennes ovines et humaines. Cette étude portera sur les effets *in vitro* aigus (effet dose) du BPS sur la fonction des cellules de granulosa de brebis et de femmes (notamment la sécrétion de progestérone et d'estradiol). Elle portera également sur le suivi de l'exposition aux bisphénols des femmes en âge de procréer en traitement d'AMP (mesures effectuées dans le liquide folliculaire de femmes subissant une procédure de fécondation *in vitro*, FIV), sur l'étude des gènes impliqués dans la stéroïdogénèse et sur les mécanismes mis en jeu par le BPS conduisant à la régulation de ces gènes (hypothèses : action via les récepteurs ER α/β (Estrogen receptor) et GPR30 (G protein coupled receptor 30) et via la voie de signalisation ERK1/2) ; **2) les effets *in vivo* d'une exposition prolongée** (3 mois minimum) au BPS **chez la brebis**, notamment en terme d'effets sur les **gènes** impliqués dans la stéroïdogénèse dans les cellules de la granulosa, sur le **stéroïdome** du liquide folliculaire et sur le **protéome** des cellules de la granulosa, les expérimentations *in vivo* chez l'adulte seront menées dans deux lots de brebis présentant un statut métabolique contrasté (maigre vs gras), puisque ce statut peut affecter la sensibilité des cellules ovariennes, afin d'évaluer **l'impact du statut métabolique** sur les effets du BPS, et **3) les effets sur la folliculogenèse fœtale**, par le suivi des effets sur la population folliculaire sur des **agnelles exposées *in utero*** ;

L'utilisation du modèle brebis dans la thèse permettra d'une part, un accès plus simple et non limité (en quantité) aux cellules ovariennes, et d'autre part, d'étudier les effets du BPS en fonction du statut métabolique de l'animal (Les modèles rongeurs présentant des résistances à ces molécules ne sont donc pas de bons modèles pour l'humain).

Ce sujet de thèse est inclus dans un projet plus large financé par la Région Centre Val de Loire (APR IR 2017) et permettra à l'étudiant d'être intégré dans un partenariat riche favorisant les échanges scientifiques et multidisciplinaires (partenaires académiques : INRA PRC, INRA UEPAO, CHRU, BRGM ; partenaires non académiques issus de la société civile: FNE, SEPANT, FRAPS, ASEF, RES, et des collectivités territoriales : Région Centre Val de Loire).

4. Résumé en anglais :

Effects and mechanism of action of bisphenol S on granulosa cell functions

Bisphenol A (BPA) has been used as plasticizer in the food industry. BPA was shown to exhibit numerous deleterious effects on the reproductive function (hypothalamus and gonads) in both males and females. In females, concerning folliculogenesis, BPA affects primordial follicle formation and follicular growth, it binds estrogen receptor and inhibits estradiol secretion and increases progesterone secretion in granulosa cell culture. BPA also exerts deleterious effects on oocyte maturation and gestation success. Because of all its side effects, BPA has been prohibited in France from baby bottle and the food industry. New BPA substitutes, including bisphenol S (BPS), have been proposed, these substitutes exhibiting physico-chemical properties enabling them to replace BPA. Data obtained on rodents and fish suggest that both molecules (BPA and BPS) present similar effects of similar intensity. It is, therefore, of importance to investigate BPS effects in mammals and especially in human. Moreover, lipid metabolism is crucial for ovarian functions, oocyte developmental

competence and to regulate granulosa cell functions. Furthermore, the increasing proportion of obese women with reproductive complications (included in *in vitro* fecundation protocol) highlighted the relevance of studying the parameter of metabolic status in this study.

The objectives of the thesis are to study *in vitro* effects and mechanisms of action of BPS on human and ovine granulosa cells. We will also study, *in vivo*, following a prolonged exposure in ewes, steroidogenic gene expression modifications and interaction with the metabolic status, and effects on follicular population in young females exposed *in utero*.

The originality of the project relies on the *in vivo* / *in vitro* and multi species approach (human and ovine model) of BPS effects, knowing that rodents cannot be considered as a relevant and sensitive model in terms of doses for the human. Moreover, the study of BPS effect, after a prolonged exposure, taking into consideration the metabolic status is another originality of the project, as it aims to better characterize the implications of the increasing number of obese women undergoing *in vitro* fecundation.

The thesis will consist in studying **1) effects and mechanisms of action of BPS on human and ovine granulosa cells**. This study will focus on acute *in vitro* BPS dose effects on functions of ovine and women granulosa cells (notably progesterone and estradiol secretion). The study will also consist in following the bisphenol exposure in women undergoing *in vitro* fecundation (measures in follicular fluid during IVF), in studying genes involved in steroidogenesis and mechanisms of BPS leading to the regulation of these genes (hypothesis: action through receptors ER α/β (Estrogen receptor) and GPR30 (G protein coupled receptor 30) and via the ERK1/2 signaling pathway) ; **2) In vivo effects of a BPS prolonged exposure** (above 3 month) in **the ewes**, notably in terms of genes involved in steroidogenesis in granulosa cells, of **steroidome** of the follicular fluid and of the **proteome** of granulosa cells. Two experimental groups of ewes exhibiting a contrasted metabolic status will be used (slim versus fat ewes), this metabolic status being able to affect cell sensitivity, so that the **impact of metabolic status** on BPS effects can be measured ; and **3) BPS effects on fetal folliculogenesis**, by measuring BPS effects on follicular population in young females exposed *in utero*.

The ovine model in this thesis will enable a non limited access to ovarian cells and also to study BPS effects depending on the metabolic status (rodent models exhibit resistance to bisphenols and are therefore not a relevant model for human).

This thesis project is included in a larger project funded by Région Centre Val de Loire (APR IR 2017) and will enable the student to be integrated in a rich partnership encouraging scientific and multidisciplinary discussions (academic partners : INRA PRC, INRA UEPAO, CHRU, BRGM ; non academic partners from civil society : FNE, SEPANT, FRAPS, ASEF, RES, and local authorities : Région Centre Val de Loire).