

Université de Bourgogne

Ecole doctorale Environnement-Santé (E-S)

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BOURGOGNE

en

SCIENCES DE L'ALIMENTATION

Mention TOXICOLOGIE

Présentée et soutenue publiquement par

Sofiane BOUDALIA

Le 04 Décembre 2012

**Exposition continue aux xéno-hormones à faibles doses chez le rat:
Effets multi-générationnels de mélanges sur les préférences gustatives,
le comportement maternel et le développement**

Directrice de thèse : Marie-Chantal CANIVENC-LAVIER

Co-encadrante de thèse : Cécile HELIES

JURY

Président :

Pr. Yves ARTUR

Université de Bourgogne, Dijon

Rapporteurs :

Pr. Jean-Pierre BOURGUIGNON

Université de Liège, Belgique

Dr. Henri SCHROEDER

Université de Lorraine, Nancy

Examineurs :

Dr. Marie-Chantal CANIVENC-LAVIER

INRA, Dijon

Dr. Jean-Pierre CRAVEDI

INRA, Toulouse

Ecole doctorale Environnement-Santé (E-S)

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BOURGOGNE

en

SCIENCES DE L'ALIMENTATION

Mention TOXICOLOGIE

Présentée et soutenue publiquement par

Sofiane BOUDALIA

Le 04 Décembre 2012

**Exposition continue aux xéno-hormones à faibles doses chez le rat:
Effets multi-générationnels de mélanges sur les préférences
gustatives, le comportement maternel et le développement**

Directrice de thèse : Marie-Chantal CANIVENC-LAVIER

Co-encadrante de thèse : Cécile HELIES

JURY

Président :

Pr. Yves ARTUR

Université de Bourgogne, Dijon

Rapporteurs :

Pr. Jean-Pierre BOURGUIGNON

Université de Liège, Belgique

Dr. Henri SCHROEDER

Université de Lorraine, Nancy

Examineurs :

Dr. Marie-Chantal CANIVENC-LAVIER

INRA, Dijon

Dr. Jean-Pierre CRAVEDI

INRA, Toulouse



REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse n'aurait pas pu aboutir sans le soutien financier du département alimentation humaine de l'INRA et du Conseil Régional de Bourgogne (Bourse doctorale), de l'école doctorale E2S (Bourse de mobilité) et du Ministère de l'Ecologie, du Développement Durable et de l'Ecologie (MEDDE, programme PNR-PE), ainsi que le concours de nombreuses personnes à qui j'aimerais témoigner ici ma profonde gratitude et toute ma reconnaissance.

Tout d'abord je tiens à remercier tous les membres du jury, qui m'ont fait l'honneur de bien vouloir juger cette thèse et de l'avoir lu avec beaucoup d'intérêt et de rigueur : Mr Henri SCHROEDER et Mr Jean-Pierre BOURGUIGNON pour avoir accepté d'en être les rapporteurs, Mrs Jean-Pierre CRAVEDI et Yves ARTUR pour avoir accepté d'en être les examinateurs.

Je tiens à remercier le Mr Luc PENICAUD, directeur du centre des sciences du goût et de l'alimentation, de m'avoir accueilli dans son unité et Mme Sylvie ISSANCHOU, chef d'équipe « Développement et dynamique des préférences et du comportement alimentaires » de m'avoir accueilli dans son équipe.

Je tiens à remercier ma directrice de thèse, Mme Marie-Chantal CANTVENC-LAVIER pour m'avoir accordé sa confiance lors de mon premier passage dans l'unité durant mon stage de Master II et de m'avoir initié au domaine fabuleux de la perturbation endocrinienne, et puis de m'avoir accompagné durant ces trois années de thèse.

Je tiens à remercier ma co-encadrante de thèse, Mme Cécile HELIES pour avoir accepté de faire partie de ce projet de thèse.

Merci à Mr Jean Pierre CRAVEDI, Mr Philippe BESNARD et Mme Latifa ABDENNEBI-NAJAR pour avoir accepté de faire partie du comité

de suivi de thèse, avec qui j'ai eu des discussions très enrichissantes, et aussi pour leurs conseils scientifiques.

Je tiens à remercier tout également Raymond BERGES, pour m'avoir initié à l'expérimentation animale, pour son soutien et sa présence. Merci à Chatherine DESMETZ, Christine BELLOIR, Franck MENÉTRIER et Marie-Louise MILLER, je tiens à leurs témoigner toute ma reconnaissance pour leur générosité et pour m'avoir appris les techniques nécessaires pour mon travail.

Merci à Laurence DECOQ, Elise LALARME, Bruno PASQUIS et Sylvie pour l'énorme travail accompli dans l'animalerie, pour m'avoir supporté durant cette thèse. Merci à Florence et Raymond GAZEL de Toxalim (INRA Toulouse) pour leur aide précieuse au moment des sacrifices, pour leur gentillesse et sympathie.

Merci à Claire CHABANET, notre biostatisticienne pour sa disponibilité surtout les trois dernier mois de ma thèse pour son aide précieuse.

Merci à Céline TIFFON, post doctorante dans l'équipe avec qui j'ai partagé des moments agréables dans le laboratoire de biologie moléculaire, pour sa gentillesse, sa générosité scientifique et ces compétences techniques et son implication dans ce projet.

Je tiens à remercier Mr Jaques AUGER et Mme Florence EUSTACHE pour leurs sympathies et leurs conseils scientifiques dans le domaine de la perturbation endocrinienne lors de chaque passage à Dijon.

Merci à Daniel ZALKO et Nicolas CABATON du Toxalim à Toulouse pour leur accueil chaleureux et leur convivialité lors de mon déplacement là-bas pour analyser mes échantillons au service de phénotypage à Anexplo-Toulouse.

Je remercie Arièle, Elodie, Fouzia, Maud, Mireille, Nicolas Laurence et Wided pour leur aide, conseils et sympathie, avec qui j'ai passé d'agréables moments et qui ont fortement contribué à mon intégration rapide dans l'UMR, je les remercie également pour leur soutien, surtout dans les moments difficiles.

Merci à tous les chercheurs et ingénieurs du laboratoire qui, à un moment ou à un autre, m'ont conseillé et aidé : Loïc BRIAND, Anne marie LE BON, Fabrice NEIERS, Sophie NICKLAUS, Stéphanie CHABARON, Sandrine MONNERY PATRIS, Claire SULMONT ROSSE, Nicolas POIRIER, Joëlle CHEVALIER, Michel PONCHELET et Denis ROBERT....

Merci à mes deux meilleurs informaticiens, Martine et Lucien, pour leur aide à chaque fois que j'avais un souci avec mon ordinateur. Et je sais que j'en avais beaucoup de soucis durant ma thèse.

Je remercie toute l'équipe CSGA INRA, pour son accueil très chaleureux, ainsi que toutes les personnes rencontrées durant cette thèse et qui sont devenues plus que des collègues, Imade, Sarah et Narjisse.

Je tiens à remercier tous mes amis Bassim, Hichem, Omar et Wahid qui m'ont soutenu malgré les distances et qui ont toujours su me remonter le moral quand il le fallait.

Merci Enfin à ma famille ; ma mère, mes frères, mes sœurs qui m'ont toujours soutenu et encouragé et cru en moi dans toutes mes démarches. Merci aussi à ma moitié Nassima pour sa patience et son soutien durant cette dernière année.

Une pensée également à mon défunt père sans qui rien n'aurait été possible.

Que cette thèse leur soit dédiée...

LISTE DES POSTERS ET PUBLICATIONS

Posters

1- CANIVENC-LAVIER, MC ; APPLANAT, M ; AUXIETRE, TA ; BABAJKO, S ; BERDAL, A ; BERGES, R ; **BOUDALIA, S** ; CHAGNON, MC ; CRAVEDI, JP ; CORVOL, M ; DECOQ, L ; DESMETZ, C ; DHABI, L; EUSTACHE, F. ; EL SHEIKH SAAD, H ; HELIES-TOUSSAINT, C, JEDEON, K, LALARME, E, MENETRIER F, SAVOURET, JF, PASQUIS, B, TIFFON C, VAIMAN, D, AND AUGER, J. “**Colloque PNR-PE**”, 10-11 Décembre 2012, Paris. CIME 2012: An integrative and multidisciplinary PNR-PE project on Chronic Impact of ED Mixture Exposure at environmental low doses on Reproduction, Development and Behavior

2- COSTANZO C, **BOUDALIA S**, CRAVEDI, JP, CANIVENC-LAVIER MC, HÉLIÈS-TOUSSAINT C. “**Colloque PNR-PE**”, 10-11 Décembre 2012, Paris. 2012. L’exposition par des mélanges de perturbateurs endocriniens à faibles doses modifie la différenciation adipocytaire.

3- **BOUDALIA, S**; TIFFON, C; CHABANET, C ; DECOQ, L ; LALARME, E; PASQUIS, B ; BERGÈS, R; and CANIVENC-LAVIER, MC. “**Colloque PNR-PE**”, 10-11 Décembre 2012, Paris. Effects of BPA and Endocrine Disruptor Mixtures on development and taste preferences in the non-exposed F2 offspring Wistar rats.

4- FOLIA, M ; **BOUDALIA, S** ; MENETRIER, F ; TIFFON, C ; DECOCQ, L ; PASQUIS, B ; SCHNEIDER, C ; BERGÈS, R ; ARTUR, Y, and CANIVENC-LAVIER, MC. “**Colloque PNR-PE**”, 10-11 Décembre 2012, Paris. Effets d’une exposition orale en Bisphenol A sur la préférence au salé et la structure de la glande sous-mandibulaire chez le rat mâle adulte.

5- **BOUDALIA S**, BERGES R, MENETRIER F, HELIES C AND CANIVENC-LAVIER M-C. 48^{ème} Congrès de “**European Societies of Toxicology (EUROTOX)**”, 17-20 Juin 2012-Stockholm, Suède. Continuous exposure to low-dose of bisphenol A alone or in mixture alters adipogenesis.

6- **BOUDALIA S**, DECOCQ L, PASQUIS B, BERGÈS R AND CANIVENC-LAVIER M-C. **International Toxicology of Mixtures Conference**, 21-23 Octobre 2011-Arlington, VA, USA. Transgenerational effects of xeno-hormone mixtures on development and behavior in rats.

7- CANIVENC-LAVIER M-C., **BOUDALIA S**, FOLIA M, KOUIDHI W, BERGÈS R, ISSANCHOU S. **International Toxicology of Mixtures Conference**, 21-23 Octobre 2011-Arlington, VA, USA. Sexual dimorphism relevance of biological targets for a trans-generational study in a rodent model.

8- **BOUDALIA S**, DECOCQ L, PASQUIS B, BERGÈS R AND CANIVENC-LAVIER M-C. **International Toxicology of Mixtures Conference**, 21-23 Octobre 2011-Arlington, VA, USA. Trans-generational effects of xeno-hormone mixtures on development and behavior in rats.

Communications orales

1- **BOUDALIA S**, KOUIDHI W, BERGES R, AUGER J AND CANIVENC-LAVIER M-C. Colloque de l’**Association pour la Recherche En Toxicologie (ARET)**, 20-21 Juin 2011-Paris, France. Low dose in vivo studies of dietary endocrine disruptor mixtures: transgenerational approach using an integrative and pluridisciplinary experimental model in rat.

2- **BOUDALIA S**, DECOCQ L, PASQUIS B, BERGES R AND CANIVENC-LAVIER M-C. **Forum des jeunes chercheurs**, 16-17 Juin 2011- Dijon, France. Transgenerational effects of bisphenol A at very low dose on development and behavior in Wistar rats.

3- **BOUDALIA S**, DECOCQ L, PASQUIS B, BERGES R AND CANIVENC-LAVIER M-C. **Colloque de la Société Algérienne de Toxicologie (SATOX)**, 4-5 Mai 2011- Alger, Algérie. Effects of xeno-hormone exposure at low doses in mixtures on development and behavior in rats.

Publications

- 1- **BOUDALIA S**, BERGÈS R, FOLIA M, CHABANET C, DECOCQ L, PASQUIS B, ABDENNEBI-NAJAR L AND CANIVENC-LAVIER M -C. Trans-generational effects of a chronic exposure to a low dose of Bisphenol A on maternal and food behavior in Wistar Rats ». *Neurotoxicology and teratology*, (en révision).

- 2- FOLIA M, **BOUDALIA S**, MÉNÉTRIER F, DECOCQ L, PASQUIS B, SCHNEIDER C, BERGÈS R, ARTUR Y AND CANIVENC-LAVIER M-C. Oral homeostasis disruption by medical plasticizer component Bisphenol A in adult male rats. *The Laryngoscope*, (Accepté).

- 3- FOLIA M, **BOUDALIA S**, MENETRIER F, DECOCQ L, PASQUIS B, SCHNEIDER C, BERGES R, ARTUR Y AND CANIVENC-LAVIER M-C. Effects of oral Bisphenol A exposure on sweet preference and on submandibular salivary gland structure in male adult rat. *La Revue de Geriatrie*, Tome 37, N°9 NOVEMBRE 2012.

- 4- **BOUDALIA S**, TIFFON C, BERGÈS R, MÉNÉTRIER F, FOLIA M, HÉLIÈS C AND CANIVENC-LAVIER M -C. Continuous exposure to low-dose of bisphenol A alone or in mixture alters adipogenesis, (en préparation).

LISTE DES ABREVIATIONS

AC6	Gustine
ADI	<i>Acceptable Daily Intake</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
AFSSA	Agence Française de Sécurité Sanitaire des aliments
AgRp	<i>Agouti Related Peptide</i>
AhR	<i>Aryl hydrocarbon receptor</i>
AJMT	Apport Journalier Maximum Théorique
ANSES	Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et de travail
AR	<i>Androgen Receptor</i>
ARE	<i>Androgen Reponse Element</i>
ARKO	<i>Androgen Receptor Knock-Out</i>
ArKO	<i>Aromatase Knock-Out</i>
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BDNF	<i>Brain-Derived Neurotropic Factor</i>
BPA	Bisphénol A
CAR	<i>Constitutive Androstone Receptor</i>
CART	<i>Cocaine and Amphetamine Regulated Transcript peptide</i>
CDNB	1-chloro-2,4-dinitrobenzène
CCK	Cholécystokinine
C/EBP	<i>CCAAT / Enhancer binding Protein</i>
CstC	Cystatine
DABA	<i>3,5-Diaminobenzoic Acid</i>
DEQM	Direction Européenne de la Qualité du Médicament & Soins de Santé
DES	Diéthylsibestrol
DEX	Dexaméthasone
DEXA	<i>Dual X-Ray Absorptiometry</i>
DHA	Déhydroépiandrostérone
DHT	Déhydrotestostérone
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DNase	Désoxyribonucléase
DO	Densité Optique
DTT	Dichlorodiphényltrichloroéthane
E ou E2	17 β -œstradiol
ED	<i>Embryonic Day</i>
EDTA	<i>Ethylene Diamine Tetracetic Acid</i>
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
ELISA	<i>Enzym Linked Immunosorbent Assay</i>
EMX	Enzyme du métabolisme des xénobiotiques
EOPS	Exempt d'Organismes Pathogènes Spécifiques
EPA	<i>U.S Environmental Protection Agency</i>
ER	<i>Estrogen Receptor</i>

ERE	<i>Estrogen Reponse Element</i>
ERKO	Estrogen Receptor Knock-Out
ERE	Estrogen Response Element
FSH	Follicle Stimulating Hormone
G ou GEN	Génistéine
GABA	γ -aminobutyric acid
GD	<i>Gestational Day</i>
GCT	<i>Granular convoluted tubules</i>
GnRH	<i>Gonadotropin Releasing Hormone</i>
GR	Glucocorticoid Receptor
Gpx	Glutathion Peroxydase
HAM	Hormone Anti-Müllérienne
HAP	Hydrocarbures aromatiques polycycliques
CHO-HDL	High Density Lipoprotein
HGF	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>
HRE	<i>Hormone Response Element</i>
HSD	Hydroxystéroïde déshydrogénase
HSP	<i>Heat Shock Protein</i>
IL	Interleukine
IR	<i>Insulin Receptor</i>
IGF-1	<i>Insulin-like Growth Factor 1</i>
IGF-1R	<i>Insulin-like Growth Factor 1 receptor</i>
IMC	Indice de masse corporel
IPCS	<i>International Program of Chemical Safety</i>
KO	<i>Knock-Out</i>
KLK	Kallicréines
CHO-LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
LH	<i>Luteinizing Hormone</i>
LHA	<i>Lateral Hypothalamic Area</i>
LHRH	<i>Luteinizing Hormone Releasing Hormone</i>
LMR	Limite Maximale de Résidus
LOAEL	<i>Lowest-Observed Adverse-Effect Level</i>
M1	Acide 2[[[(3,5-dichlorophényl) carbmoyl]-oxyl]-2-méthyl-3-buténoïque
M2	Acide N-(2-hydroxy-2-méthyl-1-oxobutèn-3-yl)-3,5-dichlorophényl-1-carbamique
MCH	<i>Melanin-Concentrating Hormone</i>
MPOA	<i>Median PreOptic Area</i>
MR	<i>Mineralocorticoid Receptor</i> / Récepteur des minéralocorticoïdes
Muc	Mucine 10
NCBI	<i>National Center for biotechnology Information</i>
NGF	<i>Nerve growth factor</i>
NHANES	<i>The National Health and Nutritional Examination</i>
NOAEL	<i>No Observable adverse Effect Level</i>
NPY	Neuropeptide Y
Ns	Non significatif
NST	Tractus de noyau solitaire
ORO	<i>Oil-Red O</i>
pb	Paire de bases
PC	Poids Corporel
PCB	Polychlorobiphényles
PCN	Pregnenolone

PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PE	<i>Perturbateur Endocrinien</i>
PND	<i>Post Natal Day</i>
POMC	<i>Pro-Opiomelanocortin</i>
POP	<i>Persistent Organic Pollutant Polluants</i>
PPAR	<i>Peroxisome Proliferator Activated Receptor</i>
PR	<i>Progesterone Receptor</i>
PRKO	<i>Progesterone Receptor Knock-Out</i>
Pref-1	<i>Preadipocyte factor-1</i>
PVC	<i>Polychlorure de Vinyle</i>
PXR	<i>Pregnane X Receptor</i>
RmRNASF	<i>Estrogen Regulated mRNA Stabilizing Factor</i>
RNase	<i>Ribonucléase</i>
RPS9	<i>Ribosomal Protein S9</i>
RR	<i>Risque Relatif</i>
RT	<i>Reverse Transcription</i>
RXR	<i>Retinoid X Receptor</i>
SBG	<i>Sexe binding globulin</i>
SEEM	<i>Selective Estrogen Enzyme Modulator</i>
SERM	<i>Selective Estrogen Receptor Modulator</i>
SHBG	<i>Sex Hormone Binding Globulin</i>
SRCC1	<i>Steroid Receptor Coactivator 1</i>
SVF	<i>Sérum de Veau Foetal</i>
SOD 1	<i>Super oxyde dismutase</i>
TCDD	<i>2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-<i>p</i>-dioxine</i>
TG	<i>Triglycéride</i>
TRAP220	<i>Thyroid Hormone Receptor Activator Protein 220</i>
Tris	<i>Trishydroxyméthylaminométhane</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelium Growth Factor</i>
VLDL	<i>Very Low Density Lipoprotein / Lipoprotéine de très basse densité</i>
VMH	<i>Ventromedial Hypothalamic Nucleus</i>
XE	<i>Xéno-œstrogène</i>
XRE	<i>Xenobiotic Response Element</i>
YES	<i>Yeast Estrogen Screen</i>

Résumé : « *Exposition continue aux xéno-hormones à faibles doses chez le rat: Effets multi-générationnels de mélanges sur les préférences gustatives, le comportement maternel et le développement* »

Durant la dernière décennie, la problématique de santé liée aux perturbateurs endocriniens (PE) s'est étendue à la toxicité des mélanges. L'objectif de ce travail était de définir les conséquences d'une exposition **continue à des cocktails des PE**, à des **doses faibles et** définies comme «**non nocives** » par les autorités réglementaires. Des mélanges associant la génistéine, la vinclozoline, et le Bisphénol A, ont fait l'objet d'une étude intégrative et **multi-générationnelle** chez le rat qui prend en compte le comportement maternel, le comportement alimentaire et le développement. Nos résultats montrent que ces mélanges peuvent: **a)** diminuer le comportement maternel, **b)** modifier les préférences gustatives (sucré, salé), **c)** affecter le développement dès la période utérine (malformations) jusqu'à l'âge adulte (surpoids), **d)** perturber le bilan métabolique (femelles) **et** l'expression par la glande salivaire de gènes codant des protéines impliquées dans la gustation, et engendrer des effets épigénétiques sur la génération F2 non exposée.

L'étude *in vitro* confirme que la Génistéine et/ou la Vinclozoline, introduites durant l'induction de la différenciation adipocytaire, affectent le développement des 3T3-L1 et leur activité endocrine (leptine; triglycérides), et révèle que la Vinclozoline module l'effet anti-adipogénique de la Génistéine en fonction de sa concentration.

En conclusion, ce travail montre qu'une exposition à des mélanges de PE peut altérer le comportement et le développement, et prédisposer l'organisme à développer des maladies métaboliques telles que le diabète et l'obésité, mais que les propriétés hormonales de chaque composant ne sont pas prédictives des effets cocktails.

Mots clés : Xéno-hormones, dimorphisme sexuel, tissu adipeux, glande submandibulaire, protéines salivaires, gustine, tolérance au glucose, cholestérol, acétylation des histones.

Abstract: « *Lifelong exposure to low dose xeno-hormones in rats: Multi-generational Effects of xeno-hormone mixtures on taste preferences, maternal behavior, and development* »

During the last decade, the issue of health-related endocrine disruptors (ED) has been extended to the toxicity of mixtures. The objective of this study was to define the effects of lifelong exposure to ED mixtures, at low doses defined as "non-harmful" by the authorities. In this aim, the effects of mixtures combining genistein, vinclozolin and bisphenol A, have been investigated in the rat by using an integrative and multi-generational experimental approach which takes into account maternal behavior, feeding behavior and development. Our results show that these mixtures could: a) reduce maternal behavior, b) change taste preferences (sweet, salty), c) affect the development from the *in utero* period (birth defects) up to adulthood (body overweight) d) disrupt the metabolic balance (females) and the salivary gland expression of genes encoding proteins involved in gustation, and e) generate epigenetic effects on the unexposed F2 generation.

An *in vitro* study confirms that Genistein and / or Vinclozolin, introduced at the step of the induction of adipocyte differentiation affect the development and endocrine activity (leptin, triglycerides) of 3T3-L1 cells and reveals that Vinclozolin modulates the anti-adipogenic effect of Genistein.

To conclude, this study shows that exposure to PE mixtures could affect behavior and development, and could predispose the body to develop metabolic diseases such as diabetes and obesity, but the own hormonal properties of component could not be used to predict the cocktails toxicity.

Keywords: Xeno-hormones, sexual dimorphism, adipose tissue, submandibular gland, salivary proteins, gustine, glucose tolerance, cholesterol, histone acetylation.

Sommaire

CONTEXTE SCIENTIFIQUE ET PROBLEMATIQUE	1
CHAPITRE 1 : SYSTEME ENDOCRINIEN ET HORMONES SEXUELLES	2
1. Notion de système endocrinien	2
2. Classification des hormones	3
3. Les hormones sexuelles stéroïdiennes	4
3.1. Biosynthèse des stéroïdes sexuels	4
3.2. Mécanismes d’actions	6
3.2.1. Mode d’action génomique	6
3.2.2. Mode d’action non génomique	7
3.3. Les récepteurs stéroïdiens nucléaires	7
3.3.1. Les récepteurs des œstrogènes	8
3.3.2. Les récepteurs de la progestérone	10
3.3.3. Les récepteurs des androgènes	10
3.4. Les récepteurs stéroïdiens membranaires	11
3.5. Rôle des hormones sexuelles stéroïdiennes	12
CHAPITRE 2: LE COMPORTEMENT MATERNEL	14
1. Attitudes du comportement maternel	14
2. Interaction Mère – Nouveau-nés	16
2.1. Les vocalisations ultrasoniques	16
2.2. Odorat	16
3. Régulation hormonale du comportement maternel	16
3.1. Effets des œstrogènes et de la progestérone	17
3.2. Effets de l’ocytocine	18
3.3. Effets de la prolactine	19
3.4. Effets des glucocorticoïdes	19
3.5. Effets des opioïdes	19
CHAPITRE 3 : LE COMPORTEMENT ALIMENTAIRE	21
1. La prise alimentaire et sa régulation hormonale	21
1.1. Définition	21
1.2. Rôle de la leptine et de l’insuline	24
1.2.1. Rôle de la leptine	24
1.2.2. Rôle de l’insuline	25
1.2.3. Rôle des hormones sexuelles stéroïdiennes	26

2. Préférences gustatives et régulation hormonale	29
2.1. Les différentes saveurs du goût	29
2.2. Perceptions gustatives et transmission du signal	29
2.3. Rôle des préférences gustatives	30
2.3.1. Préférence au sucré.....	30
2.3.2. Préférence au salé.....	31
2.3.3. Préférence au gras.....	32
2.4. Régulation hormonale des préférences gustatives	32
2.5. Tissus périphériques associés au comportement alimentaire	32
2.5.1. Le tissu adipeux.....	33
2.5.2. Les glandes salivaires.....	37
CHAPITRE 4: LES XENO-HORMONES	48
1. Qu'est-ce qu'un perturbateur endocrinien ?	48
2. Effets des perturbateurs endocriniens	49
2.1. Diethylstilbestrol : un perturbateur endocrinien modèle.....	49
3. Mode d'action des perturbateurs endocriniens	51
4. Perturbateurs endocriniens et toxicologie	53
4.1. Notions de faibles doses.....	53
4.2. Impact de la fenêtre d'exposition.....	54
4.3. Effets trans-générationnels.....	55
4.4. Effets de mélanges.....	56
5. Molécules retenues pour l'étude	57
5.1. Le bisphénol A	58
5.1.1. Nature chimique et source d'exposition.....	58
5.1.2. Effets endocriniens du bisphénol A.....	59
5.2. La génistéine	61
5.2.1. Nature chimique et sources d'exposition.....	61
5.2.2. Effets endocriniens de la génistéine.....	63
5.3. La Vinclozoline	65
5.3.1. Structure chimique et source d'exposition.....	65
5.3.2. Effets endocriniens de la Vinclozoline.....	66
OBJECTIF DE L'ETUDE	69
MATERIELS ET METHODES	71
1. Matériel biologique et réactifs chimiques	73
1.1. Molécules étudiées	73
1.2. Animaux, produits et matériels spécifiques à l'expérimentation animale	73
1.2.1. Animaux et hébergement.....	73
1.2.2. Matériel de mesures.....	74

1.2.3.	Réactifs	75
2.	<i>Expérimentations animales</i>	76
2.1.	Conditions d'élevage et de traitements	77
2.1.1.	Exposition chronique à différentes doses de bisphénol A chez le rat mâle.....	77
2.1.2.	Exposition continue au BPA ou à des mélanges de PE à faibles doses chez le rat	77
2.2.	Etudes de développement	80
2.2.1.	Gestation et développement prénatal	80
2.2.2.	Naissances et caractérisation de la portée	81
2.2.3.	Croissance et prise alimentaire	81
2.2.4.	Distance ano-génitale.....	81
2.2.5.	Apparition de la puberté.....	83
2.2.6.	Durée des cycles œstrals	85
2.3.	Etudes de comportement	87
2.3.1.	Tests de préférences gustatives	87
2.3.2.	Comportement maternel.....	88
2.4.	Sacrifice et prélèvements	89
2.4.1.	Recueil de données avant le sacrifice	89
2.4.2.	Modalités des sacrifices et prélèvements sanguins	91
2.4.3.	Prélèvements d'organes et conditions de stockages.....	91
3.	<i>Analyse histologique, biochimique et moléculaire des organes</i>	92
3.1.	Etude du tissu adipeux	92
3.1.1.	Analyse histologique (coloration à l'Hemalun/Eosine)	92
3.1.2.	DNA acétylation dans le tissu adipeux (western-blot).....	93
3.2.	Etudes des glandes salivaires submandibulaires	95
3.2.1.	Analyse histologiques	95
3.2.2.	Analyse moléculaire par RT-PCR des glandes submandibulaires	96
4.	<i>Dosage biochimiques</i>	102
4.1.	Dosage de leptine	102
4.2.	Dosage de l'EGF (Epidermal Growth Factor)	102
4.3.	Dosage des marqueurs métaboliques	102
5.	<i>Modulation de l'adipogenèse sur modèles cellulaires in vitro</i>	103
5.1.	Culture cellulaire	103
5.1.1.	Amplification et maintenance de la culture	103
5.1.2.	Ensemencement et induction de la différenciation et traitements.....	103
5.1.3.	Traitements	104
5.2.	Dosages biochimiques	105
5.2.1.	Mesure de la toxicité par le test de rouge neutre.....	105
5.2.2.	Dosage de la quantité d'ADN par le test du DABA	105
5.2.3.	Dosage des lipides par coloration des lipides à l'Huile Rouge [Oil-red O (ORO)]	106
5.2.4.	Dosage des triglycérides intracellulaires.....	106
5.2.5.	Dosage de la leptine	106
6.	<i>Analyses statistiques des données</i>	107
	RESULTATS	111

CHAPITRE 1: CARACTERISATION DES EFFETS DU BPA LORS D'EXPOSITIONS CHRONIQUES A FAIBLES DOSES	113
1. Modulation du comportement maternel.....	114
1.1. Effet d'une exposition pendant la période de gestation et de lactation (F0)	115
1.2. Effet d'une exposition chronique depuis la conception jusqu'à la date d'accouplement (F1)	116
1.3. Conclusion.....	117
2. Modulation des préférences gustatives.....	117
2.1. Effet d'une exposition chronique à l'âge adulte sur les préférences gustatives chez le rat mâle.....	118
2.2. Effet d'une exposition précoce (gestation/lactation) sur les préférences gustatives chez le rat immature au sevrage (J21-J25)	121
2.3. Effet d'une exposition continue de la conception à l'âge adulte sur les préférences gustatives du rat adulte (J100)	123
2.4. Effet multi-générationnel d'une exposition continue à faible dose (conception-âge adulte) sur le dimorphisme sexuel des préférences gustatives de la progéniture non exposée (F2 J25/J100).....	125
2.5. Conclusion.....	128
3. Modulation du développement.....	130
3.1. Effet d'une exposition continue sur la génération exposée (F1).....	130
3.1.1. Croissance et développement prénatal	130
3.1.2. Développement post natal et malformations.....	132
3.2. Répercussion d'une exposition continue de la F1 sur le développement de sa progéniture non exposée (F2)	133
3.2.1. Croissance et développement pré-pubère.....	133
3.2.2. Malformations.....	136
4. Conclusion générale et discussion : effets faibles doses du BPA et période d'exposition	137
 CHAPITRE 2 : CARACTERISATION DES EFFETS DE L'EXPOSITION CONTINUE A DES MELANGES DE PE A FAIBLES DOSES (F0 ET F1)	142
1. Modulation du comportement maternel.....	143
1.1. Effet faible dose d'une exposition pendant la période de gestation et de lactation (F0)	143
1.2. Effet faible dose d'une exposition chronique précédent la période de gestation-lactation (depuis la conception jusqu'à l'accouplement à l'âge adulte)	148
2. Modulation des préférences gustatives.....	154
2.1. Effet faible dose d'une exposition précoce (gestation/lactation) sur le dimorphisme sexuel des préférences gustatives	154
2.1.1. Chez le rat immature (J25).....	154

2.1.2.	Chez le rat adulte (J100)	156
2.2.	Effet multi-générationnel d'une exposition continue à faible dose sur le dimorphisme sexuel des préférences gustatives de la descendance non exposée (F2)	160
2.2.1.	Chez le rat immature (J25).....	160
2.2.2.	Chez le rat adulte (J100)	162
2.3.	Conclusion.....	165
3.	Altération du développement	165
3.1.	Effets directs sur la génération exposée (F1)	166
3.1.1.	Croissance et développement.....	166
3.1.2.	Développement post-natal et malformations	169
3.1.3.	Perturbations métaboliques (dosages sériques).....	172
3.2.	Répercussions sur la progéniture non exposée (F2)	175
3.2.1.	Croissance et développement.....	175
3.2.2.	Développement post-natal et malformations	178
3.2.3.	Perturbations métaboliques (dosages sériques).....	180
4.	Conclusion générale et discussion	182
	CHAPITRE 3: PERTURBATEURS ENDOCRINIENS ET MODULATION DE L'ADIPOGENESE	190
1.	Caractérisation d'un effet cocktail de genistéine-vinclozoline sur la différenciation de cellules pré-adipocytaires 3T3-L1.....	191
1.1.	Détermination des conditions expérimentales	192
1.1.1.	Toxicité des xéno-hormones (Test du rouge neutre).....	192
1.1.2.	Effets des xéno-hormones sur la croissance des cellules 3T3-L1 (Test du DABA)	193
1.1.3.	Effets des xéno-hormones sur la différenciation adipocytaire	195
2.	Effets multi-générationnels du BPA, seul ou combiné au mélange génistéine-vinclozoline, sur l'adipogénèse (F1 ; F2).....	199
2.1.	Effet sur la masse adipeuse des animaux exposés depuis la conception	199
2.2.	Effet sur la masse adipeuse de la descendance non exposée	200
2.3.	Analyse morphométrique du tissu adipeux en F2	202
2.4.	Recherches de marqueurs d'effets épigénétiques en F2.....	205
3.	Conclusion et discussion.....	208
	CHAPITRE 4 : PERTURBATION ENDOCRINIENNE ET GLANDES SALIVAIRES : IDENTIFICATION D'EFFETS MULTI-GENERATIONNELS D'UNE EXPOSITION CONTINUE DE COCKTAILS DE PE SUR LES SUBMANDIBULAIRES DE RAT	212
1.	Modulation des taux sériques du facteur de croissance EGF chez les mâles et les femelles (F1 et F2)	213
1.1.	Génération exposée depuis la conception (F1) :.....	213
1.2.	Génération non exposée (F2)	214
2.	Modulation de l'expression des mRNA de gènes marqueurs des sécrétions salivaires et/ou hormono régulés chez le mâle exposé (F1).....	215

2.1.	Expression des mRNA du facteur EGF	215
2.1.1.	Chez les rats immatures (J25)	215
2.1.2.	Chez les rats adultes (J100).....	216
2.2.	Expression des mRNA des récepteurs hormonaux	217
2.3.	Expression mRNA des protéines gustatives	218
2.3.1.	Chez les rat immatures (J25).....	218
2.3.2.	Chez les rats adultes (J100).....	220
3.	<i>Morphométrie des organes sécréteurs salivaire chez le mâle F1 adulte.....</i>	221
4.	<i>Modulation de l'expression des mRNA de gènes marqueurs des sécrétions salivaires et/ou hormono régulés chez le mâle adulte non exposé (F2)</i>	224
4.1.	Expressions des mRNA du facteur EGF et des récepteurs hormonaux.....	224
4.2.	Expression des mRNA des protéines gustatives	225
5.	<i>Conclusion générale et discussion</i>	227
	DISCUSSION GENERALE.....	231
	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	237
	ANNEXES	239
	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	245

Avant-propos

Au cours des trente dernières années, on a enregistré une augmentation considérable de l'incidence de cancers hormono-dépendants tels que celui du sein, de la prostate, mais également d'autres pathologies telles que l'apparition des malformations au niveau des organes génitaux (ex : hypospadias). Les troubles métaboliques tels que l'obésité et les troubles du comportement type anorexie, boulimie, anxiété ont également augmentés suffisamment pour que ça deviennent un véritable enjeu de santé publique. Mais comment peut-on imaginer une augmentation de toutes ces pathologies malgré tous les progrès scientifiques que l'Homme a réalisés ?

Une des premières réponses par rapport à ce sujet a été apportée il y a déjà plus de cinquante ans par Roy Hertz qui, en 1958, estimait « qu'il fallait prendre en considération le fait que l'utilisation d'hormones dans l'alimentation animale risquait d'exposer certains individus à ces hormones, alors qu'ils n'auraient jamais dû être en contact de leur vie avec de telles molécules. [...], que nous étions en train de créer un cycle des stéroïdes dans notre environnement, et que nous devons sérieusement prendre en considérations les implications que cela pouvait entraîner pour notre développement, notre croissance et peut-être pour nos fonctions de reproduction ».

Quatre ans après, Rachel Carson écrit son livre "Silent Spring", qui provoque une prise de conscience du public des problèmes liés aux risques toxiques des polluants chimiques toxiques dans l'environnement.

De là est née l'hypothèse que des xénobiotiques relargués dans l'environnement, retrouvés dans l'alimentation, et capables de mimer ou d'interférer avec l'action des hormones endogènes, seraient responsables de ces troubles du développement, de la reproduction et du comportement observés dans les pays industrialisés et les zones polluées. Hypothèse amenée par Theo COLBORN qui donnera le nom de perturbateur endocrinien à ces molécules en 1991.

Cependant, on a attendu jusqu'en 2003, date de création du premier groupe de travail européen dénommé Credo (Cluster of Research into Endocrin Disruption in Europe) pour voir se réunir 60 laboratoires européens dans le but de fédérer des recherches sur les perturbateurs du système endocrinien. Ce groupe organise en 2005, un séminaire à Prague, et il réunit plus de 200 spécialistes en matière de perturbation endocrinienne.

Ces experts (Bernard Jégou, Ana Soto, Bruce Blumberg, Jean-Pierre Bourguignon, Pierre Jouannet ...) rédigent un document destiné à informer les citoyens, les décideurs politiques et font des suggestions constructives qui pourraient conduire à une meilleure protection de la santé humaine et de la faune sauvage en Europe et dans le monde.

Dans la même période, il s'est avéré que les perturbateurs endocriniens n'affectent pas seulement le système de reproduction et le système nerveux (effets reprotoxiques et neurotoxiques), mais ils peuvent également affecter le contrôle de l'homéostasie énergétique. En 2002, Paula Baillie-Hamilton publie une étude rétrospective dans laquelle elle montre une corrélation entre l'exposition à des faibles doses de molécules chimiques et le gain du poids. Dans le même sens Bruce Blumberg en 2006, emploie pour la première fois le mot de « Obésogène » pour désigner les molécules chimiques qui ont la capacité de prédisposer les souris à devenir obèses.

Il est maintenant évident que les perturbateurs endocriniens ont des effets: -repro, -neuro, -métabo (toxiques), auxquels se rajoutent d'autres notions telles que: les mélanges (effets cocktails suite à des expositions à plusieurs substances chimiques), les faibles doses (doses équivalentes aux taux d'exposition humaine), la fenêtre et la durée d'exposition (in utero, postnatale ou tout au long de la vie..), le mode d'exposition (cutanée, orale, inhalation...), les effets transgénérationnels (effets néfastes qui s'étendent à plusieurs générations après une seule exposition gestationnelle) et les mécanismes épigénétiques (modifications de l'expression des gènes qui sont transmissibles mais sont réversibles et ne découlent pas de modifications dans la séquence de l'ADN). Tout ceci rend le sujet encore plus complexe et implique de ne plus considérer les effets biologiques de manière indépendante, mais selon une approche intégrative d'effet d'exposition à des cocktails mimant les conditions environnementales.

Cette thèse a pour objectif d'identifier les effets d'une exposition continue à des mélanges de perturbateurs endocriniens, à des faibles doses proches de celles de l'environnement, et définir si l'on peut prédire leurs effets sur la base des effets propres à chaque composant du mélange. L'étude porte sur des cibles du développement et du comportement sensibles aux faibles doses et impliquées dans les perturbations métaboliques et sensorielles. Mais avant d'aborder ces études il est nécessaire de rappeler la physiologie du système endocrinien, la régulation hormonale, ainsi que les tissus périphériques associés au comportement maternel et alimentaire comme le tissu adipeux et les glandes salivaires.

**CONTEXTE
SCIENTIFIQUE
ET
PROBLEMATIQUE**

CHAPITRE 1 : SYSTEME ENDOCRINIEN ET HORMONES SEXUELLES

1. Notion de système endocrinien

Le système endocrinien est l'ensemble de glandes qui assurent la transmission de l'information entre tissus afin de permettre l'adaptation de l'organisme aux situations qui lui sont imposées. Chez l'homme parmi les glandes endocrines principales, on peut trouver le pancréas (synthèse d'insuline et du glucagon), les gonades (œstrogènes et androgènes), les surrénales (glucocorticoïdes) (Figure 1). Se rajoutent à ces glandes d'autres tissus souvent non pris en compte dans la notion de système endocrinien, tels que le tissu adipeux blanc (leptine, adiponectine) (Gaillard 2003), le tube digestif (sérotonine, CCK,), mais aussi les glandes salivaires (facteurs de croissance).

La transmission de l'information est assurée par des molécules informatives dites : «hormones». Par définition, ce sont des molécules élaborées au niveau d'une structure endocrine (ovaires, testicules, pancréas...) et libérées dans le milieu intérieur, pour aborder à distance la cellule cible. Celle-ci réagit par une réponse physiologique appropriée, les hormones pouvant avoir un effet stimulateur ou inhibiteur. Un rétrocontrôle hormonal peut s'exercer à partir de la cellule cible sur l'organe endocrine source (Figure 1.B).

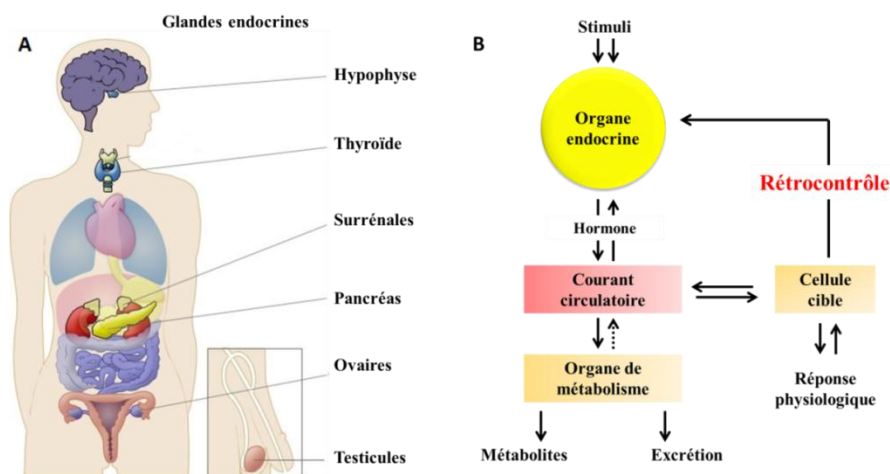


Figure 1 : Système endocrinien. **A**, principales glandes endocrines du corps humain; **B**, Schéma de l'activité endocrine : suite à des stimuli l'organe endocrine élabore un message chimique (Hormone) qui sera libéré dans le courant circulatoire pour agir à distance sur la cellule cible. Cela provoque une réponse physiologique appropriée. Dans d'autres organes l'hormone peut être dégradée en métabolites et/ou excrétée.

2. Classification des hormones

Les hormones sont couramment classées selon leurs effets sur les fonctions biologiques : hormones de la reproduction, hormones de croissance, hormones du tractus digestifs, hormones du vieillissement, hormones du comportement ou encore hormones du stress.

Selon leurs natures chimiques, les hormones peuvent être classées en 4 catégories:

- les hormones de nature protéique (insuline, glucagon),
- les hormones stéroïdiennes : (glucocorticoïdes, minéralo-corticoïdes et les stéroïdes sexuels que sont les œstrogènes et les androgènes),
- les hormones dérivées des acides aminés : catécholamines, hormones thyroïdiennes (Figure 2).

Enfin on peut trouver également des hormones dérivées des acides gras (Eicosanoïdes) telles que les prostaglandines.

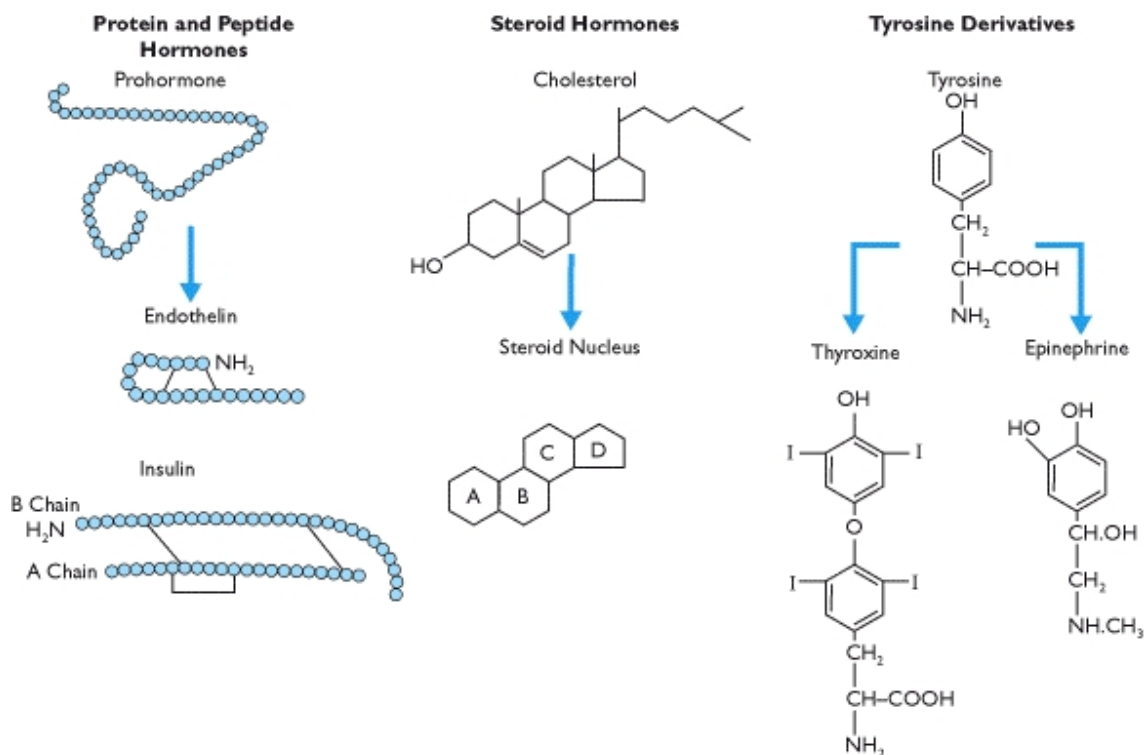


Figure 2: Classification des principales hormones selon leurs natures chimiques [(Nussey & Whitehead 2001) avec modifications]

Cette classification fait donc apparaître deux types de médiateurs, des médiateurs de structure chimique simple, comme les stéroïdes, et qui sont communs à toutes les espèces, et des médiateurs plus complexes, comme les dérivés peptidiques et qui sont propres à chaque espèce.

Parmi ces hormones, une attention particulière est portée sur les données propres aux hormones stéroïdiennes impliquées dans le développement et la fonction de reproduction : les androgènes, les œstrogènes et la progestérone, d'une part, pour leurs implications dans le développement et le contrôle des principales fonctions (reproduction, comportement, prolifération cellulaire...), mais également parce qu'elles orchestrent, avec l'axe hypothalamo-hypophysaire, la libération et l'action d'autres hormones, dont celles impliquées dans le comportement maternel et alimentaire, et qui seront traitées plus en détails dans les parties suivantes de cette présentation bibliographique. En plus, les hormones sexuelles, du fait de leur nature chimique simple, font l'objet de similitudes structurales ou fonctionnelles avec certains perturbateurs endocriniens.

3. Les hormones sexuelles stéroïdiennes

Les hormones sexuelles stéroïdiennes jouent un rôle important dans la régulation des différents processus physiologiques tels que le développement, la croissance et la différenciation cellulaire et ceci dès la conception. Elles contrôlent la fonction de reproduction, le développement du système nerveux central et périphérique ([Nussey & Whitehead 2001](#)), mais aussi le bon fonctionnement et l'homéostasie de nombreux organes, incluant le squelette, le système cardiovasculaire et le système digestif. Dans ce mémoire, nous traiterons surtout des hormones stéroïdiennes sexuelles : œstrogènes, progestérone et androgènes.

3.1. Biosynthèse des stéroïdes sexuels

Les œstrogènes et les androgènes ont comme précurseur le cholestérol (Figure 3). Ces hormones sont produites principalement au niveau des gonades (ovaires, testicules), mais d'autres organes sont capables d'en produire de façon complète ou par conversion des précurseurs circulants, grâce à leur équipement enzymatique tels que l'aromatase, qui transforme les androgènes en œstrogènes dans de nombreux tissus dont la corticosurrénale, l'unité fœto-placentaire, le cerveau, le tissu adipeux, le foie, et d'autres cellules comme les fibroblastes de la peau, les chondrocytes, les ostéoblastes, ou même les cellules endothéliales et musculaires lisses ([Belanger et al 2002](#)).

La biosynthèse des œstrogènes et des androgènes est contrôlée par l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique, les neuro-hormones au niveau hypothalamique GnRH (Gonadotrophin Releasing Hormone) ou LHRH (luteinizing releasing hormone) stimulent la sécrétion de FSH (Follicle-Stimulating Hormone), LH (luteinizing hormone) au niveau de l'anté-hypophyse ([Nussey & Whitehead 2001](#)). Une fois que ces hormones hypophysaires sont dans le courant circulatoire, elles vont cibler les gonades afin de stimuler la synthèse des œstrogènes ou des androgènes ainsi que la maturation des ovules ou des spermatozoïdes. Il existe également un rétrocontrôle exercé par les hormones sexuelles sur la sécrétion de GnRH, de FSH et de LH (Figure 4). D'autres hormones protéiques gonadiques (l'inhibine ou l'activine) ont également un effet de rétrocontrôle sur l'antéhypophyse ([Nussey & Whitehead 2001](#)).

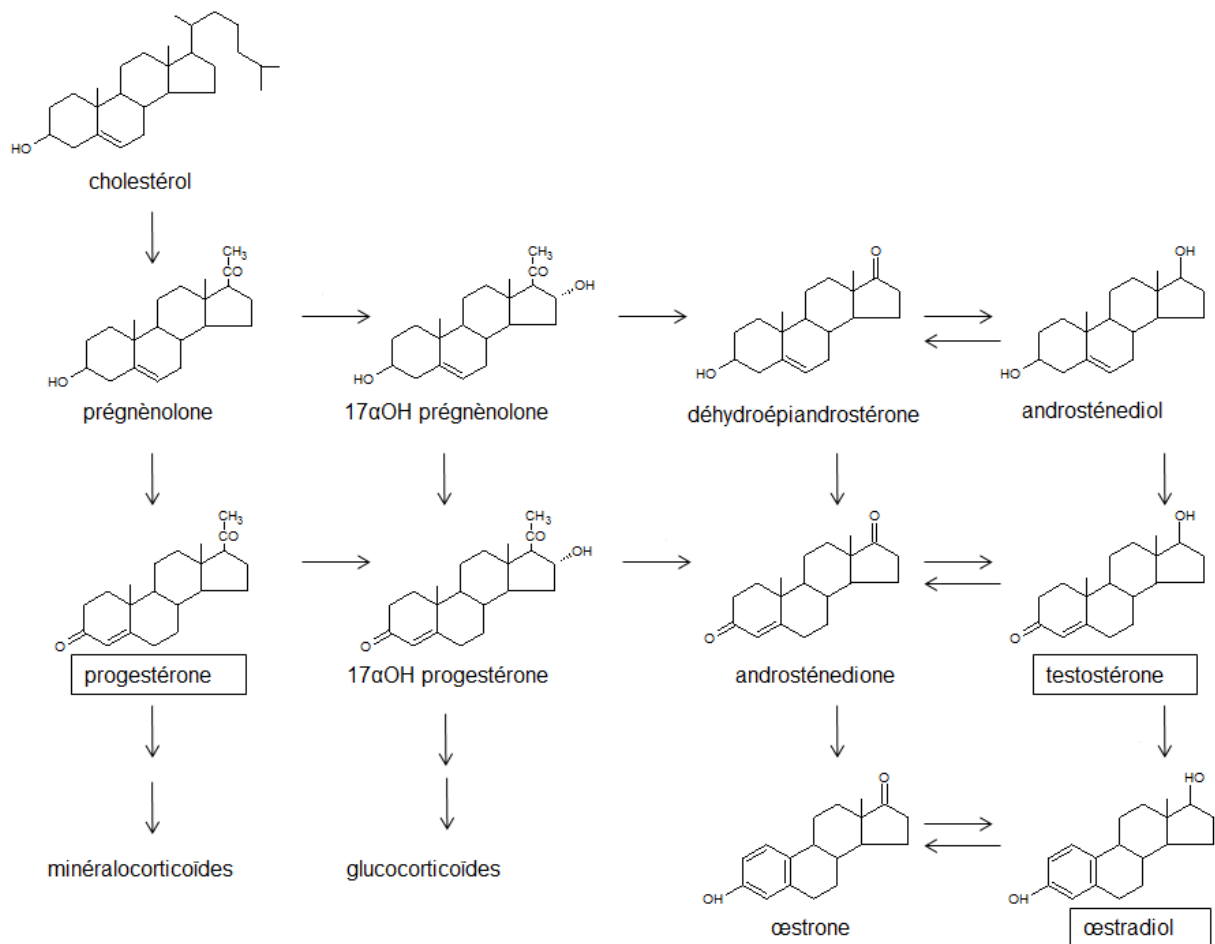


Figure 3: Différentes voies de biosynthèse des hormones stéroïdiennes [d'après ([Doré 1994](#))]

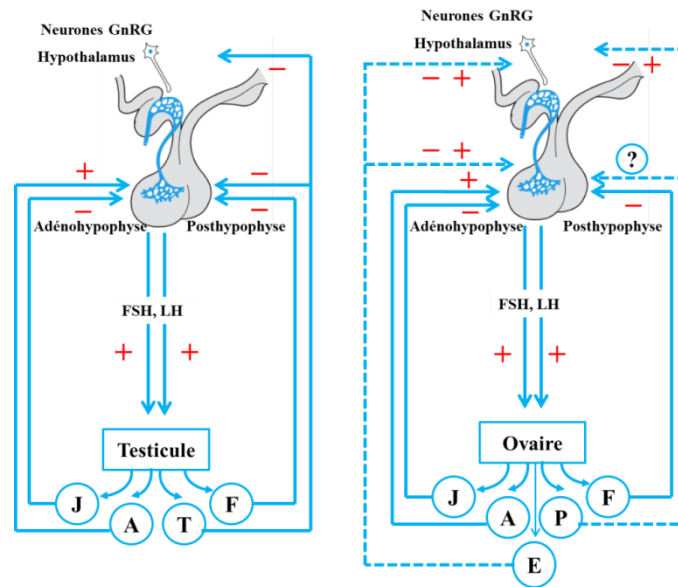


Figure 4: Régulation de l'axe gonadotrope chez l'homme (à gauche) et femme (à droite): A : activine, F : follistatine, J : inhibine, E : œstrogènes, P : progéstérone, T : testostérone ([Nussey & Whitehead 2001](#)).

3.2. Mécanismes d'actions

Les effets physiologiques des œstrogènes et des androgènes résultent de différents modes d'actions de ces hormones au niveau cellulaire. On distingue un mode d'action génomique, qui repose sur la liaison à des récepteurs nucléaires pour activer une transcription des gènes, et un mode d'action non génomique, qui repose sur la liaison à des protéines membranaires qui activent des voies de signalisations cellulaires.

3.2.1. Mode d'action génomique

Dans le cytoplasme les récepteurs stéroïdiens se trouvent sous forme de complexe inactif [monomères liés à des protéines HSP90 (Heat Shock Protein)] ([Pratt et al 2004](#)). Comme les stéroïdes sont des molécules lipophiles, elles pénètrent à travers la membrane cytoplasmique par diffusion passive ou facilitée ([Tetel 2009](#)), et la liaison de l'hormone à son récepteur est suivie par dissociation de l'HSP90. Ceci rend possible la formation de dimères, puis la translocation du complexe dans le noyau de la cellule. Ensuite il y a une dimérisation du récepteur et la fixation du complexe sur la région HRE (Hormone Response Element) de l'ADN qui va induire ou non la transcription du gène cible. Le recrutement des co-régulateurs et de facteurs de transcription sur les régions promotrices initiant l'activation de l'ARN polymérase II et la synthèse de nouveaux ARNm module la transcription des gènes.

Selon le type cellulaire et en fonction des promoteurs impliqués, le récepteur stéroïdien peut exercer une activité stimulatrice ou inhibitrice vis-à-vis de l'expression des gènes cibles (Figure 5) ([Tetel 2009](#)).

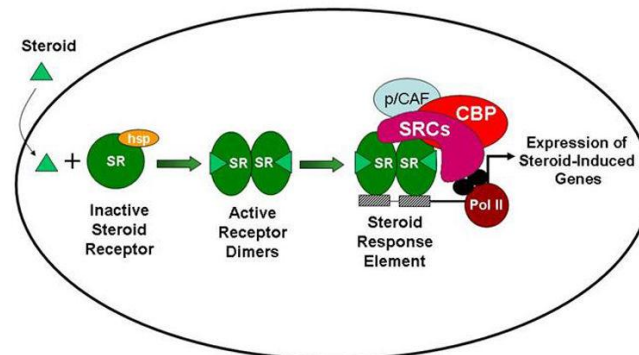


Figure 5 : Mécanisme génomique de l'action des récepteurs aux stéroïdes : SR, steroid receptor; hsp, heat shock proteins; SRE, steroid response element; SRCs, steroid receptor coactivator family (p160s); CBP, CREB-binding protein; p/CAF, p300/CBP associated factor; Pol II, RNA polymerase II ([Tetel 2009](#)).

3.2.2. Mode d'action non génomique

Par définition, les effets non génomiques se produisent sans modifier l'expression génique, et surviennent donc plus rapidement que les effets génomiques. Des effets non génomiques ont été observés pour de nombreux stéroïdes, incluant les hormones sexuelles. Ils reposent sur la présence de récepteurs localisés sur la membrane plasmique et incluent l'implication de messagers secondaires caractéristiques de voies de signalisations cellulaires ([Baldi et al 2009](#)). Les mécanismes moléculaires de ces effets non génomiques directs sont de type biochimique, telle la phosphorylation de facteurs de croissance ou l'inhibition de tyrosine kinase. L'interaction compétitive ou non compétitive avec les sites catalytiques de divers complexes enzymatiques permet aux stéroïdes d'exercer des effets cellulaires sur un grand nombre d'enzymes (notamment des enzymes du métabolisme) et d'acteurs cellulaires, notamment sur des facteurs de croissance ([Dalu et al 1998](#)) ([Watson et al 2007](#)).

3.3. Les récepteurs stéroïdiens nucléaires

Les récepteurs nucléaires des stéroïdes comprennent 5 régions notées A/B, C, D, E, F :

- Une région variable N-terminale (A/B), impliquée dans l'activation de la transcription

- Une région C correspond au domaine de liaison à l'ADN, qui contient une séquence spécifique permettant la liaison à des séquences spécifiques d'ADN (*Hormone Response Element*).
- Une région D, région charnière, qui semble posséder un signal de localisation nucléaire.
- Une région E qui contient une région de fixation au ligand.
- Une région variable C-terminale (F).

Chaque type de stéroïde possède un ou plusieurs récepteurs spécifiques.

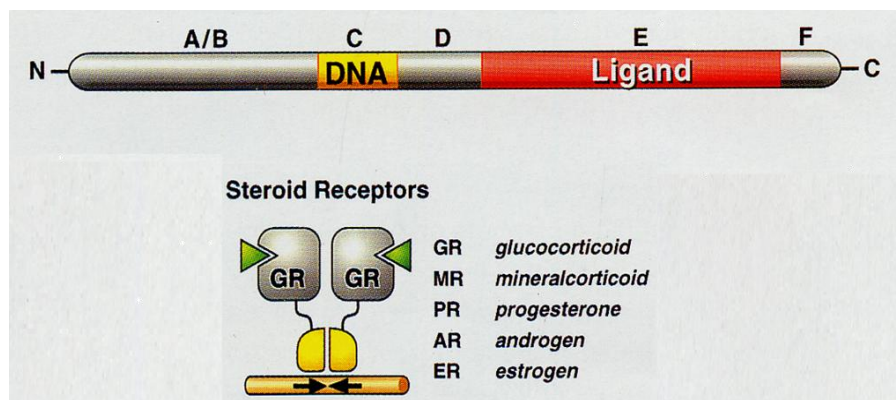


Figure 6 : Structure générale des récepteurs nucléaires ([Mangelsdorf et al 1995](#))

3.3.1. Les récepteurs des œstrogènes

Il existe principalement deux types de récepteurs des œstrogènes : ER α ([Greene et al 1986](#)) et ER β ([Kuiper et al 1997](#)) codés par des gènes différents situés respectivement sur les chromosomes 6 et 14 chez l'Homme ([Dahlman-Wright et al 2006](#)). Leurs séquences comptabilisent 595 et 530 acides aminés respectivement pour ER α et ER β et présentent un grand degré d'homologie (97%) au niveau du domaine C, suggérant une interaction potentielle avec les mêmes séquences-cibles de l'ADN. En revanche, leurs domaines A/B et E étant très différents avec seulement 24 et 56% d'homologie, l'activité transcriptionnelle des gènes cibles pourra varier selon le type de récepteur et de ligand.

Les récepteurs ER α et ER β sont exprimés dans une très grande variété de tissus tels que les organes sexuels (utérus, vagin, ovaire, sein, testicule, prostate), le système cardiovasculaire, l'os,

le cerveau, et le système nerveux,... etc., mais à des niveaux relatifs différents. Par exemple, on retrouve une expression prédominante de ER α dans le foie, le tissu adipeux, les organes génitaux, la glande mammaire, et de ER β dans la vessie, la prostate, les poumons, l'os, l'intestin, les glandes salivaires ([Dahlman-Wright et al 2006](#)) ([Enmark & Gustafsson 1999](#)). De plus, la distribution cellulaire de ces récepteurs peut être différente à l'intérieur d'un même organe : ainsi, dans l'ovaire, ER α est fortement exprimé dans les cellules thécales tandis que ER β l'est plus dans la granulosa ; au niveau de la prostate, ER α est retrouvé dans le stroma et ER β dans l'épithélium ([Mowa & Iwanaga 2000](#)).

Compte-tenu de l'activité transcriptionnelle distincte des deux types de récepteurs, leur expression différentielle pourrait jouer un rôle déterminant dans la sensibilité et la réponse des organes cibles, d'autant plus que ER β semble capable de moduler l'activité de ER α ([Weihua et al 2002](#)) via de probables mécanismes d'hétérodimérisation ([Moggs & Orphanides 2001](#)) ([Hall & McDonnell 1999](#)).

Les récepteurs des œstrogènes activés reconnaissent la même séquence HRE palindromique dénommée Estrogen Response Element (ERE) 5'-GGTCANNNTGACC-3'. L'activité transcriptionnelle dépend entre autres du type de ligand fixé. Même si ER α et ER β possèdent des affinités équivalentes pour l'œstradiol, les différents œstrogènes et certains composés exogènes seront préférentiellement reconnus par l'un ou l'autre des récepteurs. Par exemple, les phyto-œstrogènes comme la génistéine possèdent une affinité plus élevée pour ER β alors que l'œstrone se fixe plutôt sur ER α ([Dahlman-Wright et al 2006](#)). Les changements de conformation du complexe récepteur-ligand pour une molécule donnée déterminent la liaison à d'autres facteurs de transcription et le recrutement de co-régulateurs qui vont soit favoriser cette transcription soit au contraire l'inhiber ([Smith & O'Malley 2004](#)) ([Martini & Katzenellenbogen 2003](#)) ([Delage-Mourroux & Jouvenot 2001](#)). L'expression de ces co-facteurs peut elle-même être régulée par les ER et conduire à une amplification de leur action. La présence de ces co-activateurs et co-inhibiteurs n'est pas la même dans tous les tissus : ainsi, l'absence du cofacteur SRC 1 (Steroid Receptor Coactivator 1) au niveau de l'épithélium mammaire peut expliquer pourquoi le tamoxifène, un anti-œstrogène synthétique, est antagoniste dans le sein mais agoniste dans l'utérus et l'os ([Shang & Brown 2002](#)).

Finalement, le récepteur peut subir lui-même des modifications post-traductionnelles (phosphorylation, ubiquitination, acétylation, sumoylation) déterminées par le type de ligand

associé ([Faus & Haendler 2006](#)). Compte-tenu de la complexité des mécanismes en jeu, il est difficile de prévoir exactement le type de réponse engendré par la fixation d'un composé sur les ER. On parle donc de Selective Estrogen Receptor Modulator (SERM) pour qualifier ces ligands dont l'action varie en fonction du contexte moléculaire propre à chaque tissu ([Diel 2002](#)).

3.3.2. Les récepteurs de la progestérone

Chez l'Homme, on recense deux isoformes du récepteur de la progestérone, PR A et PR B, constitués respectivement de 769 et 933 acides aminés et issus d'un seul gène ([Li et al 2004](#)). La séquence N-terminale plus longue pour PR B contient un domaine supplémentaire de trans-régulation transcriptionnelle AF-3 lui conférant des propriétés de recrutement de co-régulateurs et de transcription propres.

Chez la souris, les PR sont exprimés de manière constitutive dans de nombreux organes tels que l'utérus, la vessie, le duodénum et le jéjunum, le rein, les glandes surrénales et la glande salivaire submandibulaire et leur expression peut être induite par les œstrogènes dans le vagin, l'urètre, la peau et les vaisseaux sanguins ([Uotinen et al 1999](#)). On les retrouve également dans les testicules et le cerveau. Les expériences d'inactivation (knock-out KO) et d'induction (knock-in) spécifiques du gène de PR A et de PR B chez la souris montrent que PR A est nécessaire au développement et au fonctionnement correct de l'utérus et des ovaires ainsi qu'à la régulation neuroendocrine normale des gonadotrophines, tandis que PR B intervient dans la croissance et la différenciation de la glande mammaire saine et tumorale ([Ismail et al 2003](#)) ([Li et al 2004](#)).

Comme pour les ER, l'activité transcriptionnelle des PR est complexe et contrôlée par des modifications post-traductionnelles de nombreux co-facteurs. Mais globalement, PR B est plus actif et serait plutôt activateur de l'expression des gènes cibles, alors que PR A aurait un rôle inhibiteur vis-à-vis de PR mais aussi d'autres récepteurs nucléaires ([Graham & Clarke 1997](#)). Par ailleurs, les œstrogènes induisent l'expression de PR dans de nombreux tissus comme le vagin et son augmentation représente un bon marqueur de stimulation œstrogénique. Cette induction est régulée par ER α ([Flototto et al 2004](#)).

3.3.3. Les récepteurs des androgènes

Le gène des récepteurs des androgènes humains est situé sur le chromosome X et code pour deux protéines, AR B de 918 acides aminés, et AR A de 730 acides aminés résultant d'une traduction alternative et plus courte du côté N-terminal ([Wilson & McPhaul 1996](#)). Les deux

isoformes sont fortement exprimées au niveau des organes génitaux mâles et femelles, fœtaux et adultes, AR B étant la forme prépondérante. L'expression des AR semble indispensable au développement de ces tissus ([Pelletier et al 2000](#)) ([Pelletier et al 2004](#)) ([Yeh et al 2003](#)). On retrouve également les AR dans de nombreux autres tissus fœtaux tels que la vessie, les poumons, le muscle, les reins, la peau, l'estomac, la thyroïde et l'intestin. Chez l'adulte leur expression est détectée dans le cerveau, la glande mammaire, les glandes salivaires, le colon, les poumons et les glandes surrénales. De plus, les AR jouent un rôle dans le maintien de la densité osseuse et la croissance du tissu adipeux chez la souris mâle, les souris ARKO (Androgen Receptor Knock-out) développant une ostéopénie et une obésité. Par ailleurs, l'inactivation des AR abolit tout comportement reproducteur chez la souris mâle et femelle et rend les mâles stériles ([Kato et al 2005](#)).

3.4. Les récepteurs stéroïdiens membranaires

Les hormones stéroïdiennes peuvent agir également indépendamment des récepteurs nucléaires en provoquant des effets dits « effets rapides », où on enregistre des effets maximum dans un temps très court (de l'ordre de quelques secondes à la minute) après la stimulation dans plusieurs types cellulaires. Par exemple l'œstradiol se fixe sur des récepteurs non-nucléaires ce qui entraîne une activation de plusieurs voies de signalisation cellulaire telles que des MAP kinases, des phosphatidylinositol 3-kinases (PI3K), de la phospholipase C (PLC), de la protéine kinase C (PKC), de l'oxyde d'azote synthase endothéliale (eNOS), ou encore de la voie de l'EGFR (Epidermal growth factor receptor) ([Furukawa & Kurokawa 2007](#)).

Dans la littérature plusieurs hypothèses ont essayé d'expliquer ces effets rapides (appelés aussi : non-génomiques, non-transcriptionnels) :

Pour certains, il s'agit peut-être d'une action via un récepteur membranaire qui a une structure similaire à celle des récepteurs nucléaires ($ER\alpha$, $ER\beta$) mais également une affinité presque similaire envers le 17β œstradiol [(Constante de dissociation : $K_d = 0,283$ et $0,287$ nM pour les récepteurs nucléaires et membranaires respectivement)] ([Razandi et al 1999](#)) ou bien d'un récepteur membranaire qui est une forme tronquée du $ER\alpha$ (66 kDa), avec un poids moléculaire de 46 kDa ([Li et al 2003](#)).

D'autres études montrent qu'il s'agit plutôt d'un récepteur membranaire différent des récepteurs nucléaires ([Toran-Allerand et al 2002](#)). Parmi ces récepteurs, on peut citer la GPR30,

qui est un récepteur couplé à une protéine G couplée à un récepteur [G-protein-coupled receptor (GPCR)], est une protéine qui possède des caractéristiques d'un récepteur stéroïdien membranaire à savoir : la capacité de provoquer un effet rapide. Il a également un K_d de 2,7 nM pour l'œstradiol. Dans des cellules cancéreuses humaines du sein SKBR3 qui expriment la GPR30 mais n'expriment pas les récepteurs nucléaires aux œstrogènes, l'œstradiol provoque des effets rapides telles que la régulation du flux de calcium, l'activation des canaux, potassiques, des phosphorylations ([Thomas et al 2005](#)).

D'autres études suggèrent que l'action non génomique des œstrogènes est due à une action via le ER α ou une variante. Cette hypothèse est réconfortée par l'utilisation des inhibiteurs qui bloquent l'action de l'œstradiol via les ER α comme (ICI182,780), ou par l'utilisation des siRNA (small interfering RNA) dirigé contre le ER α : et le blocage de cette voie provoque l'inhibition des actions non-génomiques ([Song et al 2004](#)).

Pour le récepteur de la progestérone (PR) deux récepteurs membranaires (mPR) d'un poids moléculaire d'environ 40 kDa ont été identifiés. Ce sont des protéines qui contiennent 7 domaines transmembranaires, et qui sont similaires au GPCR. Dans des cellules cancéreuses du sein MDA-MB-23, qui sur-expriment le Mpr, la progestérone inhibe la production de cAMP et induit l'activation du Erk1/2, deux voies de signalisation non-génomiques ([Zhu et al 2003](#)). L'action rapide de la progestérone peut être aussi induite par une autre protéine membranaire : la PGRMC1 (receptor membrane component-1). C'est une protéine membranaire de 28 kDa qui possède un court domaine extracellulaire N-terminal, un seul domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique ([Furukawa & Kurokawa 2007](#)).

Enfin, dans la littérature peu de données concernent l'action non-génomique des androgènes, cependant une étude a mis en évidence l'existence de deux formes tronquées dans la région N-terminale des récepteurs aux androgènes (50 kDa et 45 kDa) au niveau de l'oviducte chez la tortue ([Selcer et al 2005](#)), mais également chez d'autres mammifères et au niveau de plusieurs tissus, avec une forte expression au niveau du cœur ([Ahrens-Fath et al 2005](#)). Cependant leurs rôles physiologiques et leurs natures moléculaires n'ont pas encore été déterminés.

3.5. Rôle des hormones sexuelles stéroïdiennes

La présence de ces isoformes et leur répartition tissulaire est donc pour une grande part à l'origine de la plus ou moins grande sensibilité d'un tissu cible à une hormone donnée. De la

même manière, la présence majoritaire d'un ou l'autre de ces récepteurs dans un tissu donné va contribuer à le rendre sensible ou non à toute substance chimique exogène capable de se fixer sur ce récepteur, avec les conséquences que l'on peut imaginer sur l'équilibre endocrinien.

D'un point de vue physiologique, les œstrogènes, les androgènes et la progestérone agissent de concert dans l'organogenèse dès les premiers instants de la vie fœtale. Ils dirigent la différenciation sexuelle et donc la mise en place des caractères sexuels secondaires, de la gamétogénèse et de la puberté. Mais ils ont aussi une action trophique sur l'ensemble du développement corporel : muscles, masse osseuse et cartilage de croissance ainsi qu'au niveau cutané, en stimulant le système pileux ou la sécrétion des glandes sébacées par exemple. Leur spectre d'action s'étend au système vasculaire, au métabolisme général, etc. Ils sont également impliqués dans la mise en place de nombreux processus comportementaux incluant le comportement sexuel, mais aussi le comportement social, le comportement maternel et le comportement alimentaire.

Chez l'homme, une surexposition à des œstrogènes dès la période fœtale entraîne une féminisation de l'individu, voire des malformations du tractus génital (hypospadias, cryptorchidies), tandis qu'un excès d'androgène pendant la petite enfance se traduit par une puberté précoce. Chez la femme, un excès de synthèse des androgènes pendant la vie fœtale, mais aussi plus tard à la puberté ou à l'âge adulte conduit à une masculinisation par développement anormal des caractères sexuels secondaires. A l'inverse, un défaut dans la synthèse des androgènes se répercute sur la synthèse des œstrogènes et peut être à l'origine d'un retard pubertaire. Le syndrome des ovaires poly-kystiques, certaines tumeurs ovariennes, des hyperplasies congénitales des surrénales, l'hirsutisme, le syndrome sec, sont également des pathologies en lien avec une dérégulation des androgènes chez la femme.

Par leur action sur le système nerveux central, en synergie avec les neuromédiateurs ils contribuent fortement à la mise en place et à la régulation des circuits neuronaux impliqués dans l'équilibre psychique, le maintien des facultés mentales, de la mémoire, mais aussi dans le comportement, qu'il soit social, sexuel, maternel ou alimentaire, des capacités qui s'altèrent au cours du vieillissement en lien avec la réduction de la production gonadique.

CHAPITRE 2: LE COMPORTEMENT MATERNEL

Le comportement social (agression, comportement maternel ...), et le comportement non social (exploration, mémoire...) sont l'ensemble des interactions qui peuvent avoir lieu entre l'animal et son environnement, ou au sein d'un groupe d'animaux. Elles sont étroitement associées au statut hormonal, à des facteurs génétiques mais aussi à d'autres facteurs environnementaux. Chez les rongeurs comme chez d'autres mammifères il existe des comportements dits comportements reproducteurs «*Reproductive Behaviors*» qui présentent un dimorphisme sexuel. Un autre type de comportement dit «*Non-Reproductive Behaviors*» (comportement non reproducteur) présente aussi une différence mâle/femelle. Ce dimorphisme signifie l'implication des œstrogènes et des androgènes ([Arnold & Gorski 1984](#)).

1. Attitudes du comportement maternel

Le comportement maternel est un comportement social. Il est défini comme l'ensemble des interactions (stimuli auditifs, olfactifs, ... etc.) qui peuvent avoir lieu entre la mère et le nouveau-né. Il est vital pour ce dernier car la mère est l'unique source de l'alimentation. Le comportement maternel se manifeste par plusieurs activités de la mère par rapport à l'allaitement, à sa façon de transporter, de nourrir et aux soins donnés à sa progéniture [revue ([Fleming et al 1999](#))] (Figure 7).

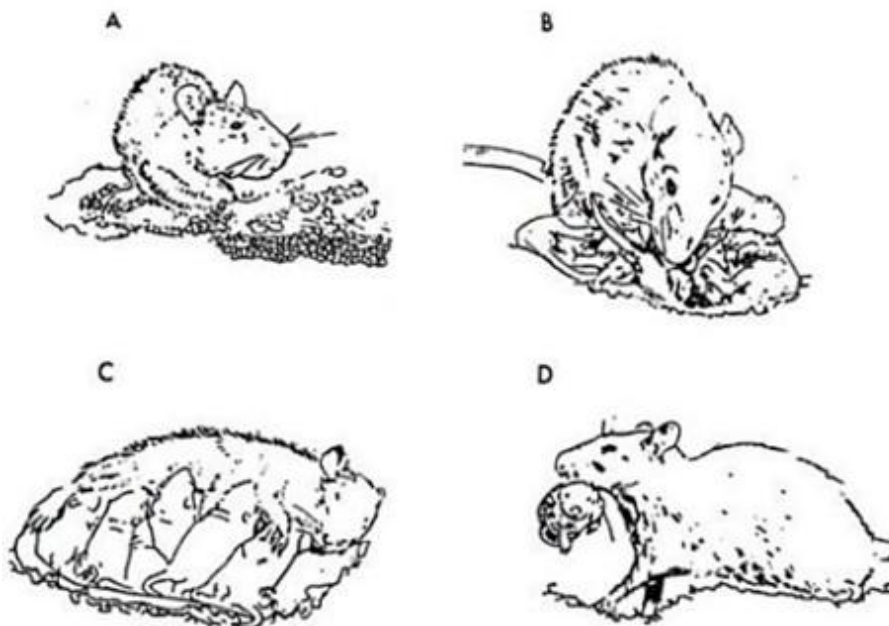


Figure 7: Principaux éléments du comportement maternel chez les rongeurs. A. La construction du nid, B. Le léchage, C. L'allaitement, D. Le transport des jeunes [D'après ([Rosenblum & Moltz 1983](#))].

Une perturbation des stimuli émis par le nouveau-né vers la mère peut entraîner une altération au niveau du système neuroendocrinien des nouveau-nés et par conséquent une modification dans le comportement exprimé à l'âge adulte ([Francis et al 1999](#)).

- *Le Nest building* (ou construction du nid) : le nid permet d'entretenir une aire de repos, cette activité est présente tout le long de la vie, par contre la taille du nid, sa fonction son aspect varie en fonction du statut de la femelle (gestante, allaitante ou vide). La taille du nid varie également en fonction du temps, il atteint son maximum dans les dix premiers jours après la mise bas, et à l'intérieur on trouve les rats, collés les uns aux autres, ce qui permet de garder la chaleur car leur thermorégulation est encore déficiente.
- *Le resting (in-side, out-side the nest)* (ou repos) : c'est le temps passé en dehors (*out-side*) ou à l'intérieur du nid (*in-side*), il varie en fonction de l'état de la femelle (gestante, allaitante ou vide). Durant les deux derniers jours de la gestation, et les quatre premiers jours de la lactation, les femelles passent plus de temps à l'intérieur du nid, donc elles mangent et boivent moins (Figure 8). Pendant ce temps passé à l'intérieur du nid, une des fonctions principale des femelles est l'allaitement (the nursing).
- *Le nursing* (ou allaitement) : la rate produit quotidiennement en moyenne de 10-20 mL, et le pic de lactation est enregistré aux alentours du PND 12-PND 14. Il existe trois principales positions d'allaitement : arched-nursing, blanket-nursing et passive-nursing. Les deux premières positions sont considérées comme un allaitement actif, tandis que la troisième position est considérée comme allaitement passif ([Slamberova et al 2001](#)).

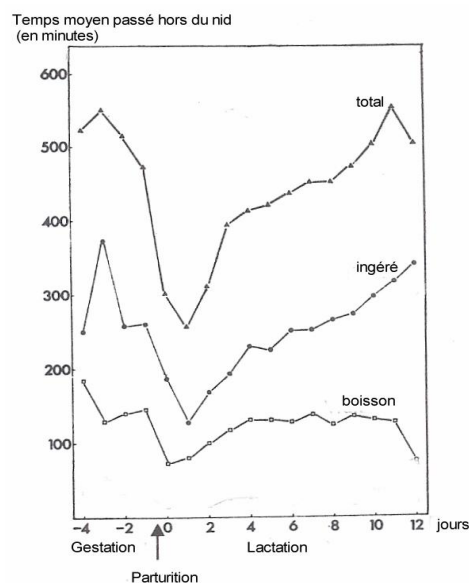


Figure 8: Temps quotidien moyen passé hors du nid, pour boire et manger chez la souris ([Barnett & Burn 1970](#)).

A la mise-bas, la mère aide les nouveaux nés à naître en les tirant puis elle mange les placenta, nettoie les ratons (pups licking) en léchant les tétines ce qui permet un développement normal de la glande mammaire des femelles. Et durant cette période la mère est dans un état de réceptivité maximale de toutes les informations sensorielles néonatales ce qui permet de maintenir la réponse maternelle ([Lévy et al 2001](#)).

2. Interaction Mère – Nouveau-nés

2.1. Les vocalisations ultrasoniques

Parmi les signaux émis par les nouveau-nés, on trouve les « vocalisations ultrasoniques ». Ce sont des cris émis par les nouveaux nés ; chez les rongeurs ils ont une fréquence de 30-80 kHz (souris), et 30-50 kHz (rat). Le but des vocalisations ultrasoniques sont de stimuler le comportement maternel, ce qui se traduit par le léchage ([Branchi et al 2001](#)). Cette stimulation commence dès le premier jour de la mise-bas, elle s'accroît pour atteindre un pic lors au 8^{ème} jour, et elle s'éteint deux semaines après la mise-bas, c'est-à-dire un peu avant le sevrage

2.2. Odorat

Autre signal qui stimule la mère, l'odeur. Chez les rats, l'odeur de nouveau-nés est perçue comme désagréable et inhibe le comportement maternel. Après la mise-bas, les mères changent de comportement et l'odeur de ses nouveau-nés devient très attractive. Le changement du statut hormonal après la mise-bas est considéré comme facteur déclencheur du comportement maternel, où l'odeur joue un rôle primordial pour le maintenir. Il a été montré que l'odeur au niveau de la région ano-génitale peut stimuler le comportement maternel (léchage et toilettage) [revue ([Nagasawa et al 2012](#))].

Après la mise-bas le contrôle hormonal du comportement maternel diminue et la mère dépend uniquement de la stimulation par ces ratons afin de garder son comportement maternel [revue ([Palanza et al 2008](#))].

3. Régulation hormonale du comportement maternel

Physiologiquement le comportement maternel est sous l'influence de neurotransmetteurs, qui sont sécrétés au niveau cérébral, tels l'ocytocine, les opioïdes et la dopamine, ou bien par d'autres

hormones secrétées au niveau périphérique telles que les œstrogènes et les glucocorticoïdes (Tableau 1).

Tableau 1: Hormones influençant le comportement maternel chez la rate ([Poindron 2005](#))

	Rat
Œstradiol	+
Progestérone	-
Ocytocine	+
Prolactine	+
Corticostérone	+
Prostaglandine	+
Opiacés	-

3.1. Effets des œstrogènes et de la progestérone

Les œstrogènes ne semblent pas avoir un rôle très important dans l'allaitement car une ovariectomie pratiquée chez une rate en lactation n'a d'influence ni sur la lactation ni sur le comportement maternel ([Lévy et al 2001](#)).

Les œstrogènes ont un rôle dans le déclenchement du comportement maternel. Chez le rat, comme chez le lapin, l'augmentation des concentrations sériques des œstrogènes, s'accompagne d'une diminution de progestérone pendant la deuxième moitié de la gestation ce qui favorise le déclenchement du comportement maternel. Fahrbach et al, montrent que chez des rates l'arrêt de la gestation par une ablation de l'utérus et l'ovaire, puis une perfusion d'œstradiol au niveau de la région médiane de l'aire pré-optique (MPOA), stimulent l'apparition du comportement maternel 48 heures après ([Fahrbach & Pfaff 1986](#)).

Cette stimulation est accompagnée par une augmentation de la concentration des récepteurs aux œstrogènes au niveau du MPOA ([Giordano et al 1989](#)). Réciproquement, le traitement avec de l'œstradiol au niveau du MPOA chez des rates après l'arrêt de la gestation par une ablation de l'utérus et de l'ovaire, montre une capacité à rassembler des nouveau-nés plus efficace et plus rapide que des rates contrôles durant un test qui dure 15 min. Cela suggère que l'œstradiol facilite le comportement maternel ([Fahrbach & Pfaff 1986](#)). Aussi Champagne et al, montrent que l'augmentation des récepteurs à l'ocytocine au niveau MPOA est corrélée avec le comportement

maternel [(licking/grooming) (léchage et toilettage) des petits], et un traitement avec l'œstradiol augmente l'expression des récepteurs à l'ocytocine au niveau du MPOA, et en conséquence il affecte le comportement maternel (licking/grooming) ([Champagne et al 2001](#)).

3.2. Effets de l'ocytocine

L'ocytocine est synthétisée au niveau de l'hypothalamus (noyaux supra optique, noyaux para ventriculaires), sécrétée par l'hypophyse postérieure, mais également localement au niveau cérébral. L'ocytocine est impliquée dans l'expression du comportement maternel (type attachement), et joue également un rôle dans l'accouchement en stimulant les contractions utérines. L'injection intra cérébro-ventriculaire de 0,4 µg d'ocytocine à des femelles vierges est suffisante pour stimuler le comportement maternel, ce qui montre le rôle primordial de cette hormone dans le déclenchement de ce comportement ([Pedersen et al 1982](#)) ([Pedersen & Prange 1979](#)).

A l'inverse chez des mères allaitantes, des lésions provoquées au niveau de la région para ventriculaire de l'hypothalamus montrent une altération dans le comportement maternel, ce qui souligne l'importance de cette région qui contient le site de synthèse de l'ocytocine ([Insel & Harbaugh 1989](#)). On sait par ailleurs que l'ocytocine intervient aussi dans la perception des stimuli sensoriels pour favoriser l'attachement et le comportement maternel (Figure 9) ([Nagasawa et al 2012](#)).

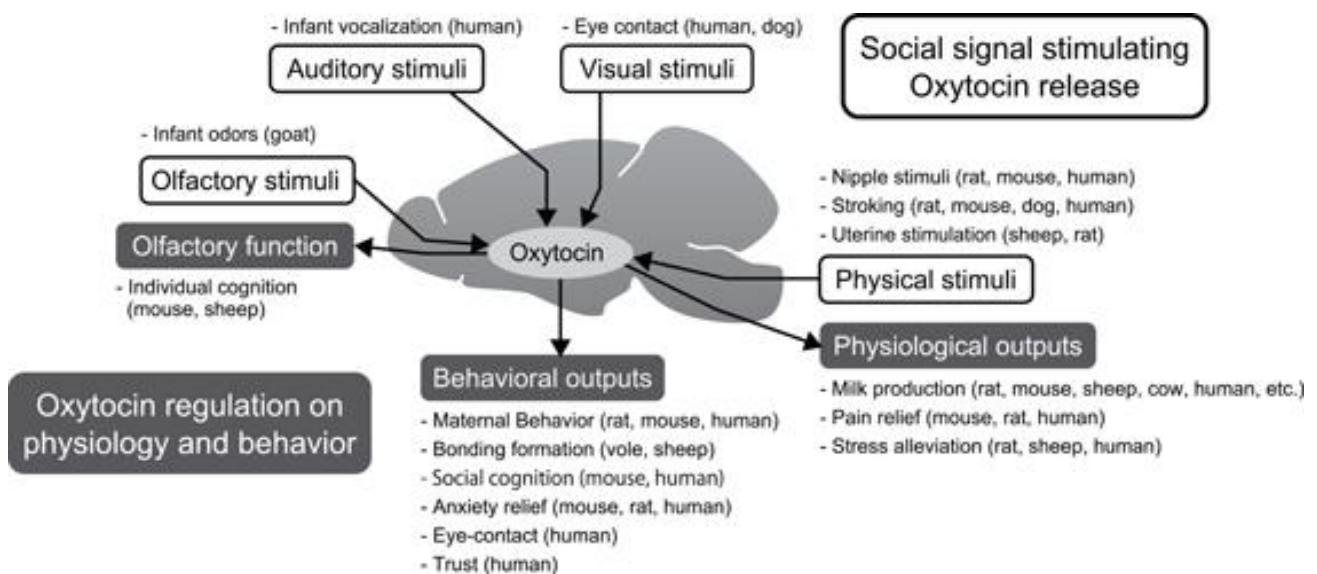


Figure 9: Rôle de l'ocytocine dans le comportement maternel et les perceptions sensorielles ([Nagasawa et al 2012](#))

3.3. Effets de la prolactine

La prolactine est une hormone sécrétée par les cellules lactotropes au niveau de l'hypophyse antérieure. Elle joue un rôle important dans la lactation et le développement de la glande mammaire. Chez le rat l'expression des récepteurs de la prolactine, qui sont présents au niveau du plexus choroïde, de l'hypothalamus et au niveau de l'aire pré-optique, augmentent durant la gestation et la lactation, sous l'action des hormones stéroïdiennes et d'une action locale de la prolactine. Cette variation dans l'expression des récepteurs peut être impliquée dans la mise en place du comportement maternel après la mise-bas, car ces régions gouvernent aussi le comportement maternel ([Grattan 2002](#)). De plus le blocage de la sécrétion de la prolactine avec de la bromocriptine (agoniste dopaminergique), ou le blocage de la signalisation par administration d'un antagoniste du récepteur retarde le commencement du comportement maternel ([Bridges et al 2001](#)) ([Bridges et al 1990](#)).

3.4. Effets des glucocorticoïdes

Une autre hormone est impliquée dans la régulation du comportement maternel : la corticostérone, synthétisée au niveau de la corticosurrénale. Liu et al, montrent que chez les rates, l'augmentation de léchage, du toilettage des petits et de l'allaitement en position « arched-back » s'accompagne d'une faible réponse de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien lors des situations de stress ([Liu et al 1997](#)). Une courte séparation (30 minutes) de la mère et sa portée suffit pour augmenter la concentration sérique de corticostérone chez les nouveau-nés. Une fois la mère remise dans la cage, cette concentration retrouve son niveau basal, ce qui suggère que la présence de la mère avec sa portée (odeur, l'allaitement...) suffit pour rétablir la réponse de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien ([Moles et al 2008](#)).

3.5. Effets des opioïdes

Les opioïdes (opiacés) ont également la capacité d'influencer le comportement maternel : Mayer et al, montrent qu'un traitement avec un antagoniste aux opioïdes type Naltrexone (un inhibiteur des opiacés) entraîne une altération du comportement maternel pendant les premiers jours de l'allaitement, qui se manifeste par une diminution du léchage des petits ainsi qu'une diminution de la placentophagie ([Mayer et al 1985](#)).

D'autres facteurs hormonaux ont la capacité d'affecter le comportement maternel, tels que les prostaglandines ou la cholécystokinine (CCK) appelée aussi hormone de la satiété. Elle est

synthétisée au niveau du tube digestif, et elle est aussi impliquée dans la régulation du comportement alimentaire ([Poindron 2005](#)). Ceci laisse entrevoir les possibles voies de régulation entre le comportement maternel et le comportement alimentaire.

CHAPITRE 3 : LE COMPORTEMENT ALIMENTAIRE

Le comportement alimentaire désigne l'ensemble des conduites d'un individu vis-à-vis de la consommation d'aliments. La principale fonction physiologique de ce comportement est d'assurer l'apport des substrats énergétiques et des composés biochimiques nécessaires à l'ensemble des cellules de l'organisme. Sa régulation entre dans le cadre général de la régulation de l'homéostasie énergétique, qui lui-même est définie comme un processus physiologique visant à garder un équilibre entre la dépense énergétique et la prise alimentaire. On peut subdiviser le comportement alimentaire en deux parties : la prise alimentaire et les préférences gustatives.

1. La prise alimentaire et sa régulation hormonale

1.1. Définition

La prise alimentaire est un comportement périodique, grâce auquel l'individu apporte à son organisme les ressources nutritionnelles nécessaires à sa survie. La régulation interne de la glycémie ou des réserves adipeuses et la disponibilité de l'aliment dans l'environnement contribuent à déclencher les sensations de faim et de satiété qui commandent la prise alimentaire. Lors du repas, la sensation de faim est progressivement réduite par l'ingestion de nourriture qui déclenche un processus de satiété et entraîne l'arrêt de la consommation avant même que le bol alimentaire soit digéré. Ce contrôle de la prise alimentaire est modulé par des facteurs sensoriels, des signaux gastro-intestinaux, et des réponses neuroendocriniennes liées à l'arrivée de nutriments dans le tractus digestif. La satiété, cette période d'absence de faim qui suit le repas, dépend de la composition nutritionnelle du repas et surtout de sa densité énergétique. Les mécanismes physiologiques mis en place au cours du développement pour contrôler la prise alimentaire en fonction des manques énergétiques ou des excès alimentaires reposent sur l'action d'hormones et de neuromédiateurs qui agissent au niveau du système nerveux central et des organes périphériques. Ce système qui contrôle la prise alimentaire et la dépense énergétique est très complexe, redondant, avec des milliers de gènes, ce qui reflète une importance fondamentale d'un équilibre dans l'approvisionnement des nutriments et le bilan énergétique ([Lenard & Berthoud 2008](#)) (Figure 10).

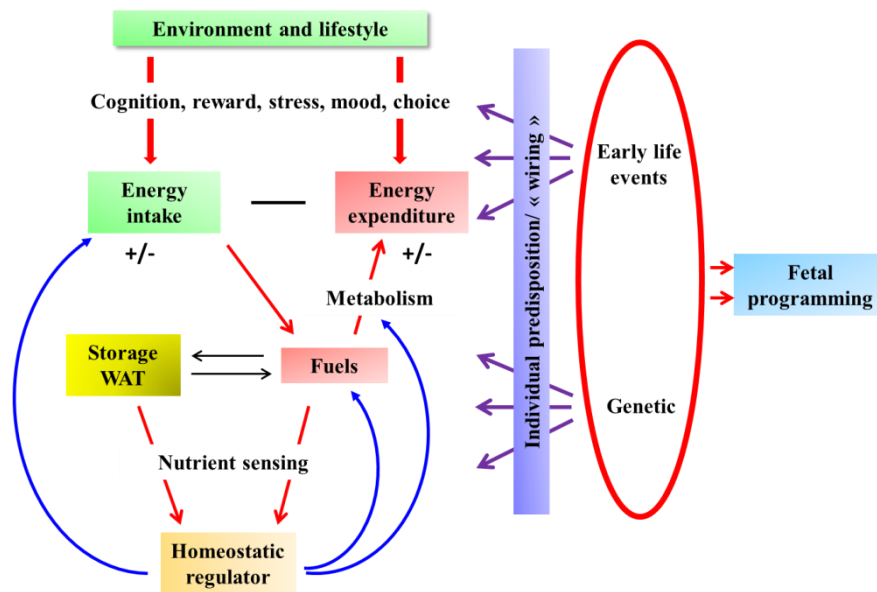


Figure 10: Mécanismes et facteurs déterminants la régulation de la balance énergétique [D'après (Lenard & Berthoud 2008) (avec modifications)]

Au niveau central, deux processus gouvernent la régulation de la prise alimentaire : un processus à long terme dont le but est de maintenir un équilibre de stock de la masse grasse, et un processus à court terme, dont le but est de contrôler le début, la fin, et l'intervalle entre les repas. Le noyau arqué de l'hypothalamus joue un rôle déterminant dans le contrôle de la prise alimentaire et la dépense énergétique grâce à deux populations neuronales interconnectées (Valassi et al 2008) :

- Les neurones orexigènes, dont le but est de stimuler la prise alimentaire par la production de Neuropeptide Y (NPY) et Agouti Related Peptide (AgRp).
- Les neurones anorexigènes, dont le rôle est de contrecarrer l'action de la première population donc diminuer la prise alimentaire par la production du Pro-OpiomelanoCortin (POMC) et Cocaine and Amphetamine Regulated Transcript peptide (CART).

D'autres signaux périphériques ont la capacité de moduler la réponse des neurones (NPY/AgRp), (POMC/CART) : le tableau 2 ci-dessous montre les hormones impliquées dans la régulation de l'homéostasie énergétique.

Parmi ces hormones on trouve des hormones secrétées au niveau du tissu adipeux (leptine, adiponectine); au niveau du pancréas (insuline, glucagon) ; au niveau des gonades (œstrogènes, androgènes); et au niveau de la surrénale (glucocorticoïdes).

Tableau 2: Hormones impliquées dans la régulation de prise alimentaire et l'homéostasie énergétique [D'après ([Sugiyama & Agellon 2012](#))]

Hormone	Classe	Source principale	Fonctions
Leptine	Peptide	Tissu adipeux	Inhibe la prise alimentaire
Adiponectine	Peptide	Tissu adipeux	Anti inflammatoire, augmente la sensibilité à l'insuline
Résistine	Peptide	Tissu adipeux	Antagoniste à l'insuline
Ghréline	Peptide	Estomac	Stimule la prise alimentaire
Insuline	Peptide	Pancréas	Inhibe la lipolyse, stimule l'utilisation du glucose
Neuropeptide Y	Peptide	Hypothalamus	Stimule la prise alimentaire
Agouti-related protein	Peptide	Hypothalamus	Stimule la prise alimentaire
Brain-derived neurotrophic factor	Peptide	Hypothalamus	Inhibe la prise alimentaire
Proopiomelanocortin	Peptide	Hypothalamus	Inhibe la prise alimentaire
Thyrotropin-releasing hormone	Peptide	Hypothalamus	Inhibe la prise alimentaire
Alpha Melanocyte-stimulating hormone	Peptide	Hypophyse	Inhibe la prise alimentaire
Cholecystokinin	Peptide	Intestin	Inhibe la prise alimentaire
Glucagon-like peptide-1	Peptide	Intestin	Inhibe la prise alimentaire, retarde la vidange gastrique
Oxyntomoduline	Peptide	Intestin	Inhibe la prise alimentaire, augmente la dépense énergétique
Oleylethanolamide	lipide	Intestin	Inhibe la prise alimentaire, agit sur les récepteurs au cannabinoïdes au niveau des tissus périphérique
Œstrogène	Stéroïde	Ovaires	Varie selon les tissus, améliore l'effet anabolisant de l'insuline
Testostérone	Stéroïde	Testicules	Effet anabolisant, possible inhibition de la prise alimentaire
Progestérone	Stéroïde	Ovaires	Régule la lactation
Glucocorticoïdes	Stéroïde	Surrénales	Métabolisme des glucides et lipides

1.2. Rôle de la leptine et de l'insuline

Parmi les hormones qui jouent un rôle dans le métabolisme énergétique, deux hormones ont un rôle clé dans la régulation de la prise alimentaire : la leptine et l'insuline.

1.2.1. Rôle de la leptine

C'est une cytokine principalement synthétisée par le tissu adipeux, mais aussi le placenta (pas dans toutes les espèces) ([Hassink et al 1997](#)) ([Laivuori et al 2006](#)), la glande mammaire ([Smith-Kirwin et al 1998](#)), et d'autres tissus comme la glande salivaire et l'épithélium lingual ([De Matteis et al 2002](#)). Elle est impliquée dans le contrôle de la réserve adipeuse et de la satiété, mais également elle peut affecter les préférences gustatives telles qu'une modulation de la préférence au sucré ([Kawai et al 2000](#)). Elle agit également sur le système limbique qui régule la motivation, et les circuits de récompense de la prise alimentaire. La leptine peut aussi affecter des fonctions neuroendocriniennes au niveau cérébral, qui se traduisent par des effets au niveau périphérique sur la sécrétion des hormones de reproduction et des hormones thyroïdiennes ([Mantzoros et al 2011](#)). Elle agit aussi sur le métabolisme lipidique et glucidique, et sur le système gastro-intestinal (Figure 11) ([Vatier et al 2010](#)).

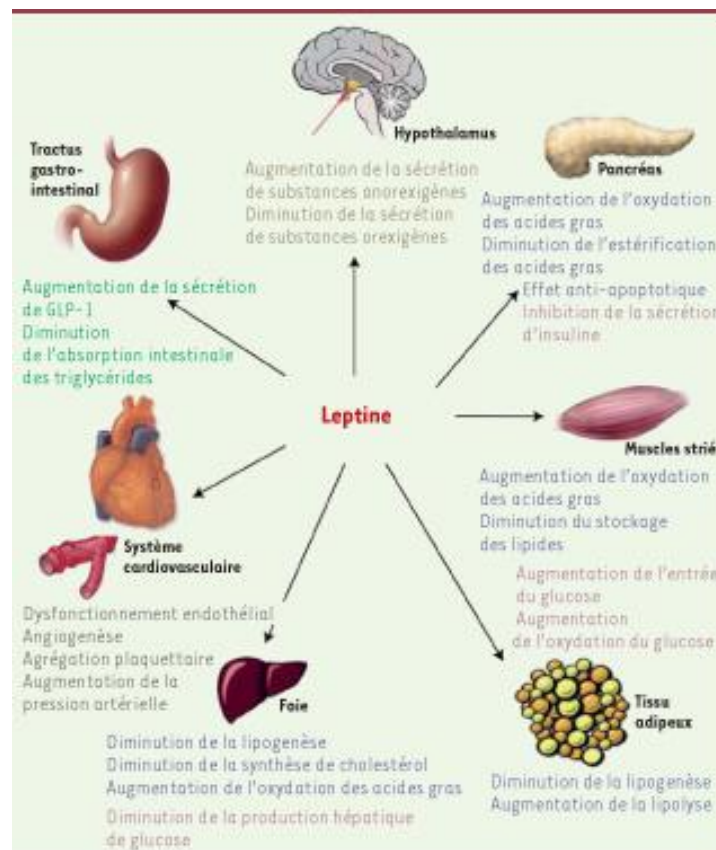


Figure 11 : Effets pleiotropiques de la leptine ([Vatier et al 2010](#)).

Chez des sujets obèses qui présentent une déficience en leptine, un traitement avec cette hormone réduit l'hyperphagie et augmente la perte de poids, et au niveau central, la leptine stimule aussi la suppression de l'appétit ([Kawai et al 2000](#)). A noter que les glandes salivaires et les bourgeons gustatifs sont également des tissus cibles, et bien que la leptine soit décrite pour intervenir dans certaines préférences sensorielles, son rôle sur ces organes est encore peu élucidé ([De Matteis et al 2002](#)).

La leptine agit en se fixant sur des récepteurs appartenant à la classe I des cytokines qui sont surtout exprimés au niveau du système nerveux central associé à la thyrosine kinase dont la phosphorylation déclenche de multiples voies de signalisation. Au niveau hypothalamique une diminution de la leptine sérique entraîne une augmentation de l'expression des neuropeptides AgRP et NPY au niveau du noyau arqué, et de MCH (*Melanin-Concentrating Hormone*) et d'Orexin au niveau du LHA (*Lateral Hypothalamic Area*). Elle entraîne également une diminution de l'expression de neuropeptides POMC et CART au niveau du noyau arqué, et du BDNF (*Brain-Derived Neurotropic Factor*) au niveau du VMH (*Ventromedial Hypothalamic Nucleus*). Elle agit de concert avec l'insuline (Figure 12).

1.2.2. Rôle de l'insuline

Hormone hypoglycémiante, synthétisée par les îlots β de Langerhans du pancréas, l'insuline est constituée de 51 acides aminés répartis en deux chaînes : la chaîne A qui renferme 21 résidus d'acides aminés, et la chaîne B avec 30 résidus d'acides aminés, qui sont reliés par deux ponts disulfures. Un troisième pont relie les acides aminés en position 6 et 11 de la chaîne A. L'insuline agit sur la prise alimentaire par son action au niveau périphérique et au niveau central.

Au niveau périphérique, c'est une hormone anabolisante (stimule le processus anabolique), et d'une manière générale, elle augmente l'utilisation du glucose et diminue sa production. Elle agit sur les transporteurs du glucose (GLUT) et facilite l'entrée du glucose dans la cellule. Elle augmente la synthèse des acides gras et diminue la lipolyse et la cétoxygénèse. L'insuline conduit au stockage d'énergie lors de l'excès d'apport d'éléments nutritifs, par contre une déficience de production, donc une incapacité dans le stockage du glucose ne provoque pas forcément une obésité ([Woods et al 1998](#)).

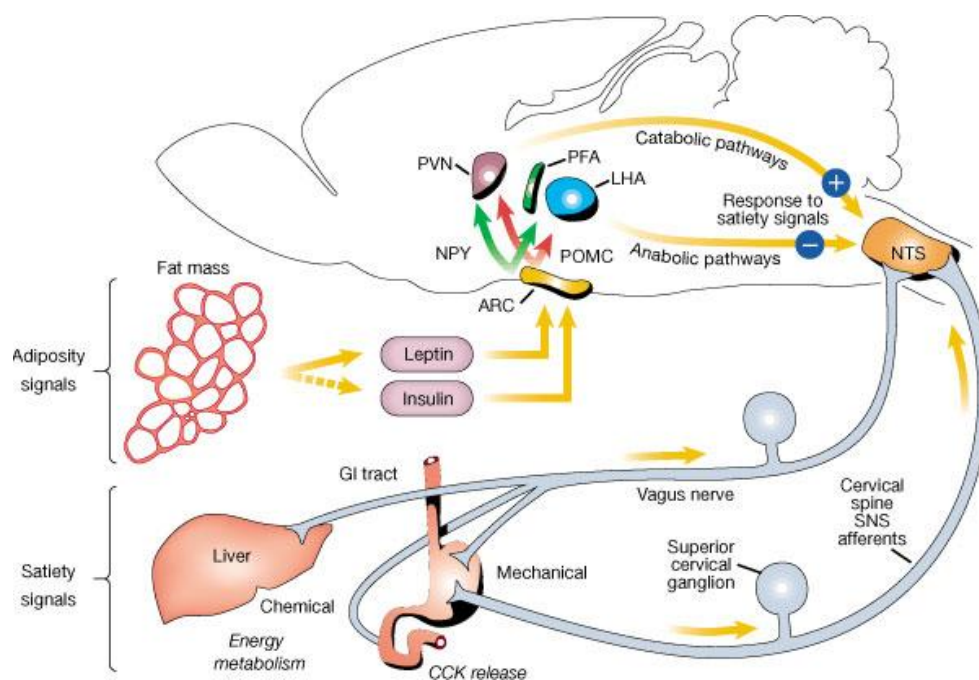


Figure 12 : Rétro contrôle périphérique par les fibres sensorielles, la leptine et l'insuline sur les centres régulateurs de la prise alimentaire au niveau central [D'après (Schwartz et al 2000)]. ARC, noyau arqué ; CCK, cholécystokinine ; LHA, hypothalamus latéral ; NPY, neuropeptide Y ; PFA, aire périfornicale ; POMC, pro-opimélanocortine ; PVN, noyau hypothalamique paraventriculaire.

Au niveau central, comme la leptine, l'insuline agit directement au niveau de système nerveux central. Les aires impliquées dans le contrôle du comportement alimentaire expriment fortement les récepteurs à l'insuline. Ainsi après le repas les taux de leptine et d'insuline augmentent au niveau de l'hypothalamus ce qui entraîne la satiété (Gerozissis 2001). La figure 12, montre que les deux hormones exercent un rétrocontrôle au niveau central. Elles sont secrétées en fonction de la quantité des réserves énergétiques de l'organisme, et elles vont avoir des effets à long terme sur la régulation de la balance énergétique, aussi bien au niveau des entrées que des dépenses énergétiques.

1.2.3. Rôle des hormones sexuelles stéroïdiennes

1.2.3.1. Rôle des œstrogènes

Les œstrogènes semblent jouer un rôle clé dans le contrôle de la prise alimentaire. Chez les mammifères, y compris chez les femmes, une augmentation de l'œstradiol sérique est enregistrée durant l'œstrus, les cycles menstruels et la grossesse. Cette augmentation s'accompagne d'une diminution de la prise alimentaire et d'une accumulation des graisses. Cependant, une baisse des taux d'œstrogènes provoquée par une ovariectomie, des traitements avec des anti-œstrogènes, ou

la ménopause, augmente la prise alimentaire. Ces effets sont corrigés par des injections d'œstradiol, ce qui suggère son action anorexigène au niveau du système nerveux central ([Roepke 2009](#)). Dans le même sens, les souris ER α KO présentent un gain de poids important qui s'associe à une diminution des dépenses énergétiques ([Ogawa et al 2003](#)), et l'administration d'œstrogènes au niveau du noyau arqué et du VMH (Ventromedial Hypothalamus) conduit à la réduction de l'apport alimentaire et du poids corporel ([Gao & Horvath 2008](#)).

Les œstrogènes augmentent également l'expression des récepteurs à la leptine dont on a vu le rôle clé dans la régulation de la prise alimentaire ([Rocha et al 2004](#)), ainsi que la sensibilité à la leptine au niveau hypothalamique ([Chakraborty et al 2008](#)). Par ailleurs, il a été montré que la suppression de l'expression des récepteurs ER α au niveau du VMH avec un ARNi provoque une obésité associée à une hyperphagie, une perte de tolérance au glucose et une réduction de la dépense énergétique, ce qui souligne à nouveau le rôle important des œstrogènes au niveau hypothalamique ([Musatov et al 2007](#)).

Au niveau périphérique, l'œstradiol (E2) prévient l'accumulation de gras au niveau viscéral, augmente l'expression des récepteurs de l'insuline au niveau adipocytaire, et diminue la lipogenèse ; d'une manière plus générale, il prévient le développement de l'obésité et la mise en place de l'insulino-résistance ([Clegg et al 2006](#)). Le fait de pratiquer une ovariectomie chez des souris entraîne une augmentation de poids corporel, de la masse grasse abdominale, de la glycémie et de l'insuline ; l'apparition d'une insulino-résistance s'accompagne d'une diminution de la phosphorylation de l'AMPK et de son substrat, l'acetyl-CoA carboxylase au niveau du tissu adipeux favorisant une accumulation des triglycérides. Ces œstrogènes induisent aussi des altérations dans l'expression des gènes qui gouvernent le métabolisme glucidique : diminution dans l'expression de l'adiponectine, du PPAR γ , du Coactivateur-1 α (PGC-1 α), de l'Uncoupling Protein 2 (UCP2) et une augmentation de la résistine (une adipokine responsable de l'hyperinsulinémie). Un traitement avec de l'E2 permet de restaurer la glycémie, la phosphorylation de l'AMPK, et augmente l'expression de l'adiponectine, de PGC-1 α et l'UCP2 ; l'E2 provoque également la diminution de l'expression de la résistine ([Kim et al 2010](#)).

Chez des souris ER α -KO, les mâles développent une augmentation progressive de la masse grasse viscérale (tissu adipeux blanc péri-rénal et épидидymaire et inguinal), et cette augmentation de la masse grasse s'accompagne d'une hypertrophie et d'une hyperplasie de l'adipocyte au niveau de tissu adipeux péri-rénal et épидидymaire, sans pour autant affecter la prise alimentaire,

ce qui suggère que cette prise de poids ne résulte pas d'une hyperphagie. Chez les femelles ER α -KO, l'augmentation de la masse grasse s'accompagne également d'une hypertrophie et d'une hyperplasie des cellules adipeuses. Les souris des deux sexes développent aussi une insulino-résistance, et une déficience de tolérance au glucose ([Heine et al 2000](#)), confirmant le lien étroit entre les œstrogènes, les troubles du métabolisme énergétique et l'obésité. Dans le même sens Faustini et al, montrent qu'une déficience en œstrogènes conduit à l'apparition précoce d'un surpoids androïde associée à une insulino-résistance et une dyslipidémie ([Faustini-Fustini et al 1999](#)). Parallèlement, au niveau périphérique les œstrogènes stimulent la libération de cholécystokinine (CCK), une hormone synthétisée par le tube digestif qui diminue la prise alimentaire.

1.2.3.2. Rôle des androgènes

Chez les mammifères, la prise alimentaire des mâles est supérieure à celles des femelles, mais les mécanismes qui gouvernent ce dimorphisme sont mal connus. Les androgènes semblent avoir un rôle car ils ont la capacité d'affecter la prise alimentaire. Cependant, les données actuelles permettent difficilement de dire si l'action des androgènes passe par une action sur le système périphérique (tissu adipeux par exemple), ou plutôt par le système nerveux central (Hypothalamus par exemple), voir les deux.

Une étude chez le rat a montré qu'une exposition en fin de gestation (GD : Gestational Day 16-18) avec deux androgènes (la testostérone ou la dihydro-testostérone) n'affecte pas le poids corporel des mâles à l'âge adulte, mais augmente la masse grasse (tissu adipeux rétro-péritonéale, épидидymaire). Cependant, seuls les mâles exposés à la testostérone (androgène aromatisable en œstrogènes) développent également une intolérance au glucose et une augmentation du tissu adipeux sous-cutané, ce qui suggère une action des œstrogènes ([Lazic et al 2011](#)). Dans le même sens, Demissie et al, montrent qu'une exposition *in utero* (GD 16 à GD 19) à la testostérone entraîne une augmentation de poids corporel ainsi que celle de la masse grasse (tissu adipeux viscérale et sous-cutané) à l'âge adulte. Cette augmentation s'accompagne d'une perturbation de bilan métabolique, d'une augmentation de l'insuline (avec apparition d'une insulino-résistance), du cholestérol et des TG sériques et hépatiques ([Demissie et al 2008](#)). Chez le Macaque rhésus, une exposition *in utero* à la testostérone (10 mg) n'affecte pas le poids corporel, ni les concentrations des hormones sexuelles [(œstradiol, Déhydroépiandrostérone (DHEA), DHEA-Sulfate, androstènedione, testostérone, dihydrotestostérone (DHT)]. Cependant, elle entraîne une

insulino-résistance associée à une déficience dans l'activité des cellules β pancréatiques ([Bruns et al 2004](#)).

Au niveau central, une exposition néonatale de deux jours (PND (Post Natal Day) 1 et PND 2) à la testostérone entraîne une masculinisation des souris femelles caractérisée par une augmentation de la prise alimentaire, une diminution dans l'expression de POMC au niveau du noyau arqué. Les souris exposées à la testostérone présentent également une hyper-leptinémie associée à une résistance à la leptine au niveau central ([Nohara et al 2011](#)). Ces données montrent que, tout comme les œstrogènes, les androgènes sont également impliqués dans le contrôle de la prise alimentaire et du métabolisme énergétique.

2. Préférences gustatives et régulation hormonale

2.1. Les différentes saveurs du goût

Le goût est l'un des cinq sens qui donne une prise de conscience pour le choix des aliments. L'Homme et les animaux ont la capacité de percevoir 5 saveurs : sucré, salé, acide et amer, et une dernière rajoutée en 1908 l'umami (« délicieux » en japonais). Les combinaisons entre saveurs peuvent donner d'autres sensations de goût telles que le métallique, le piquant ou le gras, mais le sujet reste encore débattu ([Breslin & Spector 2008](#)). Les sucres apportent à l'organisme l'énergie nécessaire aux besoins quotidiens (1g de glucides/4 kcal) : le salé est impliqué dans la régulation de l'équilibre hydrominéral, tandis que la détection de l'acide permet plutôt de protéger le tractus digestif. L'amer est associé à la détection d'aliments toxiques. Cependant le rôle de l'umami reste mal connu.

2.2. Perceptions gustatives et transmission du signal

Au niveau de la cavité orale, les bourgeons du goût sont les premiers relais qui prennent en charge les molécules sapides : le sucré, l'amer et l'umami via des protéines transmembranaires (T1Rs, T2Rs) ; le salé et l'acide via des canaux ioniques (Figure 13) et enfin le gras via une protéine membranaire nommée CD36.

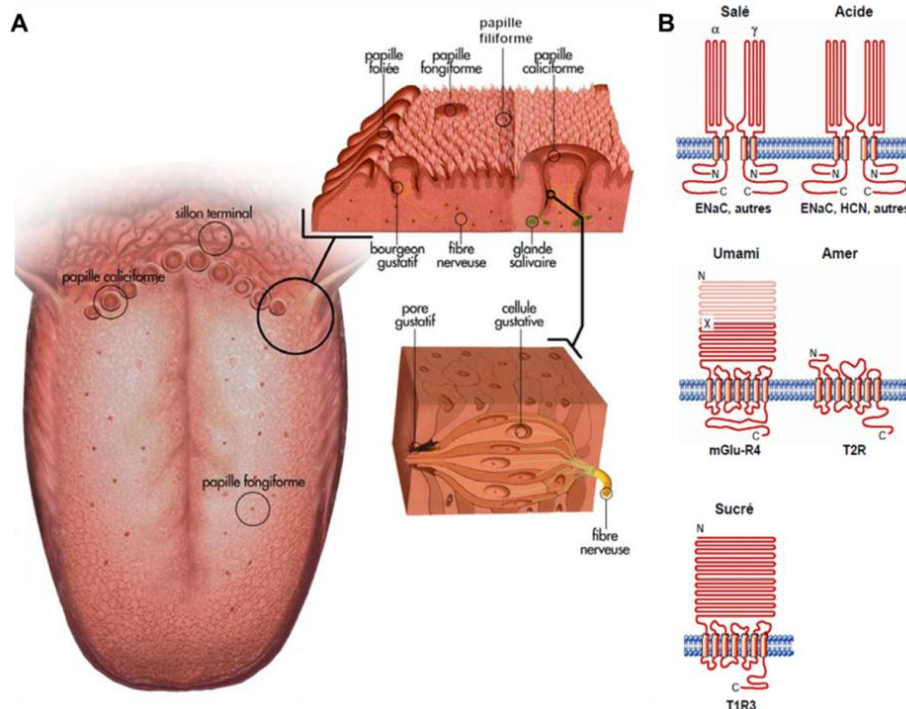


Figure 13 : Composition de l'organe gustatif : La langue et les papilles gustatives (A) et les récepteurs gustatifs (B).

La stimulation de ces structures provoque une dépolarisation des cellules, ce qui engendre une libération des neurotransmetteurs au niveau des fentes synaptiques. L'information chimique devient électrique, afin qu'elle soit acheminée par les trois nerfs crâniens (VII, IX, X) jusqu'au centres supérieurs au niveau cérébral en passant par le noyau du tractus solitaire. Les trois nerfs crâniens qui assurent la transmission du signal gustatif sont : la corde du tympan, le nerf glossopharyngien et le nerf vague. Ils acheminent l'information vers un premier relais, le tractus du noyau solitaire (NST), puis l'information arrive vers les centres supérieurs (aire gustative corticale).

2.3. Rôle des préférences gustatives

2.3.1. Préférence au sucré

La préférence spontanée pour les saveurs sucrées permet à l'individu d'apporter de l'énergie à son organisme et peut être considérée comme un facteur adaptatif pour conduire l'homme vers les aliments de réserves, naturellement sucrés. Mais une surconsommation peut conduire à l'apparition de plusieurs pathologies, telles que le diabète ou d'autres troubles métaboliques. La préférence au sucré module aussi la prise alimentaire : il a été montré qu'une stimulation par une molécule sucrée (sucrose et saccharine) entraîne une phase céphalique de la sécrétion d'insuline

(phénomène d'anticipation). Cette phase est considérée comme un réflexe conditionné et son amplitude agit sur le métabolisme énergétique et par conséquent module la prise alimentaire ([Just et al 2008](#)). Chez l'Homme, les données de la littérature sont controversées ; Rodin et al montrent qu'il n'existe pas de corrélation entre la préférence au sucré et l'obésité ([Rodin et al 1976](#)), alors que Drewnowski montrent que les préférences au sucré, comme au gras, peuvent être impliquées dans le développement de l'obésité ([Drewnowski & Greenwood 1983](#)). Il existe également un dimorphisme sexuel pour la préférence au sucré, car les femelles consomment plus de sucré que les mâles, et cette préférence apparaît après la puberté.

2.3.2. Préférence au salé

En plus de son rôle dans la palatabilité des aliments, la préférence au salé est impliquée dans la régulation de l'équilibre hydrominéral. Cependant l'Homme, tout comme les autres mammifères, n'a pas la capacité de stocker le Na^+ , d'où la nécessité d'un apport exogène. Ce dernier permettra de compenser les pertes d'eau (transpiration, urines).

La consommation excessive du salé pourrait être à l'origine de plusieurs pathologies telles que le développement de l'hypertension artérielle et les problèmes cardiovasculaires. Dans ce sens une hyponatrémie (diminution de la concentration de Na^+) peut provoquer des symptômes neurologiques, une excitabilité neuromusculaire, ou des convulsions ([McCaughey & Scott 1998](#)). Chez l'Homme, Verma et al, montrent que la préférence au salé varie en fonction de l'âge (adulte, enfant), les adultes préfèrent le salé plus que les enfants et les femmes préfèrent plus le salé que les hommes alors que chez les enfants il n'y a pas de différences entre les mâles et les femelles, ce qui indique l'implication des hormones sexuelles ([Verma et al 2007](#)). Chez les rats, il existe aussi un dimorphisme pour la consommation du salé, où les femelles semblent consommer plus de NaCl que les mâles. Cette différence apparaît au moment de la puberté, mais persiste chez les rats gonadectomisés à l'âge de 10 jours, les causes restent inconnues ([Krecek et al 1972](#)). Toutefois, ces données sont remises en cause car Chow et al, qui montrent que la testostérone joue un rôle déterminant dans le dimorphisme de la consommation du NaCl, une castration des mâles deux jours après la mise-bas entraînant une augmentation de la consommation au salé à l'âge adulte qui rejoint le même niveau que celui des femelles. Dans le même sens, un traitement continu des femelles avec de la testostérone entraîne une diminution de la consommation du salé ([Chow et al 1992](#)).

2.3.3. Préférence au gras

Contrairement aux deux autres préférences, le gras est considéré comme «tasteless» (insipide), pourtant dans les études de comportement, l'utilisation des tests de double choix pour un biberon pour détecter la préférence entre deux solutions, l'une riche en gras et l'autre dite témoin, indique que les rats préfèrent spontanément les solutions qui contiennent des lipides ([Carlisle & Stellar 1969](#)) ([Hamilton 1964](#)). De plus dans les deux dernières décennies, plusieurs études montrent l'existence du goût du gras, suite à des réponses gustatives au niveau de la cavité orale ([Abumrad 2005](#)) ([Fukuwatari et al 1997](#)). L'ingestion des triglycérides (TG) entraîne la libération des acides gras (AG) sous l'action des lipases salivaires, les AG libres viennent se lier ensuite à des protéines membranaires dites (CD 36) situées au niveau des bourgeons du goût ([Laugerette et al 2005](#)). Mais cette voie de détection reste un sujet de débat car d'autres senseurs ont également été mis en évidence ces dernières années tels que les canaux potassiques Trpm5 ([Sclafani 2007](#)), et les GPR 120 ([Matsumura et al 2007](#)). Cependant, à notre connaissance, il n'y a pas d'étude qui traite la question des différences entre les deux sexes chez les rongeurs ou chez l'Homme.

2.4. Régulation hormonale des préférences gustatives

Les préférences gustatives varient en fonction de l'âge, mais aussi en fonction du sexe. Curtis et al, montrent que les choix alimentaires varient selon le sexe en raison d'un dimorphisme sexuel pour les préférences gustatives, en particulier des goûts sucrés et salés, car les femelles consomment plus de sucré et de salé par rapport au mâles ([Curtis et al 2004](#)). Afin d'évaluer le rôle des œstrogènes et des androgènes, des tests de préférences et de sensibilité gustatives ont été réalisés. L'enregistrement des réponses à la perception du goût chez des rats mâles et chez des femelles adultes OVX (modèle animal d'ovariectomie permettant de limiter les fluctuations en œstrogènes liées aux cycles ovariens) montrent une réponse différente entre mâles et femelles et on en déduit que les œstrogènes jouent un rôle dans les réponses gustatives au sucré. Dans le même sens, les préférences au sucré chez la femelle varient selon la période du cycle œstral, en réponse aux taux d'œstrogènes circulants ([Curtis et al 2005](#)). Une grande préférence au salé chez les mâles a été enregistrée, suggérant le rôle particulier des androgènes. Ces études confirment l'implication des hormones sexuelles dans les réponses gustatives.

2.5. Tissus périphériques associés au comportement alimentaire

La régulation du comportement alimentaire dépend de plusieurs organes tels que le cerveau et le tissu adipeux (principale source d'énergie dans l'organisme) ([Penicaud 2010](#)). La cavité orale

semble également jouer un rôle déterminant dans le contrôle de la prise alimentaire et des préférences gustatives, notamment via les glandes salivaires. Plusieurs études montrent l'existence de corrélations entre des altérations gustatives et des hypo-fonctions des glandes salivaires, en particulier lors de l'hyperglycémie enregistrée chez les personnes diabétiques ([von Bultzingslowen et al 2007](#)) ([Moore et al 2001](#)) ([Borges et al 2010](#)). Ceci laisse supposer un lien direct ou indirect entre le fonctionnement des glandes salivaires et la régulation de l'homéostasie énergétique, les préférences gustatives et l'adipogenèse.

2.5.1. Le tissu adipeux

Le tissu adipeux blanc joue un rôle déterminant dans le métabolisme lipidique et glucidique, il est considéré comme un tissu endocrine qui permet de maintenir l'homéostasie énergétique.

Il existe deux types de tissu adipeux. *Le tissu adipeux blanc* (principale source énergétique de l'organisme), qui est étroitement associé à la prise alimentaire et à son contrôle, via la libération de leptine. Il représente 20 à 25% de la masse totale chez la femme tandis que chez l'homme, il varie de 15 à 20%, et le maintien de cet équilibre dépend d'une régulation hormonale fine, en particulier via les hormones sexuelles. C'est pourquoi nous lui accordons une attention plus particulière. Le second type de tissu adipeux est *le tissu adipeux brun* (impliqué dans la thermorégulation).

2.5.1.1. Histologie du tissu adipeux

Le tissu adipeux est un tissu conjonctif qui contient des pré-adipocytes (qui formeront des adipocytes en fonction de la balance énergétique, des conditions hormonales et de nutrition), des fibroblastes, des macrophages, des cellules sanguines et endothéliales ; cet ensemble de cellules constitue le stroma vasculaire du tissu adipeux. Les adipocytes sont des cellules sphériques (Figure14) d'environ 100 µm de diamètre, dont le cytoplasme renferme une volumineuse vacuole remplie de lipides (triglycérides) que l'on peut visualiser par coloration à l'huile rouge. Cette vacuole est entourée par une mince couronne cytoplasmique contenant un appareil de golgi, du réticulum endoplasmique granulaire, du réticulum endoplasmique lisse et des mitochondries. Le noyau, aplati, est refoulé contre la membrane plasmique. Une fine membrane entoure la membrane plasmique.

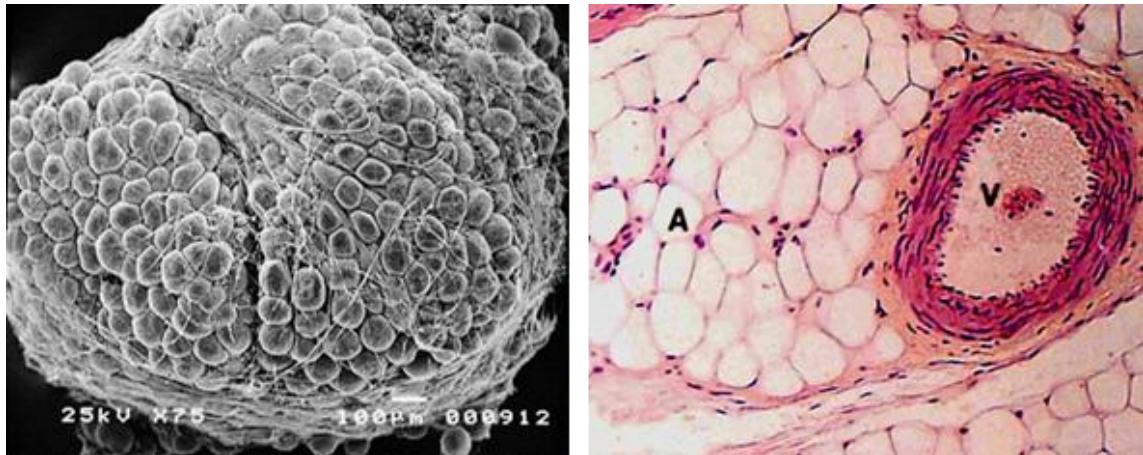


Figure 14: Microscopie du tissu adipeux blanc. A gauche, vue en microscopie électronique ([Matsuzawa 2005](#)). A droite, coupe histologique du tissu adipeux avec les adipocytes (A), la fraction stromale-vasculaire et un vaisseau (V).

2.5.1.2. Répartition du tissu adipeux

Le tissu adipeux blanc est localisé différemment selon l'âge et le sexe. Chez la femme, le tissu adipeux blanc représente de 20 à 25% de la masse totale tandis que chez l'homme, elle varie de 15 à 20%. On en trouve surtout au niveau :

- 1) sous-cutané, diffus et régulier chez le fœtus et le nouveau-né, prédominant sur la nuque et les épaules chez l'homme, sur la poitrine, les hanches, les cuisses et les fesses chez la femme.
- 2) abdominal, comme le mésentère, ou les régions rétro-péritonéales. Le tissu adipeux apparaît chez le fœtus au deuxième trimestre de la grossesse au niveau des joues, du cou, des épaules et des reins.

Les mécanismes impliqués dans le développement du tissu adipeux ne sont pas encore bien définis, mais une modulation localisée de l'activité lipolytique, via la lipoprotéine-lipase ou via la stimulation des voies nerveuses adrénérgiques, pourrait jouer un rôle, les différents dépôts graisseux n'étant pas régulés de manière identique ([Monjo et al 2005](#)).

2.5.1.3. Développement du tissu adipeux

Chez l'Homme et dès les premiers stades de développement, il existe une différence dans la composition et la répartition de la masse grasse et de la masse maigre. A la naissance les filles sont moins grandes mais avec un poids supérieur à celui des garçons, cependant la masse grasse

est plus élevée que celle enregistrée chez les garçons. Cette différence persiste du premier au 3^{ème} mois, mais elle disparaît au 6^{ème} mois ([Butte et al 2000](#)). Dans le même sens la masse grasse varie aussi avec l'IMC (indice de masse corporel), elle varie également selon l'âge, cette variation est plus prononcée chez les filles adolescentes ([Taylor et al 2002](#)).

La différenciation adipocytaire est un processus impliquant la mise en jeu coordonnée et successive de plusieurs facteurs de transcription (Figure 15). Parmi eux, les Peroxysomes proliferator-Activated Receptors (PPAR), notamment le PPAR γ 2, et les CCAT/enhancer-binding proteins (C-EBP), aboutissent à l'activation des gènes spécifiques de l'adipocyte mature ([Ntambi & Young-Cheul 2000](#)) ([Tang et al 2004](#)).

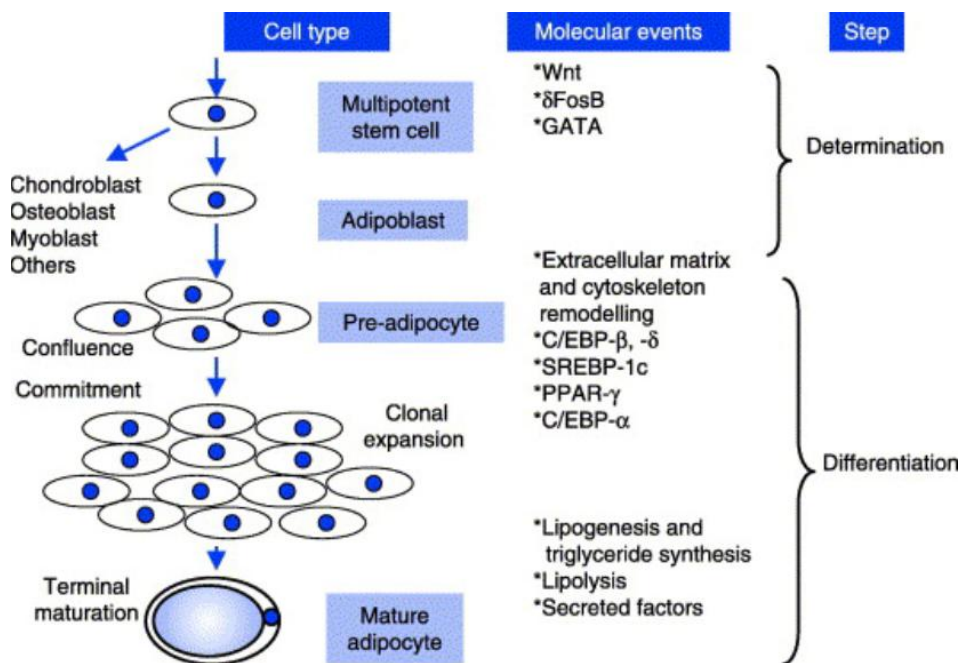


Figure 15: Détermination et différenciation adipocytaire ([Li et al 2005](#)).

L'adipogenèse peut être induite *in vitro* par l'utilisation d'un cocktail hormonal mitogénique sur des cellules de lignées pré-adipocytaires telles que les 3T3-L1. Brièvement, l'expression du Preadipocyte factor-1 (Pref-1), inhibiteur de la différenciation, est d'abord inhibée par des agents stimulants (comme l'insuline, la dexaméthasone et le 3-isobutyl-méthylxanthine IBMX) pendant que l'expression de C/EBP α et le C/EBP augmente. Ceci induit l'expression de PPAR γ 2 et C/EBP α qui vont à leur tour stimuler la transcription des gènes spécifiques de l'adipocyte mature. L'expression des récepteurs stéroïdiens est modulée au cours de l'adipogénèse et elle est peut-être impliquée dans le contrôle de l'activation en cascade des facteurs de transcription ([Fu et al 2005](#)).

Le rôle potentiel des récepteurs ER et AR dans ce processus n'est pas clairement défini. Toutefois, l'implication des hormones stéroïdiennes dans la répartition de la masse adipeuse et dans les pathologies associées à l'obésité est maintenant reconnue.

2.5.1.4. Régulation hormonale du tissu adipeux

La régulation, le développement ainsi que la distribution de la masse grasse sont sous le contrôle du système endocrinien, et les hormones sexuelles semblent jouer un rôle déterminant. Chez l'homme la masse grasse est principalement située au niveau de l'abdomen (androïde), alors que chez la femme c'est plutôt au niveau des cuisses (gynoïde). Ce dimorphisme sexuel observé chez l'homme est sous l'influence des hormones sexuelles ([Bouchard et al 1993](#)). Au niveau du tissu adipeux, les récepteurs AR et les deux types de ER sont exprimés ([Dieudonne et al 1998](#)) ([Dieudonne et al 2004](#)). Expérimentalement, les états d'insuffisance œstrogénique, comme chez les animaux ovariectomisés et chez les souris ArKO (Aromatase Knock-Out) et ERKO s'accompagnent d'une augmentation du poids des animaux touchant principalement les tissus adipeux ([Cooke & Naaz 2004](#)). Les souris ARKO (Androgen Receptor Knock-Out) développent également une obésité ([Sato et al 2003](#)). Chez l'homme, l'altération des voies de synthèse des œstrogènes tel qu'une mutation du gène de l'aromatase (qui permet la conversion des androgènes en œstrogènes) entraîne une apparition précoce d'un surpoids au niveau androïde, avec une insulino-résistance et une dyslipidémie ([Faustini-Fustini et al 1999](#)). De plus les œstrogènes semblent jouer un rôle déterminant dans la prolifération, la différenciation des pré-adipocytes en adipocytes matures, ainsi que l'activité endocrine des adipocytes tel que la synthèse de leptine ([Phrakonkham et al 2008](#)). Chez les rongeurs les œstrogènes régulent la masse grasse en agissant sur l'adipocyte. Heine et al, montrent une augmentation de poids corporel qui se traduit par une hyperplasie et une hypertrophie au niveau de l'adipocyte chez des souris ERKO. Cette modification s'accompagne par une insulino-résistance et une intolérance au glucose, une augmentation de prise de nourriture et une diminution de la dépense énergétique ([Heine et al 2000](#)).

Tout cela nous montre le rôle des hormones sexuelles dans le contrôle de l'adipogenèse, et met l'accent sur l'implication de ces hormones dans l'apparition des pathologies telles que l'obésité et d'autres troubles métaboliques.

2.5.2. Les glandes salivaires

Les glandes salivaires sont un groupe d'organes sécrétoires de la salive, une substance importante pour le maintien de l'homéostasie buccale. La salive est impliquée également dans la protection et la lubrification de la cavité orale qui est indispensable dans la perception et la libération de la flaveur. Cependant les glandes salivaires sont absentes ou bien rudimentaires chez les animaux aquatiques ([Sharpe 2010](#)). Chez l'Homme comme chez le rongeur il existe deux groupes de glandes salivaires (Figure 16) :

- Majeures : constituées de trois types : submandibulaires, sublinguales et parotides ; ce sont des glandes avec des long canaux excrétoires qui versent la salive dans la cavité buccale.
- Mineures : la salive se verse directement dans la cavité orale grâce à des petits canaux excrétoires.

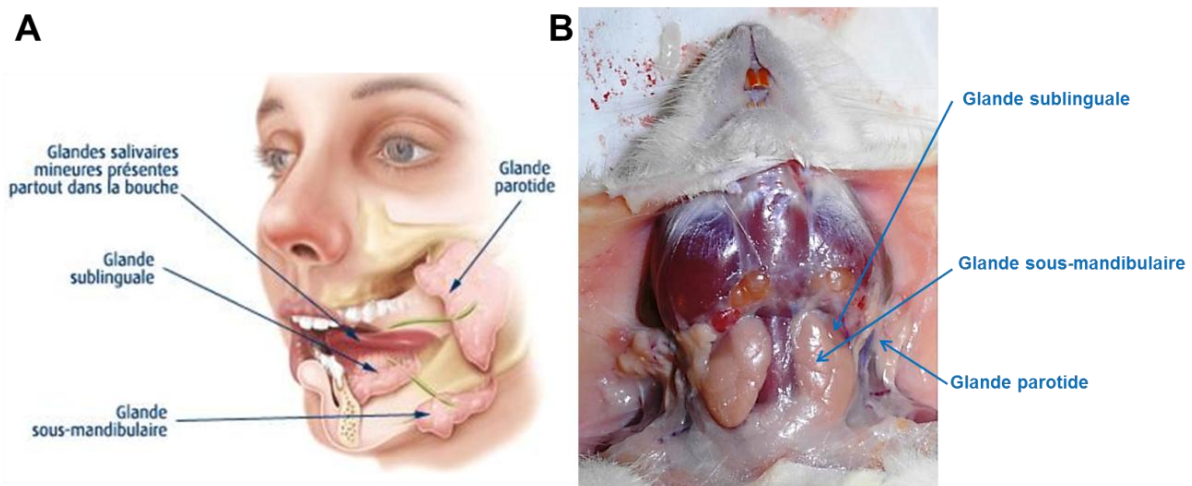


Figure 16 : Position des glandes salivaires chez l'Homme (A) et chez le rat (B).

2.5.2.1. Histologie des structures sécrétrices

Au niveau de la cavité orale les glandes salivaires apparaissent enfermées dans une capsule conjonctive fibreuse, elles sont constituées d'un parenchyme (structure glandulaire sécrétrice) et du stroma (cellules de soutien). L'unité sécrétrice du parenchyme lobulaire est l'adénomère (Figure 17). Il est constitué de cellules sécrétrices dites « acini creux » dont la cavité (le lumen) se prolonge par un canal intercalaire qui va se connecter à la cavité buccale.

On distingue 3 classes de structures sécrétrices selon le type de produit sécrété, la structure sécrétrice est subdivisée en trois classes: muqueuse, séreuse et séro-muqueuse. Les sécrétions muqueuses sont riches en complexes carbohydratés tels que les glycoprotéines et sont visqueuses. Les sécrétions séreuses sont riches en protéines enzymatiques et sont liquides. Enfin les sécrétions séro-muqueuses sont constituées d'une combinaison des deux (muqueuse et séreuse) ([Sharpe 2010](#)). Les cellules séreuses ont une forme pyramidale, avec un noyau central rond ou ovale dans le tiers basal et des granules (zymogène) au niveau apical qui apparaissent sombre avec une coloration à l'hématoxyline (Figure 17A). Les cellules séreuses apparaissent sous forme cylindrique et forment des tubules, avec des noyaux aplatis au niveau du pôle basal, et le pôle apical contient des grains de mucigènes dont l'excrétion conduit à la formation de mucine salivaire ([Sharpe 2010](#)).

Les portions sécrétrices des glandes salivaires sont entourées par des cellules myoépithéliales, qui sont similaires en tous points aux cellules musculaires lisses. Contractiles, elles joueraient un rôle dans l'expulsion des produits de sécrétion (Figure 17.A).

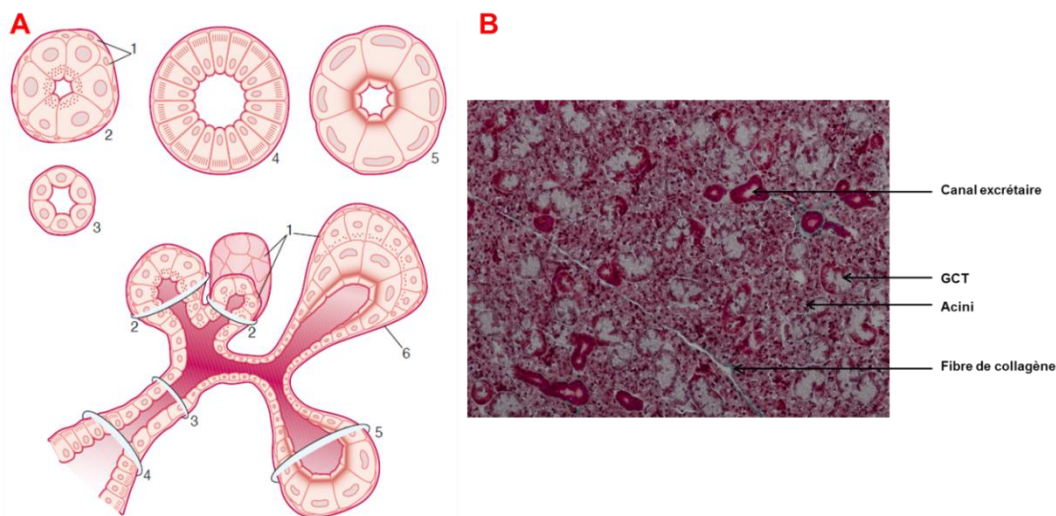


Figure 17: Histologie des glandes salivaires : **A)** Structures des différents types d'acini et canaux glandulaires. 1. Cellules myoépithéliales ; 2. Acinus séreux ; 3. Canal intercalaire ; 4. Canal strié ; 5. Acinus muqueux ; 6. Acinus mixte séromuqueux ([Devoize & Dallel 2010](#)). **B)** Coupe histologique de glande salivaire submandibulaire (grossissement x10 Coloration Trichrome de Masson).

Chez l'homme comme chez le rat, la glande submandibulaire apparaît comme une glande mixte c'est-à-dire qu'elle contient à la fois des acini muqueux et séreux, avec toutefois une prédominance séreuse et quelques acini séromuqueux. Toutefois il existe des différences chez le rat où les glandes contiennent deux types de compartiments sécrétoires qui possédant deux modes

de sécrétions différents. On distingue les acini et les Tubules Contournés Granulaires (GCT). Les acini constituent la partie prédominante et sont de type séromuqueux; entre eux s'intercalent quelques cellules muqueuses. Le GCT est un type de canal sécrétoire spécialisé : il se situe entre le canal intercalaire et le canal strié et caractérise les glandes submandibulaires des rongeurs (Figure 17.B).

2.5.2.2. Développement des glandes salivaires

Chez le rat le développement embryonnaire des trois glandes salivaires majeures ne commence pas en même temps, la différenciation de la submandibulaire débute en premier, suivi par la sublinguale un jour après, et enfin la parotide. Le premier signe morphologique dans l'embryogénèse de la submandibulaire est observé aux alentours du (Gestational Day) GD 11,5 ; et celui de la sublinguale est au GD 12,5. La formation du bourgeon initial est observée au GD 13,5 dans la submandibulaire, et un jour après dans la sublinguale. L'apparition d'une structure canaliculaire apparaît au GD 15,5, enfin la ramification des bourgeons et le bourgeon terminal au GD 18,5 (Figure 18). Dans les semaines qui suivent la mise-bas, les glandes salivaires continuent à se développer, les bourgeons terminaux immatures se structurent et on voit apparaître les GCT vers la puberté ([Melnick & Jaskoll 2000](#)). Les glandes salivaires sont donc comme la glande mammaire, un organe qui arrive à maturation avec la puberté.

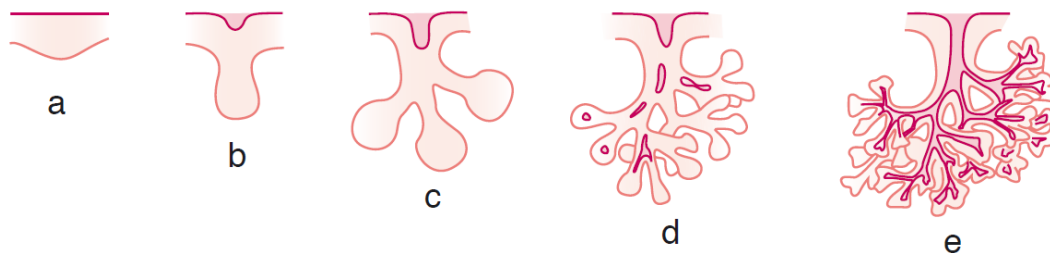


Figure 18: Stade de développement prénatal des glandes salivaires principales. A. Stade de prébourgeon ; b. stade de bourgeon initial ; c. stade de bourgeon pseudoglandulaire ; d. stade de bourgeon canaliculaire ; e. stade de bourgeon terminal ([Devoize & Dallel 2010](#)).

2.5.2.3. La production salivaire

Bien que la production de la salive soit en continu, le flux varie en fonction du temps suivant un rythme circadien, avec un pic l'après-midi et une sécrétion proche de zéro pendant le sommeil

([Dawes 1974](#)). La salivation est sous contrôle du système nerveux autonome (sympathique et parasympathique). L'activation du parasympathique qui est la plus active durant la journée et au moment des repas, conduit à la production d'un volume important de salive séreuse contenant donc de faibles quantités de protéines. Cette production a principalement lieu au niveau des cellules séreuses, sous l'action d'un neurotransmetteur « l'acétylcholine ». Cependant l'activation du système nerveux sympathique sous l'action de la noradrénaline provoque une sécrétion moins volumineuse, mais très riche en protéines, traduisant plutôt une sécrétion de type muqueuse ou séromuqueuse.

Dans le même sens, les deux systèmes (sympathique et parasympathique) peuvent affecter la sécrétion salivaire d'une façon indirecte en agissant sur l'énervation du système d'irrigation qui achemine le sang vers les glandes ([Takai et al 1998](#)). La salive contient de nombreux composés :

- Des *électrolites*, (Na^+ , K^+ , HCO^- et NaCl) qui maintiennent l'équilibre ionique des cellules dans les glandes salivaires, et déclenchent le potentiel d'action en réponse à un stimulus donné (salé, sucré, amer et acide).
- Des *glycoprotéines*, comprenant des *immunoglobulines*, qui protègent la cavité buccale et des *mucines*, qui jouent un rôle de lubrifiant, et qui sont impliquées dans les effets antibactériens grâce à leur capacité à fixer les toxines bactériennes.
- Des *protéines*, dont certaines sont apportées par le plasma (protéines extrinsèques) tandis que d'autres sont produites par les glandes salivaires (protéines intrinsèques). Selon plusieurs études protéomiques, la salive en contiendrait plus de 700.
- Des *facteurs de croissance* et des *hormones*, qui comme les protéines, peuvent avoir des origines plasmatiques ou salivaires.

La glande salivaire est généralement considérée comme une glande exocrine, cependant plusieurs études montrent l'existence des mouvements des molécules de la glande vers le sang et vice versa. Il existe environ 2,5 g/L de protéines dans la salive émise à faible débit et la concentration en protéines croît en général avec le débit salivaire. Ces protéines sont classées, en fonction de leur origine, en protéines extrinsèques (provenant du sérum) et protéines intrinsèques synthétisées par les glandes elles-mêmes.

2.5.2.4. *Les protéines salivaires*

2.5.2.4.1. **Protéines salivaires extrinsèques**

Le taux de protéines extrinsèques (sériques) passant dans la salive est assez élevé (20% des protéines totales), et leur concentration décroît lorsque le débit salivaire augmente. Ce sont, par ordre de concentration décroissant, des IgA, des IgG et des IgM, auxquelles s'ajoutent des sérums-albumine (1 à 10% des protéines totales) et des alpha- et β -globulines ([Sharpe 2010](#)).

Les IgA sont les mieux représentées dans la salive ; elles diffèrent des IgA plasmatiques par leur poids moléculaire qui est supérieur. Elles pénètrent dans les glandes à partir du plasma, mais peuvent être synthétisées par des cellules plasmatiques situées à l'intérieur des glandes ou par des cellules muqueuses salivaires. Une protéine additionnelle synthétisée à l'intérieur des glandes est adjointe à deux molécules d'IgA et l'ensemble est sécrété sous cette forme dans la salive. Les fortes concentrations d'IgA dans la salive semblent indiquer qu'elles ont un rôle d'effecteur immunologique important au sein du système immunitaire sécrétoire de la cavité buccale ([Sharpe 2010](#)).

2.5.2.4.2. **Protéines salivaires intrinsèques**

- **les glycoprotéines**

Les glandes salivaires fabriquent deux types de glycoprotéines : des immunoglobulines et des muco-protéines encore appelées mucines. Les principaux acides aminés rencontrés dans ces protéines sont la proline, la glycine et l'acide glutamique, tandis que les hydrates de carbone sont des sucres le galactose, le mannose, le fructose.

Les immunoglobulines : Elles sont constituées de 25% de protéines et de 75% de polysaccharides et sont sécrétées en particulier par les glandes accessoires labiales, mais pas par les parotides. Elles ont un pouvoir antigénique, faisant partie intégrante des membranes cellulaires des hématies. Ces glycoprotéines possèdent deux sites antigéniques, A et B, qui diffèrent par la composition de leurs chaînes glycosylées terminales. Environ 80% de la population possède dans les sécrétions les antigènes correspondant à leur groupe sanguin (A, B, AB) ou la glycoprotéine H (groupe O) qui ne possède pas de chaînes glycosylées terminales.

Les mucines : Elles sont constituées de 75% de protéines et de 25% d'hydrates de carbone et sont sécrétées par les cellules muqueuses des glandes submandibulaires, sublinguales et des glandes accessoires. Ces protéines généralement électro-négatives entretiennent des interactions avec les charges positives (Ca^{++}) de la surface de l'émail. Elles contribuent à la formation de la pellicule acquise exogène. Leur production qualitative et quantitative diffère suivant le type de glande considérée. En raison de leur forte teneur en glucides (> 80%), leurs grandes dimensions (> 1 micron), et de leur forme, leur sécrétion à de faibles concentrations forme des gels viscoélastiques hydrophiles qui lubrifient l'épithélium. Ce sont elles aussi qui donnent à la salive son pouvoir lubrificateur.

- Les enzymes salivaires

L'Alpha-amylase (ou ptyaline) : elle représente près de 30% des protéines salivaires et provient en majorité des parotides, les sous-mandibulaires n'en produisent que 20% et les sublinguales comme les glandes accessoires en produisent très peu. La concentration d'amylase salivaire augmente avec le débit salivaire. L'activité enzymatique de l'amylase, hydrolysant en principe l'amidon, ne semble pas jouer un rôle important dans les mécanismes digestifs, puisqu'elle est inhibée au-dessous de pH 4. Cependant, la digestion enzymatique peut se poursuivre au centre du bol ingéré, qui sera à l'abri des sucs digestifs acides. Chez des rats anesthésiés, une ligature des canaux excréteurs de la parotide, suivie d'une injection de la pilocarpine ou isoprenaline (parasymphomimétique entraînant l'hypersécrétion salivaire) provoque une augmentation dans l'amylase sérique, ce qui suggère que la voie probable soit une rétrodiffusion de la salive via des jonctions membranaires cassés ([Ikeno et al 1988](#)). Par contre, une parotidectomie totale pratiquée chez des rats à jeûn (la parotide est l'unique glande salivaire source de l'amylase chez le rat) puis nourris, provoque une augmentation de l'amylase sérique, qui peut être provient du foie ([Proctor et al 1991](#)).

Les kallikréines et les lipocalines : outre les protéines impliquées dans l'initiation du processus digestif, les glandes submandibulaires produisent une diversité de polypeptides qui ont une action locale ou systémique. Les plus étudiées sont les lipocalines et les kallikréines. Les glandes submandibulaires sécrètent de façon massive des lipocalines, protéines d'environ 20,5 à 24 kDa qui se caractérisent par leur aptitude à transporter de petites molécules hydrophobes comme les rétinoïdes, acides biliaires, les lipides, les molécules odorantes et phéromones ([Thavathiru et al 1999](#)). Les glandes mineures de Von Ebner's (VEGs) de la langue expriment une

lipocaline qui avec les mucines assurent un microenvironnement adéquat autour des récepteurs gustatifs ([Blaker et al 1993](#)). Les glandes salivaires exercent aussi une influence sur tout l'organisme via la sécrétion d'autres protéines comme les kallikréines et les furines maturases, deux types d'enzymes impliqués dans la conversion de précurseurs inactifs en molécules biologiquement actives. Ainsi, certaines kallikréines convertissent le pro-EGF en EGF au niveau de la glande submandibulaire de rat ([Rougeot et al 2000](#)).

Le lysozyme : c'est une enzyme qui attaque la paroi cellulaire de certaines bactéries (Gram⁺), elle est retrouvée dans la plupart des sécrétions de l'organisme (salivaires, lacrymales, nasales, bronchiques). Dans la salive, elle représente près de 10% des protéines totales, et la salive sous-mandibulaire en contient plus que la salive parotidienne.

Les protéines riches en proline (PRP) : Ce sont des protéines caractérisées par une réplétion d'un acide aminé la proline (20 à 45 %), qui leur confère le caractère de revêtement protecteur. Chez les rongeurs, elles sont abondamment produites par les acini séreux de la parotide et de la submandibulaire ([Mehansho & Carlson 1983](#)).

Les cystatines : Ce sont des inhibiteurs de la cystéine protéase, un précurseur de la biosynthèse de la kinine. Chez le rat, elles sont localisées au niveau des GCT de la glande submandibulaire mais leur rôle n'est pas encore connu ([Kousvelari & Tabak 1991](#)).

Autres enzymes : on trouve dans la salive de nombreuses autres enzymes, capables de dégrader aussi bien les hydrates de carbone, les graisses, ou les protéines, comme des phosphatases acides, des cholinestérases, des ribonucléases, des lipases, des peroxydases. Ces dernières sont douées de pouvoir antibactérien. Ces enzymes salivaires peuvent être produites par les glandes salivaires elles-mêmes, mais proviennent également des leucocytes et des bactéries lysées. L'anhydrase carbonique encore appelée gustine, rencontrée dans la salive provient essentiellement des sécrétions des principales glandes salivaires, et pourrait également participer à la régulation du pH salivaire.

2.5.2.4.3. Les facteurs de croissances

Les facteurs de croissances sont sécrétés par les GCTs chez le rat.

Le Facteur de croissance épidermique (EGF) : pendant longtemps le rôle des facteurs de croissance synthétisés au niveau des glandes salivaires a largement été étudié surtout en oncologie. C'est une hormone protéique aux multiples actions, principalement trophiques ([Byyny et al 1972](#)). L'EGF est bio-synthétisé sous forme d'un précurseur au niveau des tubules granulaires (GCT) chez les rongeurs. Il a une taille de 160 kDa et se transforme en peptide actif de 6 kDa dans la salive. Une étude a montré qu'une ligature des canaux excréteurs de la salive accompagnée d'une hépatectomie chez des rats provoque l'inhibition dans la régénération hépatique qui est corrigée par une injection de l'EGF (Epidermal Growth Factor) ([Jones et al 1995](#)). Une autre étude montre qu'une ablation des glandes salivaires entraînait une altération des bourgeons gustatifs chez le rat, et que celle-ci pourrait être reversée par perfusion d'EGF ([Morris-Wiman et al 2000](#)).

Le Facteur de croissance des fibroblastes (FGF) : c'est une protéine qui active la migration et la multiplication de cellules cible. En 2005, Thula et al, montrent qu'un traitement des cellules d'une parotide irradiée avec le FGF modifie l'apoptose ce qui suggère un rôle radio-protecteur local au niveau de la cavité orale ([Thula et al 2005](#)).

Le Facteur de croissance nerveuse (NGF) : a été identifié en 1960 dans la glande submandibulaire. C'est un facteur de croissance polypeptidique qui possède un effet puissant sur la croissance et la différenciation du système nerveux sympathique. Le NGF est lui aussi plus élevé chez le rongeur mâle que chez la femelle faisant suspecter une régulation par les androgènes. De même, l'hormone thyroïdienne T4 augmenterait sa sécrétion ([Arancibia & Assenmacher 1985](#)).

Le Facteur de croissance transformant (TGF α) : c'est un polypeptide de 50 acides aminés, qui a la même structure et la même activité biologique que l'EGF. Une étude de Mogi et al met en évidence l'évolution postnatale du TGF α et de l'EGF et montre que la concentration du TGF α est très importante à la naissance et diminue progressivement avec l'âge, ce qui lui confère un rôle important dans la morphogenèse de la glande ([Mogi et al 1995](#)).

2.5.2.4.4. Les hormones

Les hormones sont nombreuses et peuvent provenir, soit du sérum, soit des propriétés endocrines des glandes salivaires.

Le Glucagon-like : en 1977 Lawrence et al, montrent que des homogénats de glande salivaire (submandibulaire) de rat, souris, lapin et homme contiennent du glucagon-like (hormone sécrétée par le pancréas et qui joue un rôle important dans la régulation du métabolisme glucidique). Une partie du glucagon sérique chez des rats pancréatectomisés semble provenir de la submandibulaire ([Lawrence et al 1977](#)). Dans le même sens, le glucagon retrouvé dans la salive peut moduler la perception du goût sucré au niveau du bourgeon du goût, car une co-expression de récepteurs au glucagon (GlucR) et du goût (T1R3) impliqué dans la perception du sucré et l'umami a été mise en évidence ([Sharpe 2010](#)). Chez l'Homme les glandes salivaires (submandibulaire et parotide) expriment le glucagon ([De Matteis et al 2002](#)). Aussi, l'utilisation des souris knock-out pour le récepteur du glucagon montre une diminution dans la perception du sucré suite à des tests de préférence sur une courte durée (afin de s'affranchir des effets post-ingestifs) ce qui suggère le rôle du glucagon dans la modulation du goût sucré au niveau de la cavité orale ([Elson et al 2010](#)).

La Leptine : Kawai et al, montrent que la leptine peut également se retrouver dans la salive et moduler la perception au goût sucré au niveau des bourgeons du goût ([Kawai et al 2000](#)). Chez l'Homme les glandes salivaires (submandibulaire et parotide) expriment la leptine et son récepteur ([De Matteis et al 2002](#)). L'étude de Groschl et al, montrent que chez l'Homme les trois types de glandes salivaires (submandibulaire, sublinguale et la parotide) produisent la leptine qui est par la suite sécrétée dans la salive. La variation de pH montre que la leptine est stable jusqu'à pH=3,5, les auteurs suggèrent une possibilité d'interaction avec les récepteurs à la leptine au niveau gastrique (qui est aussi acide) afin de moduler la prise alimentaire en amont ([Groschl et al 2001](#)).

La Ghréline : la même équipe et toujours avec la même méthodologie de travail montre que les glandes salivaires produisent la « Ghréline » ; hormone stimulatrice de la prise alimentaire, au niveau de la cavité, elle semble jouer un rôle protecteur identique à celui facteurs de croissance ([Groschl et al 2005](#)).

L'Adiponectine : chez des sujets sains, Toda et al, montrent une corrélation entre l'adiponectine sérique et l'adiponectine salivaire, mais la question qui reste en suspens est de savoir si l'adiponectine salivaire est synthétisée ou non au niveau de la glande salivaire ([Toda et al 2007](#)).

Le PYY₃₋₃₆: récemment une étude a montré la présence du peptide PYY₃₋₃₆ dans la salive de la souris et de l'homme. Ce peptide est synthétisé au niveau de l'intestin et il joue un rôle important dans régulation de la prise alimentaire en stimulant la satiété, ce qui suggère que le PYY₃₋₃₆ salivaire peut moduler la prise alimentaire ([Acosta et al 2011](#)).

Les hormones sexuelles: les hormones stéroïdiennes entrent dans les glandes salivaires par diffusion passive et par la suite seront excrétées dans la salive. Il existe aussi une production locale d'hormones, en particulier des corticoïdes et des androgènes. Par ailleurs, il existe une interaction entre les testicules et les glandes salivaires : la répartition ainsi que la production des AR (Androgen Receptor) au niveau de la submandibulaire est affectée par la castration, ce qui pourra par la suite entraîner des effets sur l'activité sécrétoire de la glande salivaire ([Li et al 2005](#)). La testostérone peut augmenter la concentration d'EGF. Cependant, des femelles traitées avec de la testostérone présentent une augmentation de l'ARNm de la pre-pro EGF au niveau des glandes salivaires au bout du 3^{ème} jour. Une concentration qui continue à augmenter pour atteindre un niveau proche de celui des mâles au bout de deux semaines. Cela confirme le rôle des androgènes dans la synthèse de l'EGF ([Sheflin et al 1996](#)).

2.5.2.4.5. Dimorphisme de la glande submandibulaire

Les glandes submandibulaires sont celles qui sont le plus décrites comme ayant un dimorphisme sexuel évident. Ce dimorphisme sexuel a été analysé depuis les années 40 chez les souris ([Bueker et al 1965](#)) ([Jayasinghe et al 1990](#)) ([Junqueira et al 1948](#)). Ce dimorphisme se traduit par une différence dans la taille des glandes salivaires observée entre les mâles et les femelles ([Inoue et al 2006](#)), mais également par une différence dans l'expression des gènes ([Treister et al 2005](#)).

Chez l'homme aussi il existe une différence dans l'expression des gènes au niveau de la parotide, et cette différence s'exprime non seulement entre les sexes (homme/femme) mais aussi intra sexe en fonction de l'âge ([Srivastava et al 2008](#)).

Chez les rongeurs, le dimorphisme apparaît aussi clairement sur des paramètres morphologiques : ainsi la structure des GCT apparaît plus large et plus développée chez les rats mâles que chez les femelles. Les glandes parotides et sublinguales ne présentent pas beaucoup de différence structurale d'une espèce à une autre et le dimorphisme sexuel n'est pas bien décrit dans la littérature.

Ce dimorphisme sexuel traduit bien l'implication des hormones stéroïdiennes dans la morphogénèse des glandes salivaires. Cette implication dans le développement et le contrôle des sécrétions salivaires font de ces organes des cibles potentielles de perturbateurs endocriniens. Compte tenu de leur rôle important non seulement dans la perception des saveurs, elles sont donc un des éléments impliqués dans les processus du comportement alimentaire.

CHAPITRE 4: LES XENO-HORMONES

Ce sont des molécules exogènes très hétérogènes; elles peuvent être naturelles (phyto-œstrogènes, mycotoxines...) ou de synthèse (polluants atmosphériques, pesticides, détergents, dérivés de plastiques, vernis, hormones de synthèse, médicaments, produits vétérinaires...etc.). Ces molécules ont des propriétés hormonales bien distinctes qui peuvent être œstrogéniques (génisteine, BPA), anti-androgéniques (vinclozoline). L'homme est exposé quotidiennement de façon directe ou indirecte, par voie orale ou environnementale. Ces molécules sont considérées comme des perturbateurs endocriniens.

1. Qu'est-ce qu'un perturbateur endocrinien ?

En 1999, la Commission Européenne ([C.C.E 1999](#)) a proposé la définition suivante : "*un perturbateur endocrinien (PE) est une substance ou un mélange exogène, altérant les fonctions du système endocrinien et induisant de ce fait des effets néfastes sur la santé d'un organisme intact, de ses descendants ou de sous-populations*". Cette définition a été complétée par les deux définitions suivantes :

*Un perturbateur endocrinien **potentiel** est une substance ou un mélange exogène possédant des propriétés susceptibles d'induire une perturbation endocrinienne dans un organisme intact, chez ses descendants ou dans une population.*

*Un perturbateur endocrinien **avéré** est une substance ou un mélange exogène altérant les fonctions du système endocrinien et induisant donc des effets nocifs sur la santé d'un organisme intact, de ses descendants ou dans une population.*

L'interaction entre PE et hormones endogènes peut se faire sur plusieurs niveaux : synthèse, transport, action et excréation, en passant par leur liaison et leur métabolisme. Les PE ont la capacité de se lier aux récepteurs hormonaux nucléaires tels que les récepteurs aux œstrogènes (ER), androgènes (AR), progestérone (PR), thyroïdiennes (TR), et de l'acide rétinoïque (RAR). Ils lient aussi les récepteurs hormonaux stéroïdiens membranaires : œstrogènes (ER), des récepteurs non stéroïdiens (récepteurs de neurotransmetteurs : sérotonine, dopamine), les récepteurs orphelins (Aryl hydrocarbon, AhR). Les PE peuvent également agir sur l'activité de certaines enzymes du métabolisme et/ou de la biosynthèse des stéroïdes ([Diamanti-Kandarakis et al 2009](#)).

Dans la dernière décennie, la liste des molécules naturelles ou de synthèse qui possèdent une activité de perturbation endocrinienne a augmenté. En 2002, la commission européenne publie un rapport dans lequel est répertorié 435 perturbateurs endocriniens ([C.E. 2002](#)). Aujourd'hui le nombre des molécules répertoriées sur la base TEDX (The Endocrine Disruption Exchange) est de 870 molécules ([Colborn](#)).

2. Effets des perturbateurs endocriniens

Chez l'homme, les observations cliniques et les études épidémiologiques convergent vers une implication des PE qui deviennent une préoccupation de santé publique, et l'exemple le plus connu est celui du Diethylstilbestrol (DES) :

2.1. Diethylstilbestrol : un perturbateur endocrinien modèle

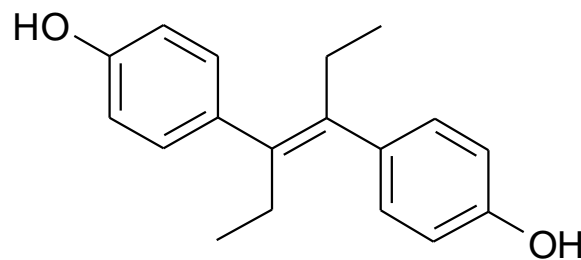


Figure 19: Structure chimique du diethylstilbestrol

C'est un xéno-œstrogène de synthèse, commercialisé depuis 1940 pendant une trentaine d'année (jusqu'à 1971 aux Etats-Unis et 1977 en France) comme un traitement aux femmes pendant la grossesse pour prévenir les fausses couches, les risques de prématurité, et traiter les hémorragies gravidiques (Figure 19). Le Diethylstilbestrol a été utilisé également comme une hormone de croissance en élevage jusqu'à 1984 en France. En 1971, une première étude montre une possible corrélation entre le traitement avec du DES, et l'apparition des tumeurs malignes de l'épithélium glandulaire vaginal (adénocarcinome) chez les femmes exposées *in utero*. Cette étude n'était pas concluante car le pourcentage des filles qui présentaient ces symptômes était très faible (<0,1%) ([Herbst et al 1971](#)).

Une autre étude épidémiologique a eu pour but d'essayer d'identifier les effets du DES sur les mères exposées pendant leur gestation, avec la participation de 2680 femmes exposées et 2566 femmes non exposées au DES. Cette étude a pu montrer une différence significative dans

l'apparition des cancers du sein dans le groupe exposé avec un risque relatif (RR) de 1,4 (c'est une mesure qui permet de calculer le risque de survenue d'un événement) ([Greenberg et al 1984](#)). D'autres types de cancers ont également été observés chez des femmes exposées au DES pendant leur gestation tels que le cancer de l'ovaire et du col de l'utérus, avec des facteurs de risques de 1,4 et 2,83 respectivement ([Hadjimichael et al 1984](#)). Dans le même sens, chez l'homme il a été montré qu'une exposition *in utero* au DES provoque une apparition des tumeurs de la prostate et d'autres anomalies de l'appareil génital masculin tel que l'hypospadias. Le DES semble avoir des effets d'ordre neurologique, qui peuvent se traduire par des dépressions nerveuses ou des troubles du comportement alimentaire tel que l'anorexie.

Récemment Kebir et Krebs ont publié une revue dans laquelle ils discutent les corrélations entre l'exposition au DES et l'apparition des troubles psychiques type : dépression, anxiété, perte de poids et anorexie. Cependant les études dans cette revue sont très controversées ([Kebir & Krebs 2012](#)), mais il faut imaginer une possible atteinte au niveau cérébral qui expliquera ces troubles psychiques, qui peuvent par conséquent entraîner d'autres physiopathologies types troubles métaboliques.

Mais les études récentes montrent que les effets d'une exposition au DES peuvent s'étendre sur plusieurs générations. L'étude menée par l'équipe du professeur Sultan (CHU Montpellier) montre qu'en France les enfants nés des mères exposées *in utero* au DES présentent 3,5% de malformations au niveau de l'appareil génital mâle (Hypospadias) et 28,4% de malformations au niveau de l'appareil génital femelle (anomalies de Müller), ces mêmes femmes donnent naissance à des petits fils avec 8,2% d'Hypospadias ([Kalfa et al 2011](#)). Une autre étude montre l'existence d'une corrélation entre une exposition au DES et l'apparition des anomalies à la naissance (génito-urinaires, squelettiques, musculaires et neurologiques) chez les petits-fils (3^{ème} génération) ([Titus-Ernstoff et al 2010](#)).

Les résultats observés chez l'homme sont confirmés sur le modèle animal. Newbold et al, montrent qu'une exposition au DES entraîne une apparition de lésions au niveau testiculaire et des tumeurs au niveau de l'appareil génital mâle, des effets qui sont transmissibles jusqu'à la troisième génération ([Newbold et al 2000](#)). Dans le même sens, les souris femelles exposées *in utero* au DES développent des tumeurs au niveau de l'appareil génital ce qui est transmissible à la génération suivante (F2). Cependant une diminution de la fertilité dans la F1 disparaît dans la F2 ([Newbold et al 1998](#)).

3. Mode d'action des perturbateurs endocriniens

Le mode d'action des PE passe par une activation illégitime des récepteurs aux stéroïdes mais aussi via des voies non génomiques. Les pesticides organochlorés (endosulfan, toxaphène, o,p'DDT, dieldrine...etc.) interagissent directement avec le récepteur de l'œstradiol, et déplacent le 17-β œstradiol de son récepteur. Le complexe pesticide-récepteur de l'œstradiol peut donc trans-activer des promoteurs contenant ERE (*Estrogen Reponse Element*), et activer ainsi de façon illégitime des gènes sensibles à l'œstradiol. D'autres composés comme le o,p'DDT, son métabolite le p,p'DDE ou la Vinclozoline, ont un effet anti-androgénique. Ils se lient au récepteur des androgènes, et bloquent sa fonction de manière identique à celle d'un antagoniste comme l'acétate de cyprotérone. Ces composés induisent la liaison du récepteur des androgènes sur l'ARE (*Androgen Reponse Element*) et activent la transcription des promoteurs sensibles aux androgènes ([Massaad & Barouki 1999](#)).

Les perturbateurs endocriniens peuvent agir également sur d'autres cibles telles que les récepteurs orphelins. Ce sont des récepteurs qui appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires, ils peuvent agir sur le métabolisme des hormones stéroïdiennes, par l'induction des cytochromes P450, ou en agissant sur le métabolisme du cholestérol (précurseurs des hormones stéroïdiennes) ([Tabb & Blumberg 2006](#)). Le Trans-nonachlore (un composant du pesticide interdit Chlordane) considéré comme un perturbateur endocrinien, inhibe l'activation du récepteur orphelin CAR (*Constitutive Androstone Receptor*) chez la souris ([Moore et al 2002](#)).

Chez le rat le DDT augmente l'activité transcriptionnelle du CAR et PXR (Pregnane X Receptor) ([Wyde et al 2003](#)). Il peut également agir sur le système neuroendocrinien via le récepteur AhR et le récepteur AMPA du glutamate ([Rasier et al 2008](#)).

Dans la littérature on sait également que le PXR et CAR sont fortement exprimés au niveau hépatique et intestinal, où ils induisent les enzymes de métabolisme [cytochromes P450 (ex : CYP3A)], les enzymes de conjugaison (ex : UGT1A1), des transporteurs [ex : MultiDrug Resistance 1 (MDR1), et Organic Anion-Transporting Peptide 2 (OATP2)]. Le méthoxychlor : un insecticide organochloré, qui possède une structure analogue avec le DDT mais une demi-vie dans l'environnement relativement faible, peut activer le PXR et CAR et induire les ARNm CYP3A (enzyme du métabolisme) dans le foie du rat mâle, et par conséquent produire des métabolites qui peuvent être aussi réactifs.

A noté également que le CYP3A est impliqué dans le métabolisme des stéroïdes et est active par le PCN (précurseur de la progestérone).

La fixation du complexe (hormone-récepteur) sur la région HRE (*Hormone Response Element*) de l'ADN induit ou non la transcription du gène cible. Le recrutement des co-régulateurs et de facteurs de transcription sur les régions promotrices initie l'activation de l'ARN polymérase II et la synthèse de nouveaux ARNm. Une altération au niveau des co-activateurs et des facteurs de transcription peut alors moduler la transcription des gènes. Lonard et al, montrent qu'une augmentation du niveau de co-activateur steady-state induit une augmentation de la transcription du récepteurs ER α en présence des modulateurs sélectifs des récepteurs des œstrogènes (4-Hydroxytamoxifen et le Raloxifène) ([Lonard et al 2004](#)). Chez la souris, et au niveau de l'utérus le BPA (0,3 mg/kg en i.p tous les 24 h/5 jours) active la transcription du co-activateur TRAP220 (*Thyroid Hormone Receptor Activator Protein 220*) ce qui augmente l'expression du ER β , et suggère que le BPA peut également perturber le système endocrinien via une action indirecte, en agissant sur le niveau du co-activateur ([Inoshita et al 2003](#)).

La dégradation des récepteurs hormonaux est finement régulée grâce à des protéines spécifiques de la protéolyse dites : les protéasomes, après ajout d'ubiquitine. Ce phénomène permet d'éviter la sur-stimulation des cellules. L'expression des récepteurs aux hormones nucléaires stéroïdiennes est régulée par cette machinerie de dégradation ([Syvala et al 1998](#)). Les PE peuvent agir au niveau du système de dégradation des récepteurs hormonaux, ce qui se traduit par des perturbations au niveau du système endocrinien (durée de réponse cellulaire aux hormones endogènes, suite à un dysfonctionnement dans la dégradation des récepteurs par exemple).

Le degré de méthylation de l'ADN est considéré comme une autre voie par laquelle les PE peuvent agir. Une exposition à la Vinclozoline et au méthoxychlor diminue la spermatogenèse et augmente l'incidence d'infertilité chez des rats Fisher jusqu'à la quatrième génération. Les effets sont corrélés avec une altération dans la méthylation de l'ADN ([Anway et al 2005](#)).

Un autre mode d'action des PE est leur aptitude à activer l'expression du PPAR γ et du RXRs (Retinoic acid X Receptors) au niveau adipocytaire. Le tributylétain (TBT) est un perturbateur endocrinien qui peut affecter l'adipogenèse via une activation du PPAR γ et du RXRs ([Kanayama et al 2005](#)).

L'étude de Pascal Phrakonkham et al, sur les cellules 3T3-L1 montre qu'un traitement précoce avec des xéno-œstrogènes (BPA, génistéine et apigénine) peut augmenter l'expression des gènes de différenciation ainsi que l'activité endocrine de l'adipocyte (synthèse de leptine), sans modification du niveau d'expression des récepteurs aux œstrogènes ([Phrakonkham et al 2008](#)). Dans le même sens, Anne Riu et al, montrent que les retardateurs de flamme, qui sont des analogues de BPA [Tetrabromobisphenol A (TBBPA)] et [Tetrachlorobisphenol A (TCBPA)] peuvent se lier au PPAR γ et induire l'adipogenèse dans les cellules 3T3-L1 ([Riu et al 2011](#)).

4. Perturbateurs endocriniens et toxicologie

Malgré le fait que nous soyons exposés tout le long de notre vie à des **mélanges** de contaminants et de polluants présents le plus souvent à **faibles doses**, les chercheurs continuent à faire des screening par molécule et souvent à des doses supérieures à la NOAEL, d'où le pourcentage de 95% des études en toxicologie y compris la perturbation endocrinienne qui traitent les effets d'une seule molécule ([Yang 1994](#)).

4.1. Notions de faibles doses

Durant la dernière décennie, des équipes de recherche se sont intéressées à la question des faibles doses « Low Doses », mais les définitions restent imprécises, cependant trois notions semblent se détacher :

- Les doses auxquelles l'Homme est exposé, ne correspondent pas toujours aux plus faibles doses utilisées dans les études toxicologiques.
- Les doses inférieures aux NOAEL, LOAEL : s'avèrent provoquer des effets en particulier lors d'exposition *in utero*
- Les doses administrées à l'animal à des concentrations sériques proches ou équivalentes de celles trouvées chez l'Homme (en tenant compte de la différence Homme-animal, métabolisme, biodisponibilité, excrétion, ...).

Welshons et al, définissent les faibles doses par « des concentrations proches de celles de nos hormones endogènes, et qui agissent dans la plupart du temps selon des courbes non-monotoniques » ([Welshons et al 2003](#)).

Un des exemples le plus étudié est le BPA pour lequel des effets délétères ont été enregistrés à des doses inférieures à la NOAEL, et comme la plupart des hormones, ce type de molécule échappe donc à la règle de « *La dose est proportionnelle aux effets* » et provoque des effets plus marqués à des très faibles doses ([Myers & Hessler 2007](#)). Un autre exemple est celui de phtalates ; un autre perturbateur endocrinien [Di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP)] connu pour son activité œstrogénique et anti-androgénique. Chez le rat Wistar une exposition par voie orale altère l'activité aromatasique au niveau cérébral (aromatase : enzyme responsable de la conversion de testostérone en œstradiol, joue un rôle important dans le dimorphisme au niveau cérébral). Cette altération varie en fonction de la concentration, ce qui signifie que l'action de la molécule suit une courbe non-monotonique ([Andrade et al 2006](#)).

Chez des souris ovariectomisées l'exposition au methylparabène (PE avec des propriétés antimicrobiennes, utilisé principalement comme conservateur dans les aliments, les cosmétiques...etc., à des doses inférieures à la NOAEL (1000 mg/kg PC/j) montre une altération dans l'organisation du tissu utérin ([Anton et al 2004](#)) ([Lemini et al 2004](#)).

Le Tributylétain (TBT), utilisé dans le traitement du bois, a des propriétés antifongiques et est considéré comme un perturbateur endocrinien, avec une capacité de liaison et d'activation des récepteurs (PPAR γ), (RXRs). Chez des souris l'exposition *in utero* à des doses inférieures à la NOAEL (0,19 mg/kg PC/j) ([EPA 1997](#)) montre que le TBT a un effet adipogénique, et stimule la différenciation des cellules multipotentes en adipocytes ([Kirchner et al 2010](#)).

4.2. Impact de la fenêtre d'exposition

Souvent l'organisme est plus sensible dans les premiers stades de développement, et une exposition aux PE, médicaments ou toute autre molécule durant ces stades, peut avoir des effets qui se manifestent à l'âge adulte. Durant la dernière décennie, plusieurs travaux suggèrent l'influence d'une malnutrition qui provoque un retard ou un dysfonctionnement dans le développement *in utero* sur l'apparition des maladies à l'âge adulte (hypothèse de « fœtal programming »). Barker et al, montrent une corrélation entre le poids corporel à la naissance et le développement des maladies à l'âge adulte telles que l'obésité, le syndrome métabolique et les cardiopathies ([Barker et al 2002](#)).

Cette hypothèse se généralise pour contenir d'autres molécules qui possèdent une activité agoniste ou antagoniste avec nos hormones endogènes telles que le BPA, les phtalates et le DES

([Heindel 2005](#)). Dans le modèle rongeur, l'exposition postnatale au DES entraîne un développement de la masse adipeuse à l'âge adulte ([Newbold et al 2008](#)).

L'exposition au P.E *in utero* durant les premières phases de développement semble avoir plus d'effet : cela est dû à une plasticité extrêmement importante durant cette période et développement non terminé de système immunitaire, une barrière hémato-encéphalique qui n'est pas bien différenciée et un système de détoxification hépatique qui n'a pas atteint sa maturité ([Diamanti-Kandarakis et al 2009](#)).

Un autre exemple est celui du BPA, l'exposition *in utero* à des doses de 25-250 ng/kg PC/j affecte le développement de la glande mammaire dès le stade embryonnaire, l'altération dans la morphogénèse porte sur la distribution des fibres de collagène qui affectera par la suite l'activité exocrine de la glande ([Vandenberg et al 2007](#)).

4.3. Effets trans-générationnels

Les effets néfastes des perturbateurs endocriniens peuvent s'étendre à plusieurs générations. Après une seule exposition gestationnelle, ces effets sont transmissibles via des mécanismes dits épigénétiques. Ce changement dans l'expression des gènes passe par deux voies :

La Méthylation de l'ADN : un groupe méthyle consiste en un atome de carbone et trois atomes d'hydrogène, les groupes méthyle sont attachés ou enlevés du support de l'ADN dans des endroits spécifiques, donc peuvent agir comme un interrupteur en éteignant certains gènes, ou en allumant certains autres gènes.

La Modification des histones : elle affecte indirectement l'ADN. Les histones sont des protéines qui assurent l'enroulement de l'ADN. En effet, au niveau de la chromatine, le cœur de nucléosome est constitué de deux histones de chaque classe (H2A, H2B, H3 et H4) qui s'associent en un octamère autour duquel s'enroule le double-brin d'ADN, ce qui le rend fermement enroulé dans les chromosomes à l'intérieur du noyau de la cellule. Cependant différents composés chimiques peuvent s'attacher aux extrémités des histones et modifier l'enroulement de l'ADN qui peut ainsi être serré ou lâche. Si l'enroulement est serré, un gène peut se trouver dissimulé à la machinerie qui fabrique la protéine de la cellule et se trouver par conséquent éteint. Si l'enroulement est plus lâche, un gène qui a été autrefois éteint peut alors être allumé.

Les perturbateurs endocriniens peuvent agir selon l'une ou l'autre voie pour transmettre des effets néfastes vers les générations suivantes. Anway et al montrent qu'une exposition à la vinclozoline peut s'étendre jusqu'à la 3^{ème} génération après une exposition *in utero* de la F1 ([Anway et al 2005](#)). La même équipe montre qu'une exposition à la vinclozoline affecte le transcriptome du cerveau dans deux régions : l'hippocampe et l'amygdale. Cela se traduit par une diminution dans le comportement d'anxiété chez les mâles et une augmentation du même comportement chez les femelles à la 3^{ème} génération ([Skinner et al 2008](#)).

4.4. Effets de mélanges

L'approche traditionnelle en toxicologie est d'étudier les effets d'une seule substance. Cependant depuis une dizaine d'années, quelques équipes se sont intéressées à la question des mélanges ou effet cocktail, car on peut trouver des substances ou des molécules considérées indépendamment comme non-toxiques, mais qui présentant des effets néfastes si elles agissent conjointement.

Kortenkamp et Altenburger ont traité le sujet pour essayer de trouver une manière qui peut prédire les effets des mélanges sur l'intégrité de l'organisme. Généralement, le calcul se fait sur la base d'addition, autrement dit l'effet d'un mélange de deux molécules est égal à la somme des effets de chaque molécule seule. Par exemple: en expérimentation animale une molécule X entraîne 35% d'hypospadias dans un lot, une molécule Y entraîne 35% d'hypospadias dans un autre lot, donc le mélange peut provoquer $35\% \times 2 = 70\%$ d'hypospadias ([Kortenkamp & Altenburger 1998](#)). Sauf que dans d'autres cas c'est plus compliqué, et la modélisation mathématique pour prédire les effets d'une exposition aux mélanges de perturbateurs endocriniens ne donne pas les effets réels ([Kortenkamp 2007](#)).

Autre point, la majorité des études qui traitent de la question des mélanges de PE utilise la même famille de molécules autrement dit le même type d'action (œstrogénique, androgénique ou thyroïdienne), et on peut dire que dans l'ensemble, la règle d'addition pour prédire les effets est plutôt efficace. Payne et al, ont étudié les effets de quatre molécules œstrogéniques o,p'-DDT, génistéine, 4-nonylphenol, et 4-n-octylphenol en mélange, en utilisant le test YES (*Yeast Estrogen Screen*), qui permet de détecter l'activation du récepteur ERs, grâce à une réaction colorimétrique. La comparaison entre les effets obtenus et les effets prévus par addition montre qu'il n'y a pas de différence, et suggère que les effets des xéno-œstrogènes présents dans un mélange peuvent être calculés à partir des courbes doses-réponses pour chaque composé seul ([Payne et al 2000](#)).

Mais les combinaisons des mélanges de classe différente rendent les choses plus complexes, au laboratoire la question est posée depuis 10 ans. Les doses utilisées sont des doses fortes vs doses faibles, et lors des premières études avec les mélanges binaires [génistéine (œstrogénique) + Vinclozoline (anti-androgénique)] les doses les plus faibles ont provoqué plus d'effets sur l'appareil de reproduction mâle ([Eustache et al 2009](#)), les mêmes doses ont été retenues pour une deuxième étude (1 mg génistéine et/ou 1 mg Vinclozoline) où des altérations dans le testicule de fœtus ont été enregistrés avec une perturbation dans la sécrétion hormonale (testostérone) ([Lehraiki et al 2011](#)). Chez les femelles la morphogénèse de l'appareil mammaire était affectée par ces mêmes mélanges aux faibles doses ([El Sheikh Saad et al 2011](#)). Cependant, il s'est avéré que ce n'est pas toujours l'appareil de reproduction qui est le plus sensible aux mélanges de PE car ces mêmes animaux présentaient des anomalies structurales des glandes salivaires submandibulaires associées à une modification dans l'expression génique des fonctions endocrines et exocrines ([Kouidhi et al 2012b](#)) (Cf chapitre : Glandes salivaires).

Ces travaux sont pour partie à l'origine de ce travail de thèse qui vise à compléter cette étude et à répondre à la question : *Quelles seront les effets d'une exposition **continue** (de la conception à l'âge adulte) à des très **faibles doses** à des **mélanges** de perturbateurs endocriniens ?*

5. Molécules retenues pour l'étude

Dans notre projet, trois molécules ont été retenues : la génistéine, la Vinclozoline et le bisphénol A. Ce sont des molécules modèles pour l'étude des effets des perturbateurs endocriniens: elles induisent des altérations de l'appareil génital mâle et de la glande mammaire, mais aussi des effets très distincts dans notre champ d'étude: développement, comportement alimentaire, perceptions gustatives et différenciation adipocytaire.

Du fait de leur affinité pour différentes isoformes des récepteurs hormonaux, mais également pour certaines de leurs protéines vectrices comme les hormones sexuelles (SHBG : *sex hormone binding globulin*), leur action est très large.

Des études récentes montrent que ces molécules ont la capacité de cibler des organes autres que ceux liés à la fonction de la reproduction, tels que les glandes salivaires, le cerveau et le tissu adipeux, trois cibles étroitement associées au comportement alimentaire ([Grun & Blumberg 2009](#)) ([Kouidhi et al 2012b](#)) ([Markey et al 2001](#)) ([Park et al 2009](#)) ([Ropero et al 2008](#)).

5.1. Le bisphénol A

5.1.1. Nature chimique et source d'exposition

Le bisphénol A [(2,2-(4,4'-Dihydroxydiphenyl) propane] (BPA, figure 20) est synthétisé pour la première fois en 1891, cette molécule est utilisée dans la synthèse de polycarbonates plastiques destinés à la confection d'emballages alimentaires (film, bouteilles de plastiques), de vernis interne, de boîtes de conserves, des produits à usages médicaux, mais également des dérivés halogénés utilisés comme des retardateurs de flamme ([Bonfeld-Jorgensen et al 2007](#)). Une polymérisation incomplète ou une mauvaise résistance à la stérilisation par autoclavage conduisent à une contamination des denrées alimentaires.

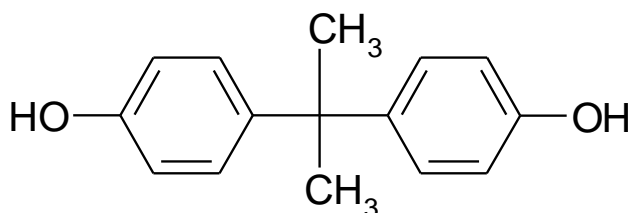


Figure 20: Structure chimique du bisphénol A

L'exposition humaine varie en fonction du régime alimentaire et de l'âge. Elle est estimée à moins de 1 µg/kg PC/j ([Kang et al 2006](#)). Selon l'EPA (U.S Environmental Protection Agency) la LOAEL (Lowest-Observed Adverse-Effect Level) est de 50 mg/kg PC/j ([vom Saal & Welshons 2006](#)). Cependant, plusieurs études montrent que le BPA à des faibles doses, a des effets imprévisibles, prouvant que le BPA échappe à la règle « c'est la dose qui fait le poison » ([Myers & Hessler 2007](#)).

Le BPA se lie aux deux types de récepteurs ER, avec une affinité 10 fois supérieure pour le ERβ, mais restant 1000 à 10000 inférieure à celle de l'œstradiol ([Takemura et al 2005](#)). Il peut également se lier à d'autres récepteurs d'une manière plus modérée, tels que les récepteurs aux androgènes (AR) et à la progestérone (PR) et aux corticoïdes ([Stroheker et al 2003b](#)).

Plusieurs études chez l'Homme montrent des corrélations entre les taux enregistrés dans le sang, et les urines, et l'apparition des pathologies à l'âge adulte (obésité, diabète, maladies cardio-

vasculaire) ([Lang et al 2008](#)) ([Melzer et al 2010](#)). D'autres études chez le rat viennent conforter les hypothèses des études épidémiologiques.

5.1.2. Effets endocriniens du bisphénol A

5.1.2.1. *Repro-toxicité*

In vivo les études menées chez les rongeurs montrent qu'une exposition *in utero* diminue la fertilité et la fécondité à une très faible dose de l'ordre du nanogramme (ng) administrée à l'animal via des mini-pompes ([Cabaton et al 2011](#)). De même, chez le mâle le même type d'exposition, à une faible dose de l'ordre du microgramme (µg) mais par voie orale affecte le nombre et la mobilité des spermatozoïdes, qui s'associe à une diminution dans le profil d'expression des récepteurs aux stéroïdes ([Salian et al 2009b](#)). La même équipe montre un effet trans-générationnel (F2, F3) du bisphénol A à une dose faible introduite par voie orale sur le profil d'expression des Co activateurs des récepteurs stéroïdiens tel que SRC-1 (*Steroid Receptor Coactivator-1*) qui jouent un rôle clé dans la spermatogénèse ([Salian et al 2009a](#)).

5.1.2.2. *Neuro-toxicité et comportement*

Chez l'homme comme chez l'animal, la capacité du BPA à traverser la barrière placentaire est établie : Zalko et al, évaluent à 4% de la dose administrée par voie sous-cutanée le passage du BPA à travers le placenta chez les souris CD1 ([Zalko et al 2003](#)). Chez l'homme, une récente étude montre la présence de BPA (non conjugué) dans les cordons ombilicaux de 152 bébés garçons ([Fenichel et al 2012](#)).

Le passage du BPA à travers le placenta indique une exposition du cerveau durant l'embryogénèse qui pourrait expliquer les altérations observées à l'âge adulte. Cette hypothèse a été confortée lors des autopsies réalisées à l'hôpital Antwerp (Belgique), où l'équipe de Geens, a pu doser le BPA au niveau cérébral (n=8, concentration= 0,91 ng/g) ([Geens et al 2012](#)). Palanza et al, décrivent des altérations dans le comportement maternel chez la souris après des expositions (péri- et post-) natales au BPA à 10 µg/kg PC/j, qui sont plus prononcées que celles obtenues après une exposition continue. Ces changements peuvent être dus à un effet local du BPA sur des sécrétions neuroendocriniennes qui gouvernent le comportement maternel ([Palanza et al 2002b](#)).

Dans le même sens, le comportement maternel, évalué sur plusieurs paramètres tels que l'allaitement (Nursing), la construction du nid (Nest building) ou bien le léchage des petits (Pups-

licking), est altéré après une exposition *in utero* de 40 µg/kg PC chez le rat Sprague-Dawley ([Della Seta et al 2005](#)). En outre des injections sous-cutanées de 20 µg/kg PC de BPA pendant une période de six semaines (3 semaines de gestation + 3 semaines de lactation) perturbent le comportement suite à des “*Open Field Test*” dont le but est d’évaluer l’activité locomotrice, et le pouvoir d’exploration chez la souris ([Nakamura et al 2011](#)).

Le BPA peut aussi altérer le dimorphisme sexuel par une masculinisation du comportement social et émotionnel de la femelle ([Yu et al 2011](#)). Xu et al, montrent une importante perte de dimorphisme chez des souris mâles et femelles exposées au BPA en période postnatale (PND 32 - PND 87) à une dose de 40 µg/kg PC/j et l’auteur avance l’hypothèse que le BPA peut agir comme un œstrogène ou un anti-œstrogène sur certaines régions du cerveau ([Xu et al 2011b](#)).

5.1.2.3. Perturbation métabolique

Dans la littérature, les études se contredisent sur les effets du BPA, cependant la majorité conclut à l’existence d’effets à de très faibles doses sur la balance énergétique et l’homéostasie générale. Une étude épidémiologique menée par The National Health and Nutritional Examination (NHANES) 2003-2008 aux Etats-Unis montre l’existence d’une corrélation entre l’augmentation des concentrations de BPA dans les urines et l’apparition du diabète chez 3967 participants (51,7% femmes) ([Shankar & Teppala 2011](#)).

Chez le modèle animal, une exposition *in utero* à partir du 6^{ème} jour de la gestation jusqu’au sevrage dans l’eau de boisson à des faibles doses (0,1 mg/kg PC/j et 1,2 mg/kg PC/j) montre une augmentation de poids corporel à l’âge adulte chez les deux sexes avec un effet plus prononcé chez les femelles. L’effet également est dose-dépendant car c’est la faible dose qui a le plus d’effet ([Rubin et al 2001](#)). Ces effets sont plus prononcés chez la femelle d’où l’implication des hormones sexuelles ([Somm et al 2009](#)).

Chez des souris mâles adultes, l’exposition au BPA via des injections sous-cutanées (pendant 8 jours), à des doses relativement faibles (100 µg/kg PC/j) diminue le métabolisme énergétique ce qui se traduit par une déficience dans la signalisation d’insuline au niveau périphérique (surtout au niveau musculaire). Le poids corporel n’a pas été affecté alors qu’on observe une diminution de prise de nourriture, une diminution de la température corporelle et de l’activité locomotrice, ce qui laisse penser que le BPA peut être considéré comme un facteur de risque dans le développement du diabète ([Batista et al 2012](#)). Chez des femelles Sprague-Dawley adultes, ovariectomisés une

exposition au BPA à des doses de 4 mg/j ou 5 mg/j via des mini pompes implantées au niveau dorsal pendant 15 j montre une diminution de gain de poids, avec une accumulation préférentielle au niveau du tissu adipeux brun ([Nunez et al 2001](#)). Malgré les effets du BPA sur la balance énergétique, les mécanismes restent encore peu élucidés. Xu et al, 2011 montrent une variation dans la préférence au sucré (saccharine et sucrose) après une exposition *in utero* à des faibles doses de BPA (0,1 mg/kg PC/j, 1 mg/kg PC/j). Cette augmentation de consommation de sucré signifie une augmentation de prise d'énergie qui se traduit par une augmentation de poids corporel ([Xu et al 2011a](#)). Des interactions au niveau du système neuroendocrinien qui contrôle la balance énergétique d'une part et d'autre part la reproduction peuvent être la cible de perturbateur endocrinien, ce qui peut expliquer ces effets ([Bourguignon et al 2010](#)).

In vitro notre équipe a montré que le BPA affecte l'expression des gènes de la différenciation adipocytaire dans 3T3-L1, sans modifier l'accumulation des triglycérides ([Phrakonkham et al 2008](#)). L'équipe d'Angel Nadal, montre que le BPA à faible dose (1 nM) diminue l'activité du canal potassique, augmente la sécrétion d'insuline dans les cellules pancréatiques β de souris ou humaines, avec un effet plus prononcé sur les cellules pancréatiques humaines. Cela signifie que le BPA à des très faibles doses peut altérer l'homéostasie du glucose ([Soriano et al 2012](#)).

Cette analyse nous laisse supposer que le BPA peut avoir d'autres effets à des doses plus faibles, mais également une possibilité d'amplification d'effet ou non en présence d'autres perturbateurs endocriniens.

5.2. La génistéine

5.2.1. Nature chimique et sources d'exposition

La génistéine est une isoflavone qui appartient à la famille des phyto-œstrogènes. Les isoflavones présentent une similitude structurale avec nos œstrogènes endogènes qui est à l'origine de ses effets œstrogéniques ([Kurzer & Xu 1997](#)).

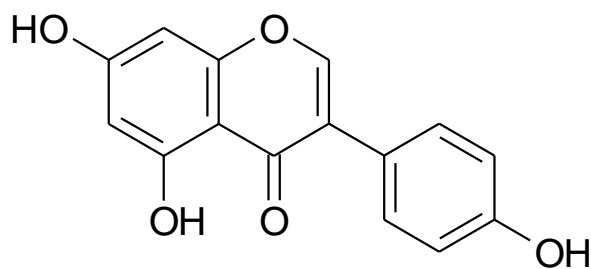


Figure 21: Structure chimique de la génistéine

Ces composés sont présents principalement dans le soja et autres légumineuses. Le soja est une plante plus largement consommée dans les pays asiatiques que dans les pays occidentaux. Son principal intérêt nutritionnel découle du fait qu'il apporte de fortes teneurs en protéines de bonne qualité, ne contient pas de cholestérol, mais est riche en fibres et acides gras insaturés ([Patisaul & Jefferson 2010](#)). La génistéine est présente dans la plante sous forme de β -glycoside et constitue 50% des isoflavones contenues dans la graine de soja.

La consommation estimée des isoflavones est de 25 à 50 mg/kg PC/j chez les populations adultes asiatiques ([Mortensen et al 2009](#)). En Occident et aux Etats-Unis et compte tenu de nos habitudes alimentaires, notre consommation est de 1-3 mg/j ([Duncan et al 2003](#)) ([Mortensen et al 2009](#)). Les concentrations sériques sont de l'ordre de 25 ng/mL chez les femmes asiatiques, un peu inférieure chez les végétariennes, et de moins de 2 ng/mL chez les femmes des Etats-Unis ([Verkasalo et al 2001](#)). Les nourrissons alimentés de façon exclusive avec des formules infantiles constituent le sous-groupe de la population actuellement le plus exposé aux phyto-œstrogènes (6-11 mg/kg PC/j) alors que la génistéine est presque négligeable dans le lait maternel (<0,01 mg/j) ([Setchell et al 1998](#)). Les concentrations plasmatiques trouvées chez ces mêmes nourrissons sont de 654-1775 mg/L, alors qu'elles sont de l'ordre de $4,7 \pm 1,3$ mg/L dans le lait maternel, ce qui correspond à des concentrations d'isoflavones 13000-22000 fois supérieures aux concentrations d'œstradiol ([Setchell et al 1998](#)).

La génistéine agit principalement en se liant aux récepteurs de l'œstrogène alpha ($ER\alpha$) et bêta ($ER\beta$), mais elle a une meilleure affinité pour l'isoforme $ER\beta$. Elle a aussi une faible affinité pour le récepteur aux androgènes, et à fortes doses, elle peut agir comme un anti-androgène ([Park et al 2008](#)). Cela lui confère des effets hormonaux environ 10000 fois plus faibles que ceux de l'œstradiol, mais qui suffisent pour engendrer des effets physiologiques. Elle est répertoriée

comme molécule ayant une capacité d'entraîner une perturbation endocrinienne, cependant plusieurs autres auteurs parlent d'effets plutôt protecteurs voire bénéfiques de la génistéine ou des phyto-œstrogènes d'une manière générale. Shir et al, montrent qu'une ligation partielle du nerf sciatique chez des rats wistar mâles nourris avec un régime riche en phyto-œstrogènes diminue allodynie et hyper-algésie ([Shir et al 2002](#)).

5.2.2. Effets endocriniens de la génistéine

5.2.2.1. *Repro-toxicité*

Chez l'homme, les effets du soja sur l'appareil reproducteur restent controversés. Une enquête longitudinale menée chez des adultes âgés de 20 à 34 ans alimentés pendant les 4 premiers mois avec une formule infantile au soja ou lactée ne montre aucun effet sur la croissance, la puberté, ou la grossesse à l'exception d'un allongement de la durée des règles (+0,37 j) (enquête sous forme de questionnaire) ([Strom et al 2001](#)). Chez la femme adulte, Nagata et al, montrent que les isoflavones augmentent la durée des cycles chez des japonaises pré-ménopausées nourries au lait de soja (109 mg d'isoflavones/j pendant deux mois) ([Nagata et al 1998](#)). Dans le même sens, une consommation de 15 produits à base de soja chez 99 hommes pendant 3 mois nuit non seulement à la qualité du sperme mais aussi à sa quantité (41 millions/mL spermatozoïdes de moins que les témoins 80-120 millions/mL) ([Chavarro et al 2008](#)).

In vivo des conditions d'exposition aiguës chez le rongeur (200 mg/kg PC/j × 4 jours) entraînent une hyperplasie des épithéliums de l'utérus et du vagin chez les femelles ([Stroheker et al 2003b](#)). Des altérations de l'appareil reproducteur chez les mâles ont été également observées ([Stroheker et al 2003a](#)). Les effets sont plus marqués chez des juvéniles, et la littérature souligne que les expositions néonatales entraînent des effets sur le développement (appareil reproducteur, glande mammaire).

5.2.2.2. *Neuro-toxicité et comportement*

La consommation d'isoflavones peut supprimer le comportement sexuel chez la femelle du rat. L'administration d'une préparation commerciale de phyto-œstrogènes chez des rats femelles adultes à des doses intermédiaires et celles retrouvées dans le sang des femmes asiatiques et des femmes de l'occident montre une altération dans le comportement sexuel à l'âge adulte, effet comparable à celui observé lors d'un traitement au Tamoxifène ([Patisaul et al 2004](#)) ([Patisaul et al 2001](#)).

Une autre étude montre qu'une exposition à un régime qui contient des phytoœstrogènes (PED : Phyto-Estrogen Diet) entraîne une altération dans le comportement agressif, le statut hormonal, et une diminution dans l'expression du récepteur à la vasopressine 1A (V1A) au niveau du septum latéral chez le hamster Syrien mâle ([Moore et al 2004](#)). Une exposition à un régime à base de soja (150 µg/g génistéine + daidzéine) pendant six semaines entraîne une altération dans le comportement social, et une augmentation de l'anxiété qui s'accompagne par une augmentation de la vasopressine sérique ([Hartley et al 2003](#)).

5.2.2.3. *Perturbation métabolique*

Des expérimentations chez des rats mâles montrent que la présence d'isoflavones dans le régime alimentaire entraîne une diminution de la masse grasseuse associée à une diminution de la concentration de leptine et du niveau d'insuline sanguin ([Lephart et al 2004](#)). De même, Szkudelski et al, montrent que l'administration de génistéine pendant trois jours à des rats mâles à la dose de 5 mg/kg PC/j diminue sensiblement le niveau de leptine sanguin ([Szkudelski et al 2005](#)). Cependant, la génistéine n'affecte pas l'expression du gène de la leptine dans les adipocytes isolés de ces animaux. La génistéine aurait donc un effet inhibiteur sur la sécrétion de leptine, qui serait principalement dû à une restriction du métabolisme du glucose. En effet, elle atténue sensiblement l'effet de l'insuline de façon concentration-dépendante ainsi que la conversion de glucose dans des adipocytes isolés. Effets confirmés par l'étude de Phrakonkham, qui montre un effet anti adipogénique de la génistéine ([Phrakonkham et al 2008](#)).

Dans le même sens, un régime alimentaire riche en soja réduit la prise de poids et l'accumulation de masse adipeuse chez des souris adultes ([Cederroth et al 2007](#)). L'augmentation de l'oxydation des lipides, suite à une utilisation préférentielle des lipides comme source énergétique, au niveau du tissu adipeux blanc, la phosphorylation de l'AMP-K (AMP-activated protein Kinase), et celle de l'Acétyl-CoA carboxylase sont augmentées, et l'expression de gènes impliqués dans l'oxydation des acides gras et dans la biogénèse mitochondriale est simultanément augmentées ([Cederroth et al 2008](#)).

Au niveau du système nerveux central, la modulation du bilan énergétique est associée à un effet des phyto-œstrogènes sur l'expression d'un neuropeptide (AgRP) de la région hypothalamique, lequel est impliqué dans le contrôle de la prise alimentaire ([Cederroth et al 2007](#)).

En conclusion la génistéine peut aussi avoir des effets sur des cibles qui ont un lien avec la prise alimentaire ou les préférences gustatives tel que la glande salivaire, avec une possibilité d'amplification d'effet ou non en présence d'autres perturbateurs endocriniens.

5.3. La Vinclozoline

5.3.1. Structure chimique et source d'exposition

La vinclozoline [3-(3, 5-dichlorophenyl)-5-ethenyl-5-methyl-2,4-oxazolidinedione] est un fongicide non-systémique du groupe des dicarboximides, une famille qui contient également l'Iprodione et la Procymidone. Il a été commercialisé par BASF corporation sous le nom de Ronilan[®], Curalan[®], Vorlan[®], Touche[®] et enregistré aux USA depuis 1981, avec une large utilisation pour la culture de nombreux fruits et légumes depuis les années 90.

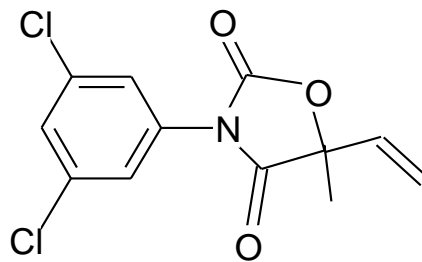


Figure 22: Structure chimique de la vinclozoline

Il apparait sous forme de cristal blanc solide, sans odeur à température ambiante. *In vivo* chez le rat la NOAEL (No Observable Adverse Effect Level) ajustée à une seule dose dans les études de toxicologie de développement est de 6 mg/kg PC/j, et la LOAEL est de 11,5 mg/kg PC/j, cette dose provoque une diminution du poids de la prostate ventrale. La Vinclozoline est un anti-androgène qui se lie sur les récepteurs aux androgènes, mais elle est métabolisée en dérivés hydroxylés dont le potentiel œstrogénique et anti-androgénique a été décrit *in vitro* ([Molina-Molina et al 2006](#)).

Les expositions chroniques par voie orale chez le rat ont permis d'observer une LOAEL de 3,2 mg/kg PC/j, avec laquelle des lésions au niveau du foie, des poumons et des ovaires ont été enregistrées. La NOAEL est de 1,2 mg/kg PC/j ([EPA 2000](#)). La Commission Européenne

annonce que notre alimentation moderne véhicule de nombreux pesticides à action endocrine, mais d'une manière générale, en raison de la réglementation européenne en vigueur, les teneurs alimentaires sont généralement faibles et bien inférieures aux doses autorisées ([European-Commission 2006](#)). Cependant, lorsque les produits proviennent de pays à réglementations moins restrictives, les taux résiduels peuvent parfois être supérieurs aux normes réglementaires. Ainsi malgré son interdiction la Vinclozoline est retrouvée sous forme de résidu dans les produits d'exportation, les jus de fruits et certains vins, mais à des teneurs bien inférieures à la DJA [5 µg/kg PC/j ([EFSA 2008](#))].

L'ANSES (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail) [anciennement l'AFFSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments) depuis juillet 2010] a publié une évaluation de l'exposition théorique des nourrissons et des enfants en bas âge (Naissance - 18 mois) aux résidus de pesticides (dont la Vinclozoline) apportés par les aliments courants et infantiles. Le calcul de l'apport journalier maximum théorique (AJMT) est basé sur l'utilisation des limites maximales de résidus (LMR), pour les aliments infantiles et pour les aliments courants. Les résultats de cette étude montrent un dépassement du crédit journalier en Vinclozoline chez les nourrissons (0 - 4 mois), et les enfants âgés de 13 à 18 mois ([Even et al 2002](#)). Dans le but d'éviter ces dépassements, l'European Food Safety Authority (EFSA) préconise d'abaisser la LMR à la limite de quantification de 0,05 mg/kg ([EFSA 2008](#)).

5.3.2. Effets endocriniens de la Vinclozoline

5.3.2.1. Repto-toxicité

In vivo, une exposition chronique à de fortes doses de Vinclozoline (10 et 30 mg/kg PC/j) diminue le nombre ainsi que la mobilité des spermatozoïdes, le nombre de ratons par portée, et augmente la perte post-implantatoire, elle affecte également le transcriptome de testicule ([Eustache et al 2009](#)). Dans le même sens, une exposition depuis le sevrage à la Vinclozoline (25, 50 et 100 mg/kg PC/j) pendant une semaine cause une diminution du poids relatif de la vésicule séminale, de la prostate ainsi que celui du muscle releveur de l'anus ([Stroheker et al 2003a](#)). Lors d'une autre exposition *in utero* à la Vinclozoline à une dose de 1mg/kg PC/j, suivie d'une analyse de testicule à la fin de la gestation, on observe une altération dans la stéroïdogénèse et la gamétogénèse qui s'accompagne d'une réduction dans le nombre de gonocytes et de la sécrétion de la testostérone ([Lehraiki et al 2011](#)).

Les effets d'une exposition à la Vinclozoline sur l'appareil de reproduction mâle (principalement nombre et qualité des spermatozoïdes, augmentation d'incidence d'infertilité chez les mâles) sont trans-générationnels de la F1 à la F4 suite à des altérations dans la méthylation de l'ADN ([Anway et al 2005](#)). Chez la femelle du rat, une exposition à la Vinclozoline *in utero* à une dose de 1 mg/kg PC/j affecte le développement de la glande mammaire ([El Sheikh Saad et al 2011](#)).

5.3.2.2. Neuro-toxicité et comportement

Une exposition *in utero* pendant une semaine (GD 8- GD 14) à la Vinclozoline (100 mg/kg PC/j) provoque des effets trans-générationnels (de la F1 à la F3) sur le transcriptome du cerveau qui modifie par la suite le comportement social des rats à l'âge adulte (type anxiété selon le sexe) ([Skinner et al 2008](#)).

Dans le même sens, une exposition à la Vinclozoline (10 mg/kg PC/j) chez des lapins durant six semaines à partir de la mi-gestation jusqu'à la 4^{ème} semaine après la mise-bas provoque une perturbation dans le dimorphisme sexuel qui caractérise la région POA/AH (aire préoptique de l'hypothalamus antérieur) telle qu'une diminution du nombre de neurones de GnRH. A noter que ces régions sont impliquées dans le contrôle du comportement sexuel mâle ([Bisenius et al 2006](#)). Une exposition à une dose de Vinclozoline de 200 mg/kg PC/j pendant deux jours (PND 2-PND 3) entraîne une modification dans le comportement social chez les rats mâles et femelles ([Hotchkiss et al 2003](#)).

Flynn et al, montrent qu'une exposition continue (GD 7-PND 77) à la Vinclozoline à une dose de 60 mg/kg PC/j, introduite par l'alimentation provoque une hypoactivité chez les rats femelles ([Flynn et al 2001](#)).

5.3.2.3. Perturbation métabolique

A notre connaissance, une seule étude à ce jour montre que des expositions chroniques à faibles et fortes doses en Vinclozoline ne modifient pas la prise alimentaire chez le rat, par contre elles modifient la préférence au sucré, ([Flynn et al 2001](#)). Cet effet sur les préférences gustatives a été retrouvé au laboratoire, et aucun effet sur la masse corporelle n'a été détecté, quel que soit la période de traitement ([Kouidhi et al 2012a](#)).

OBJECTIF DE L'ETUDE

La génisteine, le bisphénol A et la vinclozoline sont donc trois perturbateurs endocriniens qui se distinguent par leur affinité pour les récepteurs aux œstrogènes et aux androgènes. Plusieurs études associant le bisphénol A et la génisteine montrent des possibilités d'interactions entre ces molécules, et la présence de phytoestrogènes dans les régimes pour rongeurs peut être source de biais dans l'identification d'effets d'exposition à faibles doses car ils semblent atténuer les effets du BPA ([Ruhlen et al 2008](#)). A l'inverse, les études de mélange génisteine/vinclozoline menée au laboratoire montre que ces deux composés développent une synergie sur des paramètres associés au développement et au comportement ([Kouidhi et al 2012a](#)) ([Eustache et al 2009](#)) ([El Sheikh Saad et al 2011](#)).

Dans ce contexte, il était légitime de retenir ces trois molécules pour explorer les des effets d'un mélange ternaire, et d'évaluer, sur un même modèle expérimental, évaluer les effets de chacun des mélanges binaires sur différents paramètres déjà connus être sensibles à de faibles doses de perturbateurs endocriniens.

L'objectif principal de cette thèse est donc d'identifier les effets d'une exposition **continue** (de la conception à l'âge adulte)   des **mélanges de perturbateurs endocriniens** de différentes classes ( strog nique, anti-androgénique)   des **faibles doses** sur **plusieurs générations** (F0, F1 et F2) et à **différents stades de développement** (immatures, adultes) sur le comportement maternel, et sur le comportement alimentaire et de prendre en considération des cibles périphériques (tissu adipeux, glandes salivaires) ou des paramètres développementaux (puberté, distance ano-génitale) ou des paramètres métaboliques (dosages sériques).

Le choix de ce type d'exposition (de la conception à l'âge adulte, en mélanges et à faibles doses), et le choix des doses (G=1 mg/kg PC/j ; BPA=5  g/kg PC/j ; V=1 mg ou 10  g/kg/PC/j) permet de se rapprocher le plus de ce qui se passe dans notre environnement. Il permet de caractériser des effets de mélanges particuliers tels que des mélanges binaires (deux xéno-œstrogènes, ou un xéno- œstrogène et un anti-androgène) ou des mélanges ternaires.

L'objectif à terme est de pouvoir relier les effets de ce type d'exposition à des problèmes de santé publique telle que l'ob sitt , les troubles métaboliques et des troubles du comportement.

MATERIELS ET METHODES

1. Matériel biologique et réactifs chimiques

1.1. Molécules étudiées

Le bisphénol A (CAS : 80-50-7, ré f 239658) provient de chez Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) et sa pureté est $\geq 99\%$. L'huile de maïs est fournie par Lesieur (Asnières-Sur-Seine, France). Tous les produits sont conformes aux normes exigées par la DEQM (Direction Européenne de la Qualité du Médicament & Soins de Santé) (<http://www.edqm.eu/en/Homepage-628.html>). La génistéine (G) a été synthétisée au laboratoire de Chimie Organique et Organométallique (Université Bordeaux 1, Talence, France) et présente une pureté de 99%. La vinclozoline (V) a été extraite de la formule commerciale Ronilan[®] fournie par BASF (Levallois-Perret, France) par l'UMR 1331 Toxalim (INRA, Toulouse) selon la méthode de Bursztyka et al, ([Bursztyka et al 2008](#)). La vinclozoline s'oxyde facilement à la lumière pour donner ses métabolites M1 et M2 par ouverture de l'hétérocycle. Sa stabilité a été régulièrement vérifiée par chromatographie sur couche mince : quelques microgrammes (μg) de vinclozoline en solution dans du *Propanol-1* sont déposés sur plaque de silice avec indicateur de fluorescence et la plaque est placée dans une cuve saturée en chloroforme, lequel entraîne la migration de la vinclozoline. Les métabolites plus hydrophiles restent plus proches de la ligne de dépôt. Toute solution présentant des traces de métabolite est rejetée.

1.2. Animaux, produits et matériels spécifiques à l'expérimentation animale

1.2.1. Animaux et hébergement

Origine : Les rats utilisés sont des rats Wistar Han provenant de la société Harlan (Gannat, France). Ils sont reçus à l'âge de 6 semaines et hébergés à l'animalerie du centre INRA Dijon, classée EOPS (Exempt d'Organismes Pathogènes Spécifiques), en conditions contrôlées (22°C, 55% d'humidité relative, cycles jour/nuit de 12h/12h).

Nature des cages et biberons : Toute utilisation de plastiques et consommables en polycarbonate est écartée pour éviter des contaminations en bisphénol A ou phtalates. Les animaux sont hébergés en cages de polypropylène (4 animaux/cage) et les biberons sont en verre ou en polypropylène.

Régimes : A leur arrivée, les animaux sont alimentés avec un régime *low phyto-estrogènes* 2018 (Harland Teklad, figure 1), c'est-à-dire avec le même régime qu'ils reçoivent depuis le

sevrage chez le fournisseur. Ce régime a une teneur réduite en phyto œstrogènes (250 mg/kg) par rapport à un régime standard, donc il contient moins d'isoflavones (dont la génistéine). Bien qu'il soit préconisé pour l'étude des perturbateurs endocriniens, il n'est pas totalement dépourvu de phyto-œstrogènes. Avant toute expérimentation, les animaux sont donc adaptés pendant 15 jours à un régime de croquettes semi-synthétique, "le régime L5" (INRA, Jouy-en-Josas, France) (Figure 1)] pendant les 11 semaines. Ce régime permet de s'affranchir de la présence de phyto-œstrogènes. Les régimes sont donnés *ad libitum* et les cages sont réapprovisionnées tous les deux jours.

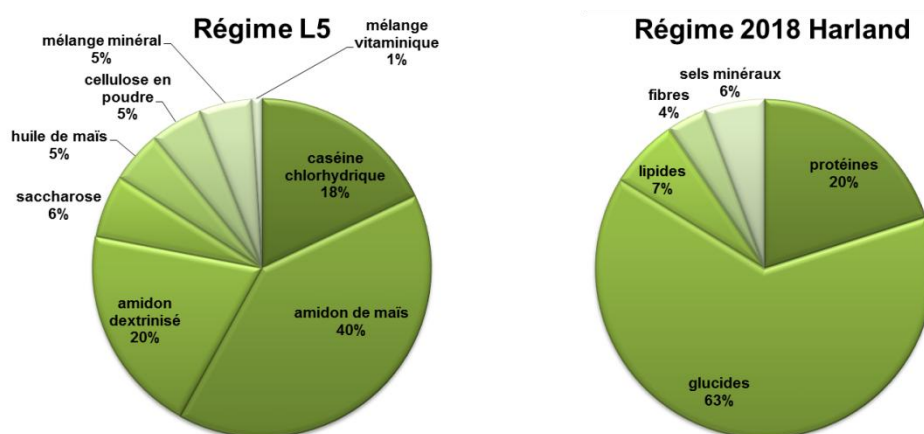


Figure 1 : Composition du régime L5 et du régime Harland 2018

Eau de boisson : L'eau de boisson est de l'eau de ville filtrée sur charbon actif pour éliminer toute trace de contaminant (pesticides, détergents) pouvant avoir des effets endocriniens.

Les litières : Les litières sont composées de sciures de peuplier, qui ne dégagent pas de polyphénols ni de terpènes susceptibles d'agir aussi comme phyto-œstrogènes, elle provient de chez SORAC (le Mesnil-le-Roi, France). La litière est autoclavée à 134°C pendant 10 min, elle est changée une fois par semaine.

1.2.2. Matériel de mesures

Les régimes et les animaux sont pesés avec une balance électronique PRECISA XT3200D (Precisa Instruments, Dietikon, Suisse) couplées à un système informatique qui permet une acquisition directe des données sur des fichiers EXCEL. Ce dispositif permet d'éviter des erreurs lors de la prise de données et assure une traçabilité.

1.2.3. Réactifs

La saccharine, la gomme du xanthane et le chlorure du sodium sont des produits Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) et leur pureté est $\geq 99\%$. L'huile de maïs utilisée pour administrer les produits de traitement est fournie par Lesieur (Asnières-Sur-Seine, France). Tous les autres produits sont conformes aux normes exigées par la DEQM (Direction Européenne de la Qualité du Médicament & Soins de Santé) (<http://www.edqm.eu/en/Homepage-628.html>).

- *Réactifs spécifiques aux cultures cellulaires*

Les milieux de culture cellulaire Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) à forte concentration en glucose (4,5 g/L), le GlutaMAX™, le pyruvate de sodium, le tampon PBS (Phosphate-Buffered Saline), l'insuline d'origine bovine et la solution de trypsine proviennent d'Invitrogen (Cergy pontoise, France). Le sérum de veau foetal avec hormones (SVF Gold), et sans hormones (SVF dialysé) sont fournis par PAA Laboratoires (Les Mureaux, France). Les consommables en plastique (flacons de culture, plaques multi-puits, pipettes) proviennent de BD Flacon (BD Biosciences, Pont de Claix, France). Le diméthylsulfoxyde (DMSO), le rouge neutre, l'huile rouge oil-red O (ORO), le 3-isobutyl-1-méthylxanthine (IBMX) et la dexaméthasone sont fournis par Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Le Kit ELISA pour doser la leptine de souris (Mediagnost, Allemagne), et le Kit utilisé pour le dosage enzymatique des Triglycérides (TG PAP 150) sont des produits BIOMérieux, (Craponne, France).

- *Réactifs pour analyses d'histologie*

Les réactifs Shandon Rapid-Fixx™ (réf : 230014), Shandon Cryomatrix™ (réf : 230125) proviennent de chez Thermo Scientific (Courtaboeuf, France). L'Hémalun de Mayer (réf : 1.09242.0500) provient de chez Merck Chimie (Fontenay-sous-Bois, France). Le Fuchsin-Ponceau (réf : C0443), phosphomolybdique (réf : G0012) et le Vert Lumière (réf : CO702) proviennent de chez Diapath (Francheville, France). L'isopentane provient de chez Carlo Erba (Val de Reuil, France). L'Optimal Cutting Temperature OCT™ (réf : 004511241), le Safesolv (réf : 00699464), le Safemount (sans xylène) (réf : 00647520), et le formaldéhyde 40% proviennent de chez Labonord (Templemars, France).

- *Réactifs pour biologie moléculaire*

Le RNA Later provient de Qiagen (Courtaboeuf, France), le réactif TRIzol® de chez Invitrogen (Cergy Pontoise, France), le tampon DNase, la DNase, la solution de la DNase-stop de

Promega (Charbonnières, France) et l'eau pour biologie moléculaire de chez Eurobio (Les Ulis, France). Les Kit Bio-Rad « Experion RNA StdSens Reagents and Supplies » pour l'analyse qualitative des ARN, le tampon iScript[®], l'ARN polymérase iScript[®], le SsoFast Eva Green Supermix utilise pour la réaction de polymérisation en chaîne en temps réel (PCR) proviennent de Bio-Rad (Marnes-la-coquette, France).

- **Réactifs de biochimie**

Tous les produits chimiques utilisés pour les analyses immunologiques proviennent de chez Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) et sont de la meilleure pureté.

○ **Western blots** : La membrane de transfert est en polyvinyl difluoride PVDF et provient de chez BioRad (Marnes-la-Coquette, France). Le lait écrémé provient de chez Régilait (Saint-Martin-Belle-Roche, France). Les anticorps primaires polyclonaux utilisés sont l'anticorps de lapin anti-histone H4 acétylée (sur Lys8) provenant de chez Cell Signaling (Saint-Quentin-en-Yvelines, France) et l'anticorps de lapin anti-RPS9 qui provient de chez Abcam (Paris, France). L'anticorps secondaire est un anticorps d'origine anti-IgG de lapin conjugué à la peroxydase de raifort (GAR-HRP) provenant de chez BioRad (Marnes-la-Coquette, France) et le réactif StrepTactin (analogue de la streptavidine) couplé à la peroxydase (StrepTactin-HRP), utilisé comme anticorps aspécifique pour révéler en luminescence les protéines marqueurs de poids moléculaires (Precision Plus Protein Western C Standards), provient de chez BioRad (Marnes-la-Coquette, France).

○ **Kits de dosages** : Le Kit ELISA pour doser la leptine de souris provient de chez Mediagnost (Allemagne), et le kit de dosage de l'EGF provient de chez PeproTech (Neuilley Sur Seine, France).

2. Expérimentations animales

Toutes nos expérimentations animales ont été soumises à l'approbation du comité d'éthique de l'expérimentation animale de l'Université de Bourgogne (avis favorable N°A1909 du 16/12/09). Les animaux sont traités avec soins et respect. Tout animal souffrant doit être euthanasié avec du gaz carbonique, à basse concentration (jusqu'à 10%) dans une enceinte à CO₂ (MC 2003, Esternay, France).

2.1. Conditions d'élevage et de traitements

2.1.1. Exposition chronique à différentes doses de bisphénol A chez le rat mâle

Un total de 30 mâles adultes âgés de 21 semaines et pesant entre 440 à 450 g sont placés en cages individuelles et répartis au hasard en cinq groupes (6 rats par groupe), un groupe témoin et 4 groupes qui sont exposés au BPA pendant 6 semaines via l'eau de boisson. Les concentrations de BPA sont de 0 ; 0,12 ; 1,2 ; 120 et 300 mg/L. De telles concentrations reviennent à administrer les doses journalières de 0, 0,5 µg/Kg, 50 µg/Kg, 5 mg/Kg et 12,5 mg/Kg de masse corporelle. La dose la plus élevée correspond à une solution de BPA saturée (solubilité: 300 mg/L).

L'état des animaux a été évalué sur la base du maintien du poids corporel et sur la consommation d'eau et de nourriture relevés deux fois par semaine.

2.1.2. Exposition continue au BPA ou à des mélanges de PE à faibles doses chez le rat

Cette étude est basée sur un modèle d'exposition continue à des xéno-hormones précédemment établi pour réaliser des études sur la fertilité, le développement et le comportement et donc compatible avec des études sur le comportement alimentaire (prise alimentaire et préférences gustatives).

Un total de 126 femelles et 126 mâles âgés de 14 semaines est mis en couple en appariant un mâle pour une femelle. L'accouplement est contrôlé tous les matins : il est validé par la présence d'un bouchon vaginal ou de spermatozoïdes dans un prélèvement effectué par lavage vaginal avec 50 µL de sérum physiologique. Les femelles positives sont immédiatement isolées et réparties en 7 lots (18 femelles/lot). A partir de ce jour (Gestation Day 0), elles reçoivent quotidiennement les molécules d'intérêt jusqu'au sevrage. Seules les femelles prises dans les 3-4 premiers jours de la mise en couple (16-18 femelles/lot) sont retenues pour l'étude de manière à constituer des lots homogènes (Figure 2). Les composés sont mis en solution dans l'huile de maïs (0,4 mL/kg PC/j) et déposés dans la bouche à l'aide d'une micropipette Microman Gilson M100 pour des volumes inférieurs à 100 µL ou Microman Gilson M250 pour des volumes supérieurs.

Parmi ces lots, 4 reçoivent un mélange de génisteine (1 mg/kg PC/j), vinclozoline (10 µg/kg PC/j) et/ou bisphénol A (5 µg/kg PC/j). Celles-ci sont apportées sous forme de mélange binaire: génisteine/vinclozoline (GV), génisteine/bisphénol A (GB), vinclozoline/bisphénol A (VB), et

ternaire : génistéine/vinclozoline/bisphénol A (GVB). Un cinquième lot reçoit un mélange génistéine/vinclozoline (TGV) pour lequel la dose de la vinclozoline est identique à celle de la génistéine (1 mg/kg PC/j). La composition de ce mélange TGV pour les deux molécules est considérée comme mélange de référence dont les effets ont déjà été caractérisés lors d'expérimentations antérieures menées par l'équipe pour étudier les effets combinatoires de la génistéine et de la vinclozoline. Etant donné l'absence de données sur le BPA, un lot est spécialement exposé au BPA seul. Le lot témoin est gavé avec l'huile seule (témoin négatif).

A la mise bas, les portées sont pesées, sexées et alignées en 10 animaux par portées : 5 mâles et 5 femelles dans la mesure du possible. Le cas échéant, des adoptions croisées le jour de la naissance sont réalisées au sein d'un même lot.

Au sevrage, les mères sont sacrifiées et les jeunes rats sont identifiés par une puce électronique introduite sous la peau au niveau dorsal. Les rats sevrés sont exposés *per os* jusqu'à l'âge adulte avec les mêmes mélanges. Ils sont répartis au hasard en 3 séries :

- Une première série de 12 rats/sexe/groupe (1 mâle et une femelle par portée pour chaque groupe) est destinée à caractériser les effets sur les animaux au stade immature. Ils seront sacrifiés au plus tard à l'âge de J35, juste après les tests de préférences gustatives.
- Une deuxième série de 12 rats/sexe/groupe (1 mâle et une femelle par portée pour chaque groupe) est destinée à identifier les effets des traitements sur les animaux adultes : ils seront sacrifiés vers à l'âge adulte, après les tests de préférences gustatives).
- La troisième série regroupe des femelles qui sont également traitées et réservés pour être accouplées et produire la génération F2 (une par portée/groupe).

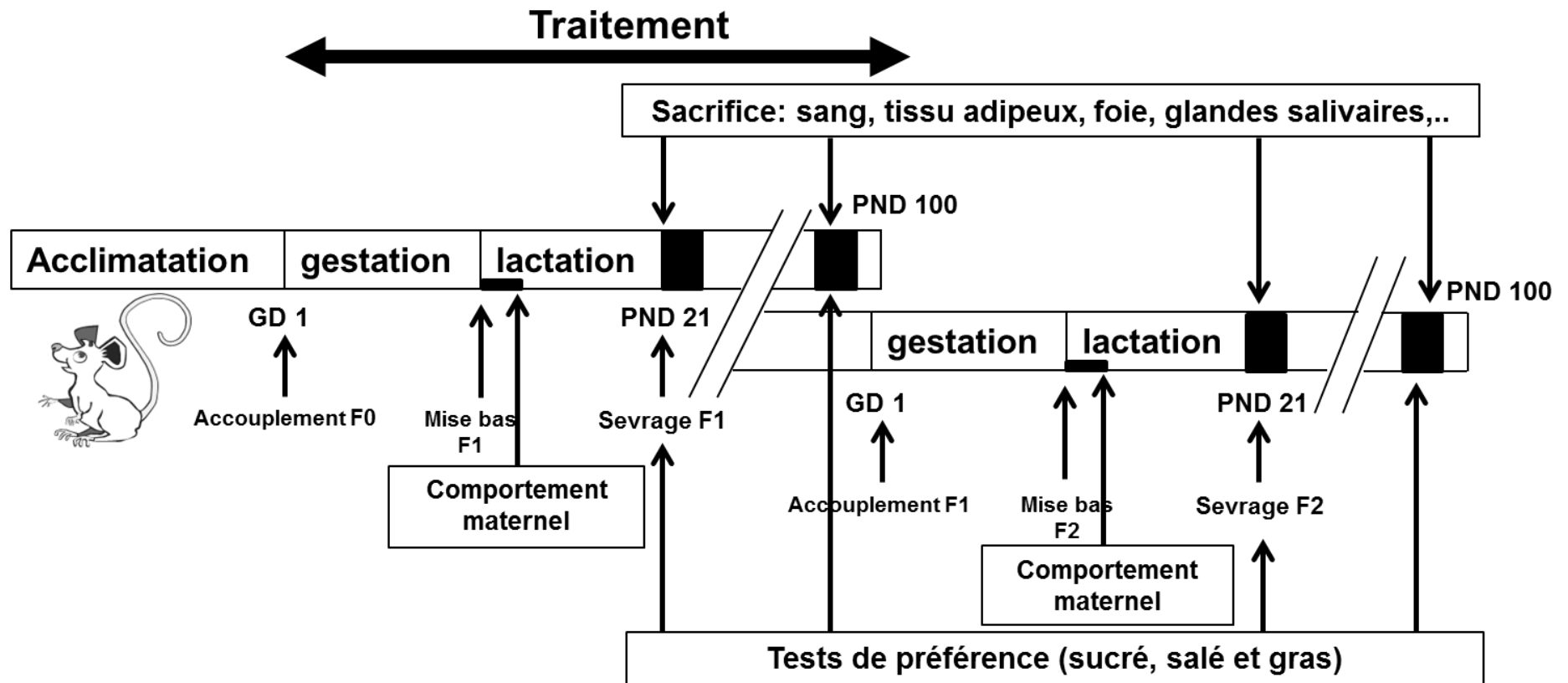


Figure 2 : Protocole d'exposition continue (conception-âge adulte) de rats à des mélanges de composés œstrogéniques et, anti-androgéniques. GD : (gestational day), PND : (post natal day)

Les gavages sont réalisés tous les deux jours avec les mêmes solutions que celles de leurs mères, ce qui conduit à diminuer de moitié la dose d'exposition. Deux raisons ont guidé ce protocole :

- L'impossibilité de gaver 400 rats /jour (7 lots \times 12 ratons \times 2 sexes \times 2 stades de développement = 336 + 48 femelles gardées pour produire la F2 = 384 rats/jour dans un laps de temps qui soit inférieur à 2 heures pour respecter les rythmes biologiques.
- Le fait que l'exposition *in utero* via le transport placentaire et lactationnel soit $<5 \mu\text{g/kg PC/j}$ [4% de la dose administrée ([Zalko et al 2003](#))].

A l'âge adulte, le gavage est arrêté à PND 100 pour chaque lot. Les femelles et les mâles sont accouplés entre eux (8 rats/groupe/sexe) en prenant soin d'éviter tout croisement consanguin. Cette deuxième génération est réalisée afin de mettre en évidence d'éventuels effets multi-générationnels sur la génération suivante (F2).

Comme dans la première génération, le lendemain de la mise-bas est désigné comme Post Natal Day 1 (PND 1). Pour chaque portée, les nouveau-nés sont pesés et sexés, et la portée est alignée à 10 ratons (5 mâles et 5 femelles quand c'est possible). L'adoption est pratiquée au sein du même lot quand le nombre de ratons n'atteint pas les 10. Au sevrage, les jeunes rats sont répartis au hasard en 7 lots: 12 rats/sexe/groupe (1-2 mâles et une femelle par portée pour chaque groupe) et sont nourris *ad libitum* avec le même régime que précédemment jusqu'à l'âge adulte, mais ne sont pas traités (Figure 2). Tout comme pour la F1, les données de développement, de comportement gustatifs et des données physiologiques seront relevées. Ils seront sacrifiés au stade jeune adulte, c'est-à-dire à J100.

2.2. Etudes de développement

2.2.1. Gestation et développement prénatal

Les mères sont observées quotidiennement pour déceler toute trace de comportement anormal ou tout signe de toxicité dès le début de la gestation jusqu'au sevrage : des pesées bihebdomadaires de la nourriture et de l'eau consommée et des pesées hebdomadaires des animaux permettent de s'assurer de l'état de santé. Une modification brutale de la courbe de poids au cours des deux derniers tiers de la gestation est considérée comme symptomatique d'un avortement spontané. Pour chaque femelle, le moment de la mise bas dans la journée (matin ou après-midi) est noté pour calculer précisément la durée de la gestation, tout avortement est enregistré.

Au sevrage, les mères sont sacrifiées et l'examen de l'utérus permet de compter les boutons embryonnaires (ensemble de cellules qui est l'origine de tous les tissus de fœtus). Le nombre de boutons embryonnaire - le nombre total des ratons nés (vivants et morts) permet de compter les pertes post-implantatoires.

2.2.2. Naissances et caractérisation de la portée

A la naissance, la portée est caractérisée par le nombre d'animaux et le poids global tout animaux confondus, puis les animaux sont pesés et sexés.

Le sexe ratio est défini par le rapport du nombre total de mâles sur le nombre total de rats mâles et femelles qui naissent au sein d'un même lot, toutes portées confondues. Ce rapport est très stable sur une population sauvage et sa valeur normale est généralement de 102 à 108 mâles pour 100 femelles ([Hood 2005](#)), soit 50,4 à 51,9% de mâles nouveau-nés. Une diminution de ce rapport traduit une influence œstrogénique pendant la gestation. Tous les ratons sont examinés afin d'enregistrer des éventuelles malformations.

2.2.3. Croissance et prise alimentaire

Tous les animaux sont quotidiennement observés dès la naissance pour déceler toutes malformations. Durant toute l'expérimentation, le poids corporel est mesuré une fois par semaine pour suivre la croissance des animaux. La consommation de nourriture et celle d'eau sont mesurées deux fois par semaine. Le contrôle journalier des animaux permet de détecter toute anomalie du comportement et tout signe de toxicité ou de pathologies.

A partir du sevrage, la croissance des animaux est suivie par pesées individuelles une fois par semaine jusqu'au sacrifice. Le comportement alimentaire des animaux est également suivi par mesure bihebdomadaire de la nourriture et de la consommation d'eau. Tout comme pour les mères, les animaux sont observés lors des soins pour déceler tout symptôme susceptible d'indiquer un état pathologique ou des troubles du comportement propres aux perturbateurs endocriniens (apathie, anxiété, agressivité ou hyperactivité). Une attention particulière est portée à la santé buccale (croissance des dents) qui conditionne pour partie la prise alimentaire.

2.2.4. Distance ano-génitale

C'est la distance entre l'anus et la base de la papille génitale (pénis ou vagin) ; elle est considérée comme une méthode non invasive pour déterminer le degré d'exposition aux perturbateurs

endocriniens de type androgéniques durant la période néonatale. Elle est mesurée au sevrage (J21). Les rats sont maintenus immobiles dans un cylindre de rétention (Figure 3), puis des photos sont prises avec un appareil photo numérique (Nikon, Coolpix990). La distance est déterminée à partir des photos traitées grâce au logiciel de traitement d'image Visilog 6.9 (Noesis, Crolles, France), qui prend en compte le diamètre du cylindre comme mesure de référence (5 cm).

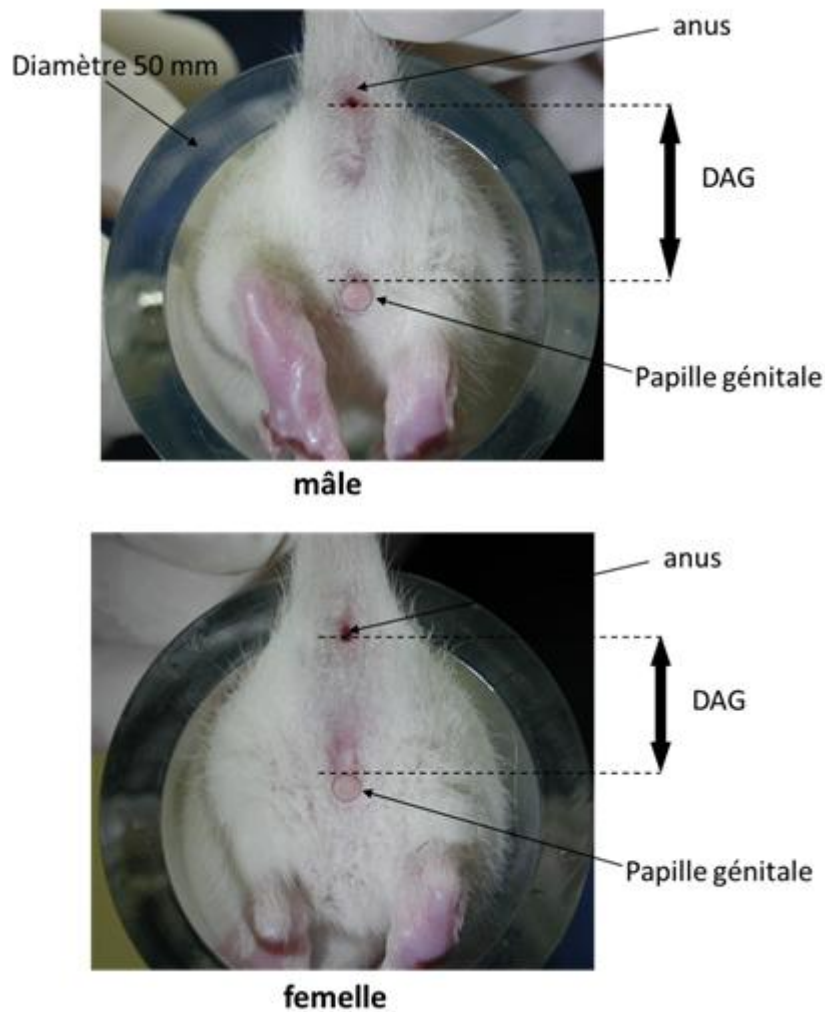


Figure 3 : Dispositif de mesure de la distance ano-génitale

Elle est étroitement liée au développement pondéral de l'animal. C'est pourquoi les résultats sont généralement exprimés en valeurs relatives par rapport au poids du corps. Cependant, il existe un dimorphisme sexuel : chez les rats mâles, l'AGD est de 0,26 mm/g de poids corporel tandis que chez la femelle l'AGD est seulement de 0,13 mm/g de PC. Selon l'étude de Gallavan, normaliser l'AGD en divisant par le poids du corps ne suffit pas à compenser les différences de poids entre animaux, alors que si on exprime l'AGD par rapport à la racine cubique du poids du corps, on obtient une

valeur constante de 2,8 chez les mâles et de 1,8 chez les femelles. Nous avons donc considéré l'AGD index (AnoGenital Index), qui est le rapport $AGD/Poids\ corporel^{1/3}$ ([Gallavan et al 1999](#)).

2.2.5. Apparition de la puberté

Elle reflète l'apparition des caractères sexuels sous l'effet des œstrogènes et androgènes, elle est déterminée à partir de J23 sur la base de :

- *La séparation du prépuce chez les mâles* : à un stade immature (jusqu'à l'âge de J25 environ) le pénis a une forme en V. A l'apparition de la puberté, vers l'âge de J25-J30, il passe par un stade intermédiaire, et son extrémité prend la forme d'un W lorsque le rat atteint l'âge adulte (au-delà de J80), c'est-à-dire quand il est finalement mature, la forme du pénis s'apparente à un U (Figure 4).

- *L'ouverture vaginale chez les femelles* : celle-ci apparaît entre J33 et J42 et correspond à la disparition de la membrane vaginale (ouverture vaginale), elle est le signe précurseur de la puberté. Les cycles apparaissent environ une semaine après l'ouverture vaginale (Figure5).

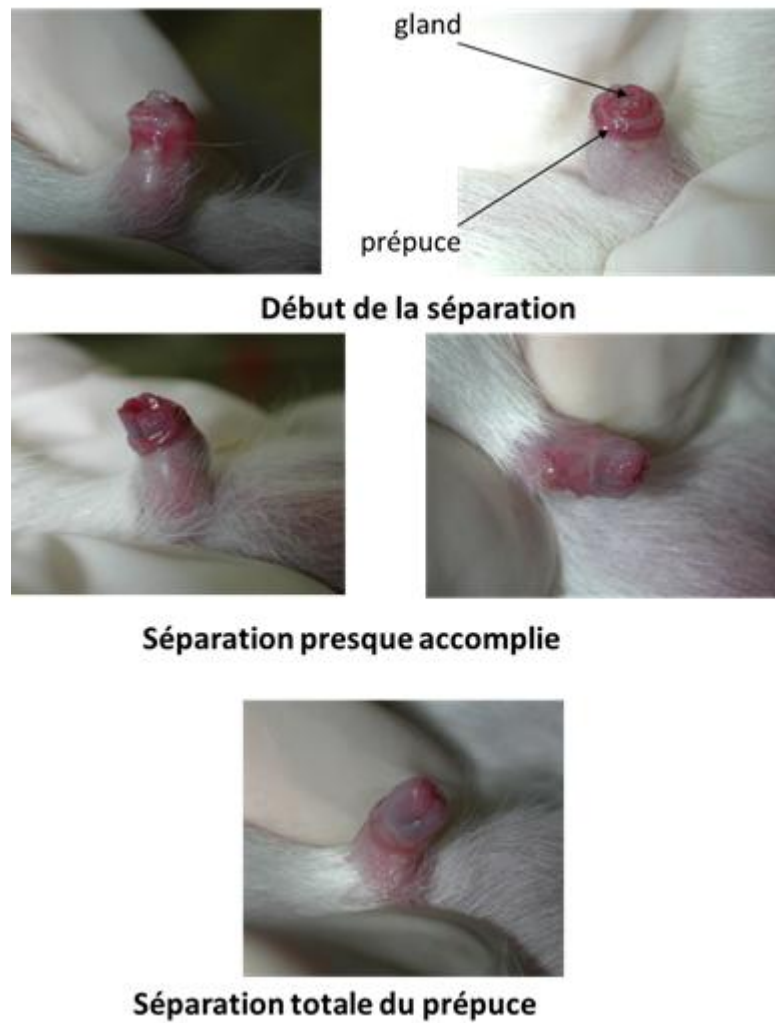


Figure 4 : Détermination du stade de séparation du prépus chez le rat



Figure 5 : Détermination du stade de l'ouverture vaginale chez la ratte femelle au stade pré-pubertaire (A), apparition de la puberté (B) ([Nah et al 2011](#))

2.2.6. Durée des cycles œstrals

Chez le rat, la durée du cycle est de 4 jours. Elle peut augmenter sous l'effet des œstrogènes. L'aspect des frottis vaginaux varie au cours du cycle, le pourcentage de cellules vaginales cornifiées étant maximal au moment de l'ovulation, les frottis vaginaux réalisés chaque matin durant deux semaines permettent d'évaluer l'impact sur les différentes étapes des cycles et sur la durée totale des cycles.

Frottis vaginaux : Le cycle œstral de la ratte comporte 4 phases classiques de durée bien définies : le proestrus [constitué de deux phases : early proestrus d'une durée de 55-57 heures et late proestrus 12-14heures], est suivi de 25-27 heures d'œstrus au cours desquelles la rate accepte le mâle pour accouplement. En cas de non fécondation, suivent le Métoestrus (6 à 10 heures) et le Dioestrus (6 heures), au cours de ces différentes phases, l'utérus et le vagin présentent des modifications cellulaires, dont une hypertrophie marquée au moment de l'œstrus. Au niveau du vagin, ces modifications se traduisent par une kératinisation de l'épithélium vaginal qui est visible sur le frottis (Figure 6).

Réalisation du frottis : Les lames sont soigneusement lavées à l'alcool puis séchées et numérotées (n° de lame correspondant au n° de l'animal). L'extrémité d'un coton tige est humidifiée dans du sérum physiologique puis introduit doucement dans le vagin en le tournant lentement, tout en maintenant bien l'animal immobile contre soi. Le prélèvement est ensuite étalé sur la lame sans trop appuyer sur le coton tige et séché à l'air libre.

Les lames séchées sont déshydratées quelques secondes dans deux bains d'éthanol à 70% et 50% puis un bain d'eau distillée, les lames sont plongées dans un bain d'hématoxyline stabilisée durant 3 minutes. Après deux rinçages à l'eau distillée et deux minutes de révélation des noyaux au liquide bleuissant, les lames sont déshydratées par bains successifs d'eau distillée et d'éthanol à 70% et 95% respectivement. Après 3 minutes de bain de colorant de Shorr, les lames sont fixées par deux bains successifs d'éthanol à 100%. Les coupes colorées sont ensuite montées entre lame et lamelle et observées avec un microscope Nikon Eclipse 600 (Nikon, France).

Interprétation : la chromatine des noyaux cellulaires est colorée en bleu violet ou noir. Le cytoplasme des cellules malpighiennes éosinophiles est rose orange, les cellules cynophiles apparaissent en vert foncé et les cellules orangéophiles en orangé très brillant. Les leucocytes

présents dans le frottis se caractérisent par un noyau bleu foncé et un cytoplasme bleu très clair. Le stade de chaque phase du cycle (La phase Dioestrus n'est pas colorée).

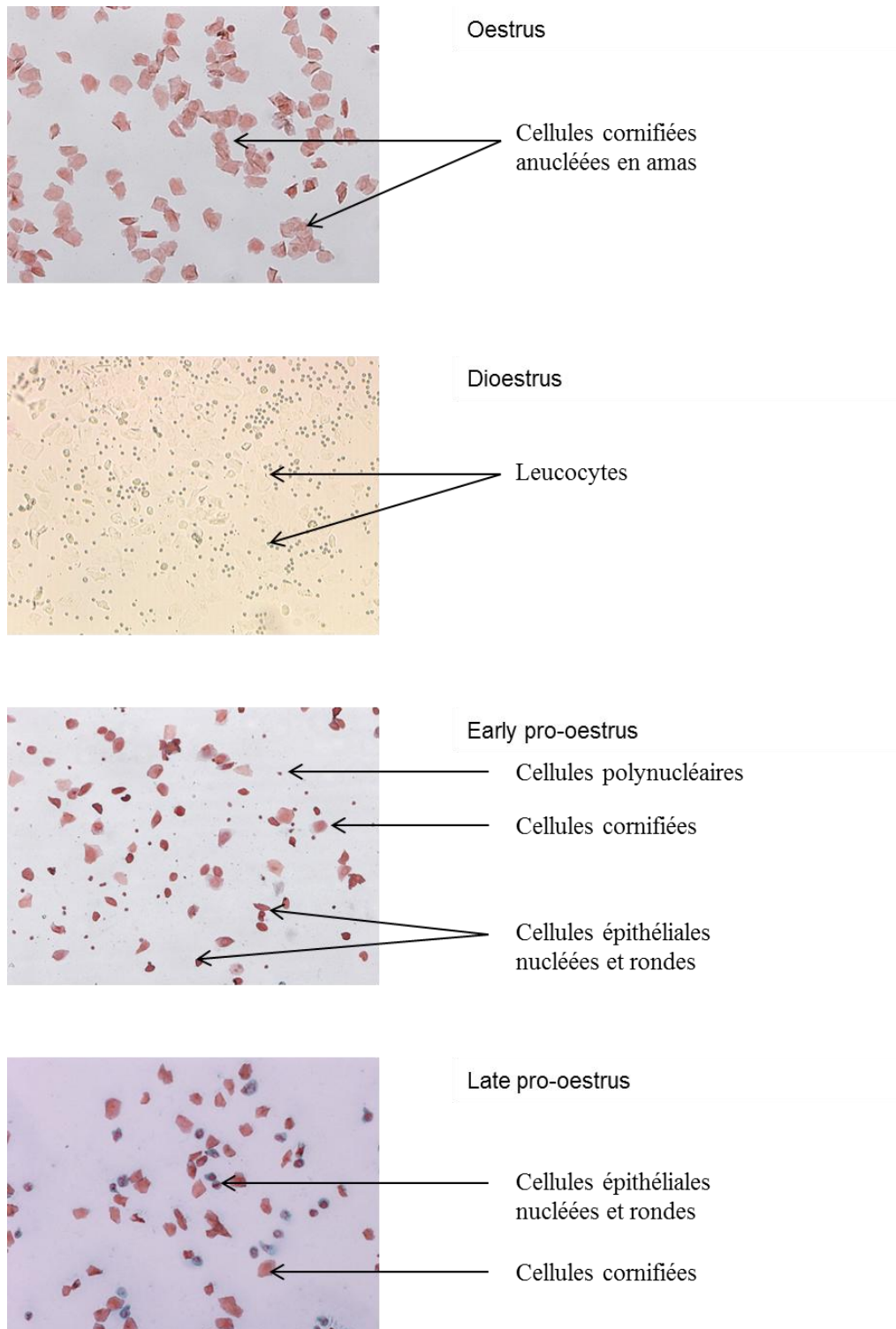


Figure 6 : Interprétation des frottis chez la ratte

2.3. Etudes de comportement

2.3.1. Tests de préférences gustatives

Ils consistent à mettre les rats en présence de deux biberons dont un contient de l'eau (solution témoin) et le deuxième contient la solution à tester ([Curtis et al 2004](#)).

Les tests sont effectués à deux stades de développement [sevrage (J25), adulte (J100)] afin de visualiser les effets sur la formation, mais aussi sur l'évolution des préférences avec l'âge. Avant chaque test, les rats sont habitués à la présence de deux biberons contenant seulement l'eau pendant les deux premiers jours (phase d'adaptation). Chaque test dure 3 jours, chaque jour on change la position des deux biberons afin d'éviter que l'animal associe une position à une saveur et ne cherche plus la préférence pour l'un ou l'autre côté. Les tests sont enchaînés après un jour de repos entre deux tests au cours duquel les animaux sont à nouveau exposés aux deux biberons contenant seulement de l'eau. Toutes les solutions sont données à température ambiante. Les biberons sont pesés chaque matin à la même heure et dans le même ordre, la consommation est ramenée au poids du corps afin de s'affranchir de l'influence du développement sur la consommation.

La préférence est exprimée en pourcentage de solution aromatique consommée par rapport à la consommation totale de boisson ; elle est calculée à partir de la formule :

$$P = \frac{\text{Consommation de la solution avec saveur}}{\text{Consommation de boisson}} \times 100$$

Trois saveurs ont été étudiées : le sucré, le salé et le gras. Les deux premières saveurs sont connues pour être influencées par les œstrogènes et les androgènes. Elles présentent également un dimorphisme sexuel qui est un bon moyen d'identifier une exposition aux perturbateurs endocriniens. La préférence au gras est considérée dans les études de physiologie et de nutrition depuis plusieurs décennies ([Takeda et al 2000](#)), mais à notre connaissance, cette saveur n'a jamais été abordée en tant que telle dans les études d'effets des perturbateurs endocriniens. Cependant, une étude d'exposition au 2, 3, 7, 8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD) identifie des effets sur la préférence au fromage ([Tuomisto et al 2000](#)).

La préférence au sucré a été établie sur la base d'une consommation de saccharine (0,3%, p/v) : Contrairement au saccharose, la saccharine n'apporte aucune calorie et permet de s'affranchir de tout effet post ingestif sur la prise alimentaire ([Ferguson et al 2000](#)).

La préférence au salé a été évaluée en considérant la prise d'une solution de NaCl à 1% (p/v) ([Ferguson et al 2003](#)).

La préférence au gras a été explorée en proposant une émulsion d'huile de maïs à 1% (v/v) additionnée de 0,3% (p/v) de gomme de xanthane afin de stabiliser l'émulsion; la gomme de xanthane est également rajoutée à la même concentration dans le biberon d'eau afin d'avoir la même texture. Des tests préliminaires ont permis de choisir la dose de 1% de gras, ainsi de choisir la gomme de xanthane comme agent tensioactif (*Cf. chapitres annexes*).

2.3.2. Comportement maternel

Le comportement maternel a été évalué sur les mères des générations F0 et F1. Les observations sont réalisées pendant les 8 premiers jours post-partum (1 jour après le sexage et la réduction des portées) le matin (07h:00). Chaque mère est observée 14 fois pour une durée de 10 secondes. Pour un même animal, chaque observation est séparée par 10 minutes. Il s'agit de noter les occurrences de différentes attitudes lors de quatorze observations réalisées en silence pour ne pas déranger les animaux et toujours dans le même ordre des cages ([Palanza et al 2002a](#)) ([Palanza et al 2002b](#)) . Quatorze observations ont été enregistrées pour chaque mère. Le score de "1" est accordé quand l'activité est produite, le score "0" est accordé quand l'activité est absente.

Les quatorze observations sont classées en différentes catégories qui traduisent l'attachement de la mère à sa progéniture, conformément au tableau 1: l'attachement est maximum les huit premiers jours, puis il diminue au fil des jours jusqu'au sevrage. Au fur et à mesure, la mère quitte ses activités maternelles pour aller vers des activités plus personnelles, que l'on classe en comportement « non-maternel ». Une sur- représentation de ces activités en début d'allaitement traduit donc un désintéressement de la mère pour son petit, donc une diminution du comportement maternel. De même, une forte anxiété ou une agressivité anormale peut affecter le comportement maternel.

Tableau 1 : Description du comportement maternel et non maternel :

Observations :	Description :
Le nid	
<i>Repos dehors du nid (Resting outside the nest) :</i>	La mère ne fait rien et reste en dehors du nid.
<i>Repos à l'intérieur du nid (Resting Inside the nest):</i>	La mère dans le nid passive (c'est à dire là où il y a plus de la moitié de la portée)
<i>Construction du nid (Nest building):</i>	La mère est active dans le nid, remue la sciure (nest building).
La position d'allaitement	
<i>Arc-bouté (Arched nursing) :</i>	La mère en allaitement arc-bouté
<i>Blanket nursing :</i>	La mère en allaitement moyen (au-dessus mais pas vraiment arc boutée)
<i>Allaitement passif (passive nursing) :</i>	La mère en position passif sur le dos ou le coté (blanket posture)
Soins des petits	
<i>Léchage des petits (Pup licking)</i>	La mère effectue le toilettage des petits
<i>Léchage ano-génital (Anogenital licking)</i>	La mère effectue un toilettage anogénital des petits
<i>Transport des petits (Pup carrying)</i>	La mère transporte un petit dans sa bouche
Les comportements non-maternels	
<i>(Rearing):</i>	La mère se redresse sur ses pattes arrière
<i>Exploration (Exploration):</i>	La mère explore le nid
<i>Toilettage (Self grooming) :</i>	La mère se toilette elle-même
<i>Nourriture (Feeding): la mère mange :</i>	La mère mange
<i>Boisson (Drinking):</i>	La mère boit

2.4. Sacrifice et prélèvements

2.4.1. Recueil de données avant le sacrifice

A chaque stade de développement (immature, adulte), les animaux sont mis à jeûn la veille du sacrifice. Au matin les rats sont pesés, puis la glycémie est mesurée grâce à un glucomètre (Accu-chek) par ponction d'une goutte de sang à l'extrémité de la queue.

Test de tolérance au glucose : Il permet de détecter la capacité de normaliser rapidement l'épisode hyper-glycémique induit par un bolus de glucose. Cette capacité dépend de l'intégrité d'une réponse métabolique qui inclut d'une part la sécrétion d'insuline en réponse au glucose par les cellules β pancréatiques, et d'autre part l'action hypoglycémiant de l'insuline dans le foie et les organes périphériques.

Une injection intra péritonéale de glucose (1 g/kg) a été réalisée (rats mâles de la première génération, à jeun depuis 12h) le matin. La glycémie est mesurée à l'aide d'un glucomètre par ponction d'une goutte de sang au bout de la queue (Accu-Check) à différents temps pour établir une cinétique: -30 min, 0 min, 30 min, 60 min, 120 min. Les résultats sont exprimés en (mg/dl) dans le sang.

Mesure de la masse grasse : La mesure de la masse grasse a été réalisée avec un Impédancemètre (Toxalim, Toulouse) sur les deux générations F1 et F2. C'est un appareil utilisé pour déterminer la composition corporelle en masse grasse et maigre, grâce un courant alternatif de faible tension appliqué par des électrodes sous la peau, ces électrodes sont reliées à l'appareil de mesure qui analysera les données à l'aide d'un logiciel de modélisation ([Smith et al 2009](#)). L'animal est anesthésié à l'isoflurane (AErrane[®], Baxter SA, Marepas, France) à 2,5% (v/v) dans l'oxygène, puis placé à plat sur l'abdomen sur une planche, les membres supérieurs et inférieurs à côté du corps, et la queue en prolongement vers le bas ; quatre électrodes sont placées sous la peau selon un axe antéro-postérieur (2 électrodes au niveau supérieur, 2 électrodes au niveau inférieur) (Figure 7).

Principe de l'impédancemétrie : L'impédance est la résistance que subit un courant alternatif pour traverser un milieu conducteur. Le principe de l'impédancemétrie repose sur la mesure de la résistance du corps au passage d'un courant alternatif de faible intensité (500 à 800 micro-ampères), cette résistance étant inversement proportionnelle à l'eau corporelle totale, elle-même corrélée à la masse non grasse, c'est-à-dire aux eaux et aux muscles, qu'on appelle « masse maigre ». Ce courant pénètre très facilement à travers le tissu musculaire mais rencontre une résistance plus importante dès qu'il faut traverser de la graisse. C'est la mesure de cette résistance qu'on appelle l'impédance et qui permet le calcul du taux de graisse corporelle en pourcentage du poids total du sujet. Le tissu graisseux présente donc une impédance électrique plus élevée que les autres tissus dans lesquels l'eau est un composant largement majoritaire. L'impédance électrique du corps est donc proportionnelle au pourcentage de graisse qu'il contient.

Expression des résultats : L'impédance électrique mesurée est rapportée à la masse du sujet (poids du corps le jour du sacrifice) et à sa taille (de la base de la tête au bout de la queue). Le résultat est calibré par le logiciel en fonction de l'âge et du sexe, pour donner, en pourcentage, la proportion de graisse dans l'organisme.

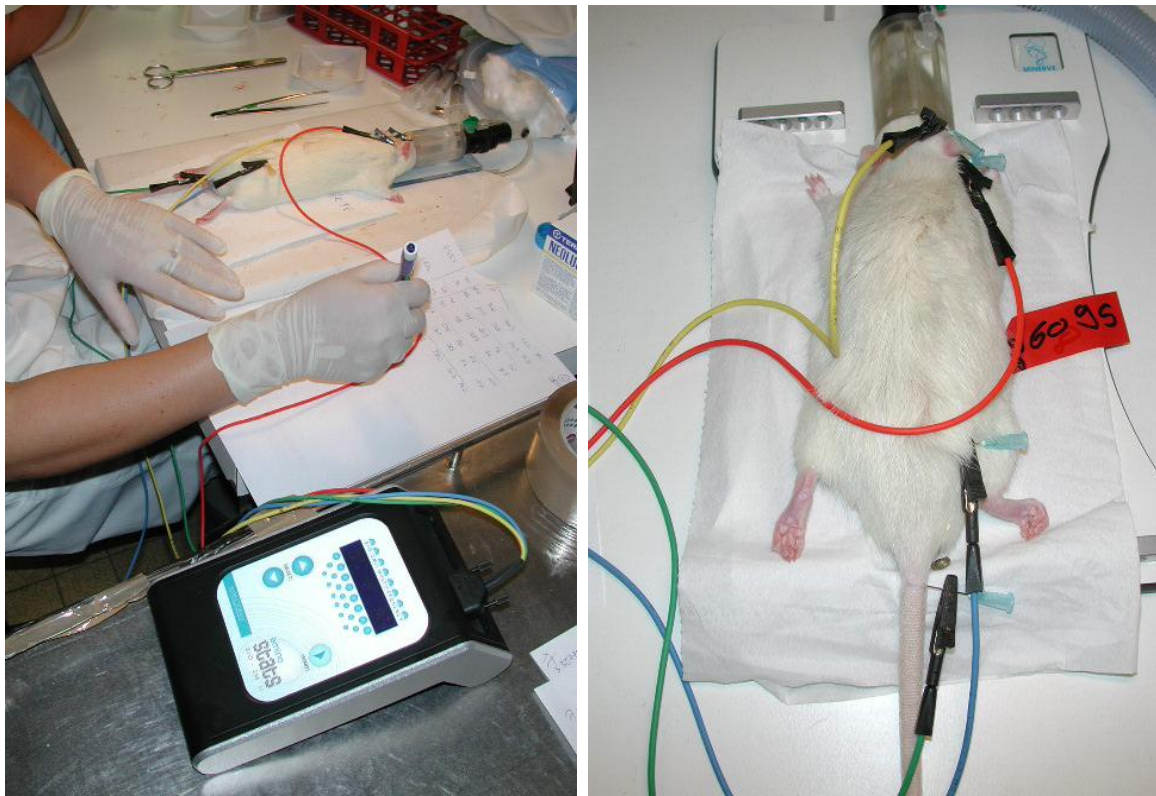


Figure 7 : Dispositif de mesure de la masse grasse

2.4.2. Modalités des sacrifices et prélèvements sanguins

Les rats anesthésiés à l'isoflurane (AErrane®, Baxter SA, Marepas, France) à 2,5% (v/v) dans l'oxygène sont euthanasiés par exsanguination. Le sang est prélevé par ponction à l'aorte abdominale et recueilli dans des tubes héparinés, le sérum est obtenu par centrifugation (9000 g, 10 min). Il est aliquoté par fraction de 500 μ L dans des tubes Eppendorfs et puis stocké à -20 °C pour les dosages sériques.

2.4.3. Prélèvements d'organes et conditions de stockages

Tous les ustensiles de prélèvement sont stériles et sont lavés dans du SDS et rincés dans de l'eau RNA free afin de préserver l'intégrité des échantillons pour l'analyse moléculaire en évitant toute détérioration par les RNase.

- Le tissu adipeux blanc (péri-gonadique, périrénal, viscéral, sous-cutané) est prélevé, pesé, et immédiatement conditionné pour les analyses : un premier échantillon du tissu adipeux

périgonadique est congelé rapidement dans l'azote liquide, puis congelé à -80°C pour réaliser les analyses moléculaires. Un deuxième échantillon du tissu périgonadique est immédiatement conservé dans une solution tamponnée de formaldéhyde 4% (Labonord, Templemars, France) pour l'analyse histologique.

- Les glandes salivaires submandibulaires : une incision est effectuée sous la mâchoire inférieure : le tissu adipeux sous-cutané est éliminé pour laisser apparaître la glande submandibulaire, qui a la forme d'un petit grain de haricot sur lequel est insérée la glande sublinguale, pas plus grosse qu'une lentille, mais légèrement plus sombre. Celle-ci est décrochée sous lampe binoculaire à l'aide d'un petit ciseau. Elles sont prélevées, pesées, puis la glande gauche est immédiatement placée dans des moules d'inclusion dans lesquels sont placé préalablement le milieu d'enrobage (OCT) et congelé rapidement dans de l'isopentane refroidi à -65°C (Système Histopath[®], Shandon, Pittsburgh, Etats-Unis) est conservée à -80°C jusqu'à l'analyse histologique. L'autre glande (droite) est conservée dans du RNAlater[®] (Ambion, Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) pour les analyses moléculaires.
- Le foie, le cerveau, et les autres glandes salivaires (sub linguale, parotide) sont également prélevés, pesés et immédiatement congelés à -80°C pour des analyses ultérieures par les équipes collaboratrices.

3. Analyse histologique, biochimique et moléculaire des organes

3.1. Etude du tissu adipeux

3.1.1. Analyse histologique (coloration à l'Hemalun/Eosine)

Les échantillons du tissu adipeux périgonadique préalablement inclus dans de la paraffine sont découpés au microtome ($5\ \mu\text{m}$ d'épaisseur) selon un axe antéro-postérieur, et coloré à l'Hemalun/Eosine.

- **Principe de coloration** : elle est basée sur une coloration nucléaire des substances basophiles par l'hématoxyline, et une coloration cytoplasmique (rose) par l'éosine (colorant acide). Cette coloration permet d'avoir une vue général et globale du tissu adipeux blanc péri-gonadique. Elle permet également de conclure si les cellules sont en hyperplasie et/ou hypertrophie par mesure de diamètre (μm) et d'aire (μm^2) (Figure 8).

Pour cela les lames sont observées sous microscope Nikon Eclipse 600 (Nikon, France) au grossissement $\times 10$ et des images sont prises avec une caméra DXM1200C (Nikon, version 5.03). Différents paramètres morphométriques sont mesurés : l'aire de l'adipocyte, la surface, le volume et la densité. Les images sont capturées avec le logiciel NIS-Element Br 3.0 (Nikon, France).

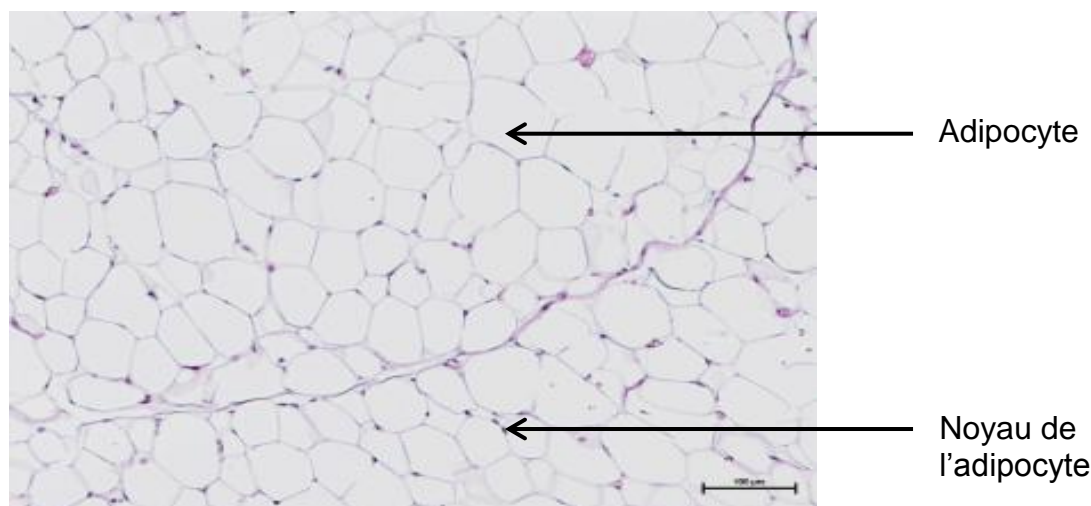


Figure 8 : Coupe histologique de tissu adipeux péri-gonadique (grossissement $\times 20$ -Coloration Hemalun/Eosine)

Pour chaque échantillon, 5-7 coupes ont été réalisées, et pour chaque coupe 8-15 photos ont été prises. Le diamètre (r), l'aire et le volume des adipocytes ont été calculés à partir de 10 mesures d'adipocytes prises au hasard pour chaque photo. Le volume est calculé en utilisant la formule $\frac{4}{3}r^3$ [r : rayon ou le diamètre de l'adipocyte ([Penza et al 2006](#))], tandis que la densité est calculée à partir du nombre des adipocytes par champ (10 non chevauchant), et les résultats sont exprimés en nombre d'adipocyte/ μm^2 . Les résultats sont exprimés en μm pour le diamètre de l'adipocyte, en μm^2 pour l'aire de l'adipocyte, en μm^3 pour le volume de l'adipocyte et en nombre d'adipocytes/ mm^2 pour la densité adipocytaire.

3.1.2. DNA acétylation dans le tissu adipeux (western-blot)

○ *Extraction des protéines du tissu adipeux blanc et western-blot*

Le tissu adipeux blanc est décongelé et immergé dans une solution tampon RIPA (Radio-Immuno-Precipitation Assay, 300 μL /échantillon) constitué de 150 mM de NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 1mM EDTA, 1% Triton \times -100, 1% acide déoxycholique, 0,1% dodécylsulfate de sodium (SDS), 1mM phenylmethanesulfonylfluoride (PMSF) ajouté extemporanément; 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de aprotinine ajouté extemporanément et 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de leupeptine ajouté extemporanément. Les tissus

sont ensuite homogénéisés à l'aide d'une bille en tungstène ajoutée à chaque tube Eppendorf placé dans le Tissue Lyser pendant 1 min à 30 Hz. Après une incubation de 10 minutes dans la glace, le lysat cellulaire total est centrifugé à 12000 g pendant 15 minutes à 4°C. Le surnageant est séparé des débris cellulaires, récupéré et stocké à -80°C. La concentration en protéines est déterminée par la méthode de Bradford ([Bradford 1976](#)). La gamme étalon est préparée avec de l'albumine de sérum bovin (BSA), préparée dans le même tampon de lyse que les échantillons et constituée de plusieurs concentrations allant de 0,2 à 2 µg/µL de BSA. Cinq microlitres de chacune des concentrations de la gamme et de chacun des échantillons sont déposés dans une plaque 96 puits (BD Biosciences, Pont-de-Claix, France) et 250 µL/puits du réactif de Bradford (Sigma, Saint-Quentin-Fallavier, France) sont ajoutés. Après une incubation de 30 minutes à température ambiante, l'absorbance est mesurée à la longueur d'onde 595 nm. Le témoin blanc est constitué du tampon de lyse avec le réactif de Bradford dont la mesure a été retranchée aux autres pour l'obtention de l'absorbance nette. La concentration en protéines de chacun des échantillons est calculée à partir de la droite-étalon.

Cinquante microgrammes de protéines/échantillon sont déposés sur une membrane PVDF 0,2 µM (BioRad). Après le transfert, le blocage des membranes est réalisé dans une solution TBS 1X 0,05% Tween 20, 5% lait écrémé (Régilait) pendant 1h. Les membranes sont rincées au tampon TBS 1X 0,05% Tween 20 puis incubées avec l'anticorps I, 16 h, sous agitation, à 4°C. Après 5 rinçages de 5 minutes avec la solution tampon TBS 1X 0,05% Tween 20, les membranes sont incubées pendant 1h30 à température ambiante avec l'anticorps II. Les membranes sont rincées 5 fois au moins 5 minutes avec le tampon TBS 1X 0,05% Tween 20 et révélées avec le kit de révélation Immun Star Western C (BioRad). Les images sont traitées par le logiciel Image Lab (BioRad). Les anticorps I utilisés sont l'anticorps anti-histone H4 acétylée (sur Lys8) (anti-lapin, 1:1000, Cell Signaling), l'anticorps anti-RPS9 (anti-lapin, 1:500, abcam); les anticorps II incluent l'anticorps oie anti-IgG de lapin (BioRad, 1:20000) ; les anticorps sont tous dilués dans du TBS 1X 0,05% Tween 20, ainsi que le StrepTactin-HRP (BioRad, 1:20000) pour la révélation du marqueur en luminescence (Precision Plus Protein Western C Standards, BioRad). Afin de déterminer les différences d'expression de l'histone acétylée H4, un ratio est calculé :

$$\frac{\text{Protéine d'intérêt (histone H4 acétylée)}}{\text{Protéine de référence (RPS9)}}$$

3.2. Etudes des glandes salivaires submandibulaires

3.2.1. Analyse histologiques

Les échantillons préalablement cryoprotégés dans de l'OCT sont découpés au cryostat (5 μm d'épaisseur) où la température du compartiment est de -20°C et celle de l'objet de -18°C . Les coupes sont effectuées selon un axe apical-basal, puis colorées grâce à la coloration Trichromique de Masson (variante au Vert Lumière).

- **Principe de coloration** : elle est basée sur une coloration nucléaire bleu/violet grâce à l'hématoxyline et une coloration cytoplasmique rose-rouge par un mélange de colorants acides (fuchsine acide et rouge ponceau) et une coloration spécifique des fibres conjonctives (collagène) par un autre colorant acide : le Vert Lumière.

Les coupes sont observées sous microscope optique (Nikon Eclipse E 600 ; objectif $\times 10$) doté d'une caméra digitale DXM1200C (Nikon, version 5.03). La prise de photo s'effectue à l'aide d'un logiciel d'acquisition (NIS-Eléments BR 3.0) (Figure 9). Pour chaque rat, 8 photos ($\times 10$) sont prises au hasard dans des zones distinctes non chevauchantes. Chaque photo est analysée par le logiciel Visilog version 6.9 à partir duquel a été créé un programme spécifique pour analyse morphométrique.

Différents paramètres morphométriques sont mesurés : la surface des canaux excréteurs CGT (μm^2), la surface totale des acini (μm^2), le nombre moyen des acini et la surface moyenne d'un acinus (μm^2). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM.

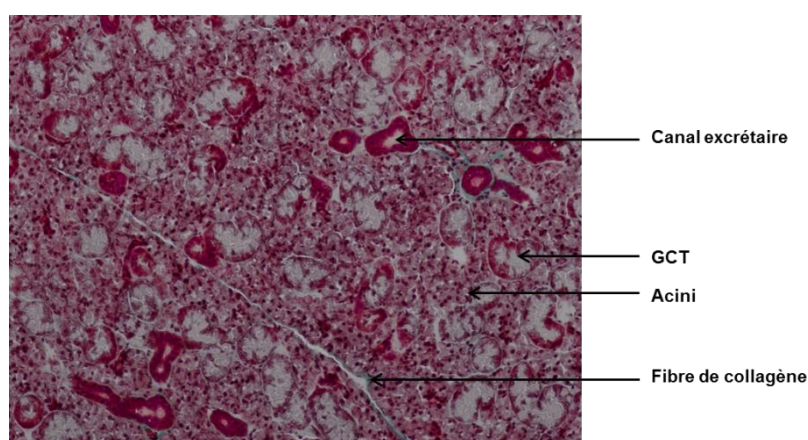


Figure 9 : Coupe histologique de glande salivaire submandibulaire (grossissement $\times 10$ Coloration Trichrome de Masson)

3.2.2. Analyse moléculaire par RT-PCR des glandes submandibulaires

L'effet des perturbateurs endocriniens sur l'expression des gènes de la glande submandibulaire impliquée dans les processus gustatifs est étudié par RT-PCR relative en temps réel.

3.2.2.1. *Extraction d'ARN*

Les ARN totaux sont extraits à partir d'échantillons broyés (Tissue Lyser, Qiagen) (fréquence et durée varient en fonction de la nature du tissu à analyser) dans 1 mL de TRIzol[®] (Invitrogen[™]), selon les instructions du fabricant. Après dissociation des complexes nucléoprotéiques (5 min à température ambiante) et ajout de 200 µL de chloroforme, les échantillons sont agités pendant 15 secondes, à une fréquence de 15 Hz à l'aide du Tissue Lyser, (Qiagen). Les échantillons, laissés 3 min à température ambiante, sont ensuite centrifugés 15 min à 12000 g et à 4°C. La phase aqueuse supérieure contenant les ARN est récupérée et les ARN sont précipités par addition de 500 µL d'isopropanol (Sigma) puis concentrés par centrifugation (10 min à 12 000 g et à 4°C). Le culot d'ARN est lavé deux fois par l'ajout de 1 mL d'éthanol à 75% (Sigma) suivi d'une centrifugation (5 min à 7500 g et à 4°C) avant d'être séché et repris dans de l'eau ultra pure stérile pour biologie moléculaire exempte de RNases. La quantité et la pureté des ARN sont déterminées par spectrophotométrie au NanoDrop ND-1000 (Labtech, France) à trois longueurs d'ondes 230 nm, 260 nm et 280 nm. La DO_{260nm} détermine la concentration en ARN (1 unité DO à 260 nm correspond à 40 µg d'ARN /mL). Deux rapports permettent de voir la pureté : le rapport DO_{260 nm}/DO_{280 nm}, idéalement autour de 1,8 et en deçà, il montre que l'échantillon est contaminé par des protéines et le rapport DO_{260 nm}/ DO_{230 nm}, de l'ordre de 2,2 permet de déterminer s'il y a ou non contamination par des composés du tampon d'extraction.

La qualité des ARN totaux est évaluée également par une micro-électrophorèse sur puce (Experion[®], Biorad). Les échantillons sont déposés sur une puce (1 µL d'ARN), qui comporte des petits canaux dans lesquels une matrice contenant un composé fluorescent est insérée et les molécules migrent sous l'action d'un champ électrique. Cette technique permet d'obtenir un gel d'électrophorèse virtuel ainsi que pour chaque échantillon un profil de fluorescence en fonction du temps. La qualité des ARN est basée sur la présence de deux ARN ribosomiques, le 28S et le 18S. Sur un profil idéal, le pic 28S doit être environ deux fois plus élevé que le pic 18S. Le logiciel donne aussi la concentration et chiffre la qualité de l'ARN par un indice, le RQI (RNA quality indicator). Un ARN de bonne qualité présentent un RQI proche de 10 (Figure 10).

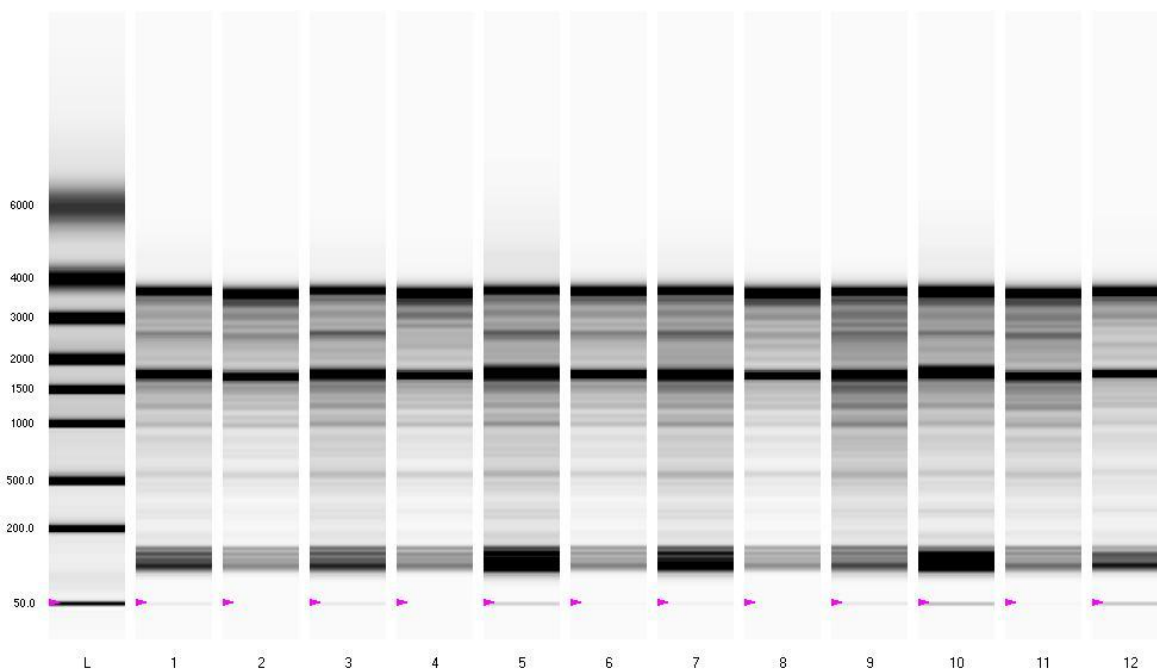


Figure 10 : Gel virtuel fourni par l'électrode automatisée de la puce de l'Experion™. La piste L (leader) contient des marqueurs de poids moléculaires. Les pistes 1 à 12 contiennent les échantillons à tester. On observe les bandes 18S et 28S respectivement entre 1500 et 2000 paires de bases (pb) ainsi qu'à 4000 pb.

3.2.2.2. *Transcription inverse*

Afin de produire le brin d'ADNc (AND complémentaire) à partir de l'ARN, il suffit de rajouter à une solution de 1 µg d'ARN digéré dans un volume total de 11 µL, 4 µL de tampon 5x (Kit iScript, qui contient à la fois des oligo dT, des dNTP et des hexamères aléatoires), 4 µL d'eau exempte de RNase et, 1 µL d'enzyme Reverse Transcriptase (iScript, BioRad), pour avoir un volume final de 20 µL. La réaction de transcription inverse s'effectue selon le programme suivant : (1) 5 minutes à 25°C ; (2) 30 minutes à 42°C et (3) 5 minutes à 85°C.

L'ADNc obtenu est à 50 ng/µL et est dilué au 1/5. Par conséquent, 80 µL d'eau sont ajoutés puis les échantillons sont conservés à -20°C. L'expression des ARNm est donc mesurée sur la base des ADNc correspondants qui subissent une amplification par PCR.

3.2.2.3. *PCR en temps réel*

- **Principe :** La PCR ou l'amplification enzymatique *in vitro* est une technique qui permet la quantification relative du taux d'expression (ou transcription) d'un gène cible par rapport à celui d'un gène de référence (gène de ménage = housekeeping gene). Elle est basée sur l'utilisation cyclique

d'une ADN polymérase qui fonctionne avec un oligonucléotide comme amorce et un brin d'ADN comme matrice pour obtenir une séquence nucléotidique spécifique (d'environ une centaine de paires de bases). Mais à l'inverse d'une PCR classique où l'analyse des résultats se fait par la mesure de la quantité de produit formé après un nombre de cycles prédéfinis, la PCR temps réel permet la détermination d'un cycle seuil (Ct : cycle threshold = cycle seuil) pour lequel le produit de PCR atteint une quantité donnée. Pour cela, un fluorophore (SYBR Green I, BioRad) est utilisé, avec comme principe: un signal qui augmente proportionnellement avec la quantité de produit amplifié au cours de la réaction (Figure 11).

Ainsi, au cours de l'étape de PCR, l'incorporation d'un fluorophore permet la quantification et le suivi en temps réel de la quantité de produit d'amplification néoformé. Par analyse statistique, il est ensuite possible de déterminer le taux relatif d'ARNm cible par rapport à un ARNm de référence comme l'ARN 18S ou l'ARN RPS9 (Ribosomal Protéine S9).

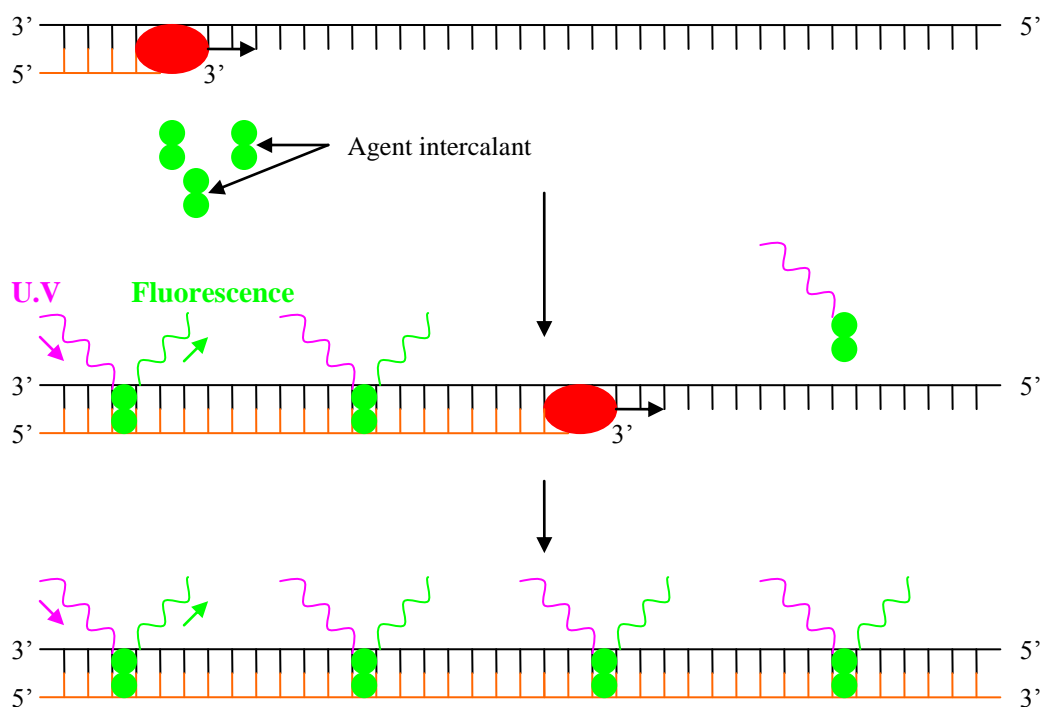


Figure 11 : Mode d'action d'agent intercalant type SYBRTM Green I

- Méthode : plusieurs gènes qui s'expriment dans la glande salivaire submandibulaire ont été sélectionnés pour cette étude, d'après l'article de ([Nashida et al 2010](#)). Les séquences des amorces

sont représentées dans le tableau 2. Ils ont été synthétisés par Eurogentec (Angers, France) selon des séquences publiées précédemment ([Nashida et al 2010](#)), ou dessinées à l'aide d'un logiciel (Beacon Designer, Biosoft).

Tableau 2 : Séquences des paires d'amorces oligonucléotidiques utilisées pour l'amplification par PCR en temps réel des ADNc des gènes recherchés dans les glandes salivaires submandibulaires :

Gènes	Primer	Séquences
Amylase 1 (Amy1)	Sens	5' AGAGGAAACAAAGGCTTCATTG 3'
	Antisens	5' GGAAGACCAGTCTGTAGAGTTGTTG 3'
Péroxydase (Gpx1)	Sens	5' GGTTCGAGCCCAACTTTACA 3'
	Antisens	5' CGGGGACCAAATGATGTACT 3'
Anhydrase Carbonique 6 (AC6 ou Gustine)	Sens	5' GAGAAGGGATGTGGGTGAGA 3'
	Antisens	5' GGAGGTTCCGGGTGATTTAT 3'
Cystatine C (CstC)	Sens	5' TGGTGAGAGCTCGTAAGCAG 3'
	Antisens	5' TTGCAGCTGGATTTTGTGAG 3'
Kallicréine 1 (KLK1)	Sens	5' CTGTGTGCAGGAGAGATGGA 3'
	Antisens	5' CACTCAGGGGTTTTTCCTTCA 3'
Kallicréine 3 (KLK3)	Sens	5' CACACCCGAAAACCTAAGGA 3'
	Antisens	5' GGTGGATGTTACACACTGG 3'
Mucine 10 (Muc10)	Sens	5' GCCAAAACCACATCCATACC 3'
	Antisens	5' TATATCCTGGAGGGCAGACG 3'
AR	Sens	5' ACCATATCTGACAGTGCCAAGGAG 3'
	Antisens	5' TCCAGTGCTTCCACACCCAAC 3'
ER α	Sens	5' TCCAGCAGCAGCGAGAAGG 3'
	Antisens	5' GTCGTTACACACAGCACAGTAGC 3'
ER β	Sens	5' GAGGCAGAAAGTAGCCGGAA 3'
	Antisens	5' CGTGAGAAAGAAGCATCAGGA 3'
EGF	Sens	5' TTGAAAGGATTTGCTGGCGATGG 3'
	Antisens	5' TGGACGAGGTGGGAGGACGG 3'
Superoxyde Dismutase 1 (SOD1)	Sens	5' CGGATGAAGAGAGGCATGTT 3'
	Antisens	5' CACCTTTGCCCAAGTCATCT 3'
18S (gène de référence)	Sens	5' ACTCAACACGGGAAACCTCACC 3'
	Antisens	5' TCGCTCCACCAACTAAGAACGG 3'
RPS9 (gène de référence)	Sens	5' GCAAGCAGGTGGTGAACATTCC 3'
	Antisens	5' CCATAAGGAGAACGGAGGGAGAAG 3'

En pratique, la réaction de PCR en temps réel est réalisée sur 5 μ L d'ADNc préparé à partir 1 μ g d'ARN totaux. Le mélange comprend pour un tube, 12,5 μ L de supermix iQ SYBR Green (Supermix Bio-Rad), 1 μ L de primer sens (0,4 μ M en concentration finale); 1 μ L de primer antisens (0,4 μ M en concentration finale). Le mélange est ajusté à un volume final de 20 μ L avec de l'eau Nucleasase-free. Sur la plaque sont déposés 20 μ L du mélange réactionnel et 5 μ L d'ADNc (soit 50 ng d'ADNc). Tous les échantillons sont effectués en duplicata, l'ADN est amplifié

Les échantillons sont ensuite incubés avec le programme suivant : (1) 3 minutes à 95°C sur 1 cycle ; (2) 10 secondes à 95 °C, puis 30 secondes à 60°C sur 40 cycles. Lors de cette étape, la lecture de la fluorescence est effectuée. (3) 1 minute à 95 °C sur un cycle ; (4) 1 minute à 55 °C ; (5) 10

secondes à 55 °C sur 81 cycles ; grâce à cette étape nous réalisons une courbe de fusion afin de vérifier qu'un seul produit a été amplifié.

L'indicateur fluorescent permet aussi de déterminer une courbe de fusion qui peut être représentée sous forme de dérivée première de la diminution de fluorescence par rapport à la température (Figure 12). Elle permet de vérifier la spécificité des amorces. Si l'amplification est spécifique, il n'y aura qu'un seul pic (Figure 12). S'il y a une amplification non spécifique, il y aura plusieurs pics (Figure 12b) : il faut alors redéterminer des amorces plus spécifiques.

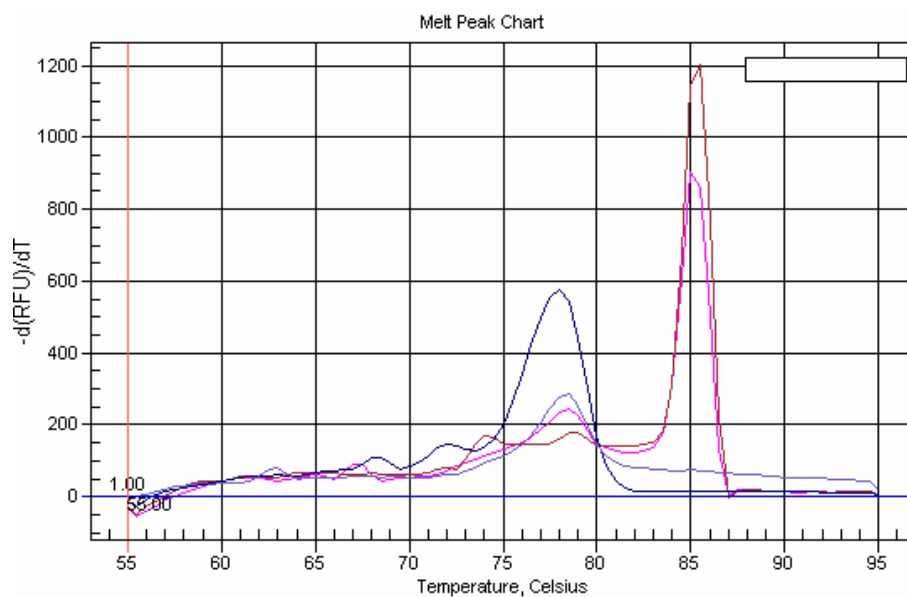
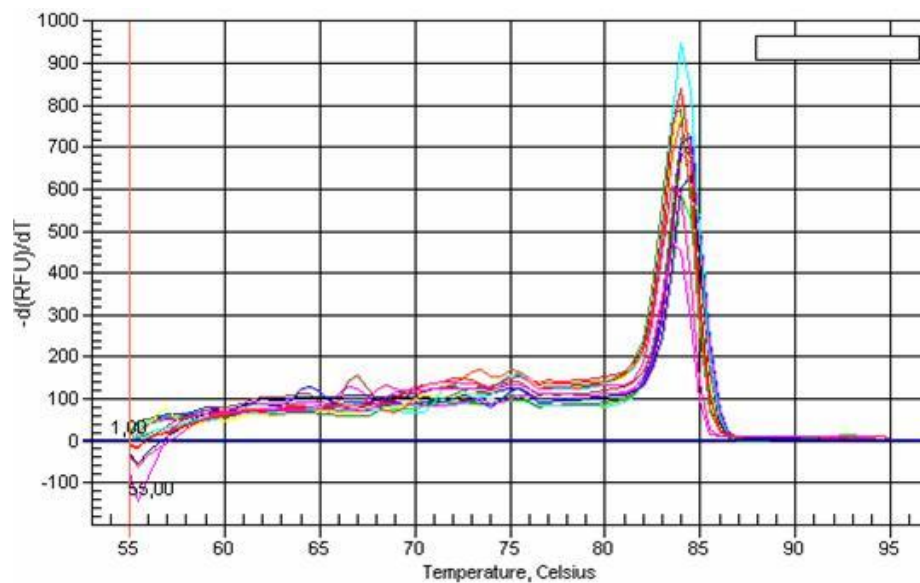


Figure 12 : Courbe de fusion : dérivée première de la fluorescence en fonction de la température.
a : Cas d'une amplification spécifique: un seul pic est observé.
b : Cas d'une amplification non spécifique : deux pics sont observés.

Pour chaque couple d'amorces, une courbe étalon est effectuée à partir d'une gamme comportant au moins cinq points. Elle est obtenue à partir d'un mélange de plusieurs échantillons d'ADNc de glandes salivaires de rats témoins à 50 ng/μL. Des dilutions en série sont effectuées pour obtenir neuf points de gamme allant de 250 ng à 0,016 ng. Pour un gène donné, la courbe standard rapporte les Ct obtenus en fonction du logarithme de la quantité d'ADN initial (ng). Cela permet de déterminer une efficacité (E) qui doit être comprise entre 90 et 110%. Cette efficacité est calculée en fonction de la pente de la courbe standard selon l'équation suivante :

$$E = (10^{-1/pente}) \times 100$$

Idéalement, la pente doit être de -3,3. Une efficacité correcte signifie que le couple d'amorces sélectionné est fonctionnel dans les glandes salivaires submandibulaires des rats au stade étudié, et donc qu'une PCR en temps réel peut être faite pour ce gène.

- **Analyse de résultats** : Il faut tout d'abord vérifier la stabilité du gène de référence. Pour cela, on utilise le logiciel Statistiqua qui réalise une analyse de variance (Anova) et une comparaison de moyenne des Ct obtenus chez le lot témoin et le lot traité (test de Dunett). Pour chaque traitement, la p-Value indique le degré de différence entre les deux lots. Plus la valeur de p se rapproche de 1 et plus l'expression du gène est stable car cela signifie qu'elle n'est pas affectée par le traitement. Lorsque $p \leq 0,05$, l'expression dans le lot traité est différente du contrôle et le gène ne peut normalement pas être utilisé comme gène de référence puisqu'il est affecté par le traitement.

Les résultats d'expression pour chaque gène d'intérêt sont ensuite analysés avec le logiciel REST[®] qui prend en compte le ou les gènes de références retenus comme valide. Grâce à un modèle mathématique, ce logiciel établit une analyse statistique de la variance et une comparaison des moyennes de chaque lot traité par rapport au lot témoin. L'expression des ARNm codant pour les gènes d'intérêt est normalisée par rapport au gène de référence qui sert de standard interne, dans notre cas RPS9. Les résultats sont exprimés en valeur relative donnée par un ratio R qui prend en compte l'efficacité et la différence de Ct entre témoin et traité, selon l'équation suivante (Pfaffl) :

$$R = \frac{(E_{gène\ intérêt})^{\Delta Ct_{gène\ intérêt\ (témoin-traité)}}}{(E_{gène\ réf})^{\Delta Ct_{gène\ réf\ (témoin-traité)}}$$

Puis, ce logiciel effectue un test aléatoire qui extrapole ces résultats à un plus grand nombre d'essais (2000 essais) issus des différentes combinaisons témoin par rapport aux traitements. Puis, il réalise l'analyse statistique sur cette extrapolation et fournit des résultats sous forme d'un histogramme pour lequel la ligne de base correspond au témoin (niveau 0).

4. Dosage biochimiques

4.1. Dosage de leptine

La leptine sérique est dosée par spectrophotométrie à l'aide du kit ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay). Une quantité de 20-80 μL de sérum est ajoutée aux puits de la microplaque qui sont déjà tapissés avec un anticorps de capture capable de lier spécifiquement l'antigène recherché selon les instructions du fabricant (Mediagnost, Allemagne). La concentration de leptine est mesurée par spectrophotométrie ($\lambda = 450 \text{ nm}$, filtre de référence $\geq 590 \text{ nm}$) au lecteur de plaque Victor3V (Perlin Elmer, Courtaboeuf, France). Les résultats sont exprimés en (pg/mL).

4.2. Dosage de l'EGF (Epidermal Growth Factor)

L'EGF sérique est dosée par spectrophotométrie à l'aide d'un kit ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay). Les plaques ELISA 96 puits sont cotées la veille avec l'anticorps de capture de l'EGF. 100 μL de sérum sont rajouté dans les puits en duplicate, selon les instructions du fabricant (PeproTech, France). La concentration de l'EGF est mesurée par spectrophotométrie ($\lambda = 405 \text{ nm}$, filtre de référence $\geq 590 \text{ nm}$) au lecteur de plaque Victor3V (Perlin Elmer, Courtaboeuf, France). Les résultats sont exprimés en (pg/mL).

4.3. Dosage des marqueurs métaboliques

Le cholestérol, Cholestérol-HDL (high-density lipoprotein), Cholestérol-LDL (low-density lipoprotein), Glu PAP sont mesurés à l'aide d'un analyseur biochimique COBAS-MIRA+ (Service phénotypage, Anexplo- Toulouse). Une petite quantité de sérum (2,4-3 μL) est nécessaire pour chaque type de dosage qui est basé sur une méthode spectrophotométrique. Les résultats sont exprimés en (mmol/L).

5. Modulation de l'adipogenèse sur modèles cellulaires *in vitro*

Le but de cette étude est d'identifier les effets des xéno-hormones sur l'induction de la différenciation adipocytaire et de suivre l'activité endocrine de l'adipocyte. Ces conditions *in vitro* rappellent les conditions de mise en place du tissu adipeux aux stades précoces de la vie.

5.1. Culture cellulaire

La lignée cellulaire 3T3-L1 de préadipocytes d'embryon de souris provient de l'American Type Culture Collection (ATCC- LGC Promchem, Molsheim, France).

5.1.1. Amplification et maintenance de la culture

Les cellules sont cultivées dans des flacons T75 contenant 10 mL de milieu DMEM à forte concentration en glucose supplémenté en GlutaMAXTM (2 mM), en pyruvate de sodium (1 mM), et en SVF gold (10% ; v/v). Elles sont incubées à 37 °C, sous atmosphère humide avec 10,2% (v/v) CO₂ pour maintenir un pH physiologique de 7,35. Le milieu de culture est renouvelé toutes les 48 h jusqu'à l'obtention d'une monocouche confluente. Les cellules sont ensuite rincées deux fois par 5 mL de PBS. L'adhérence au flacon est rompue par digestion enzymatique avec 3 mL de trypsine. L'excès de trypsine est enlevé après 2 à 3 minutes d'attente à température ambiante. Les cellules sont remises en suspension dans le milieu de culture complet, comptées et réparties dans de nouveaux flacons selon un taux d'ensemencement de 2×10^6 cellules / flacon T75 (soit deux ou trois flacons) pour une croissance de 4-5 jours.

5.1.2. Ensemencement et induction de la différenciation et traitements

Au 9^{ème} passage, les cultures sont remises en suspension dans du milieu DMEM à haute teneur de glucose (4,5 g/L) et supplémenté en GlutaMAXTM (2 mM), en pyruvate de sodium (1 mM) et en sérum dialysé (10% ; v/v), ce sérum dialysé permet de s'affranchir de tout effet hormonal résiduel sur la différenciation adipocytaire, et sans rouge de phénol (qui a un effet oestrogénique). Elles sont ensuite ensemencées à une densité de 25 000 cellules/puits dans des plaques 24 puits, le milieu est renouvelé toutes les 48 h.

Les cellules sont amenées à confluence dans du milieu DMEM sans rouge de phénol et supplémenté en sérum dialysé (10% ; v/v). À l'obtention d'une monocouche confluente, l'induction de la différenciation est provoquée par ajout d'un cocktail hormonal constitué d'IBMX 0,5 mM (concentration finale), de dexaméthasone 0,25 µM et d'insuline 1 µg/mL (Jour 0 de la différenciation). Deux jours plus tard (J2), le milieu de différenciation est remplacé par un milieu

supplémenté en sérum dialysé (10% ; v/v) et d'insuline 1 µg/mL pendant 2 jours de plus. Puis de J4 à J8, le milieu est uniquement supplémenté en sérum dialysé (10% ; v/v) et changé tous les deux jours (Figure 13).

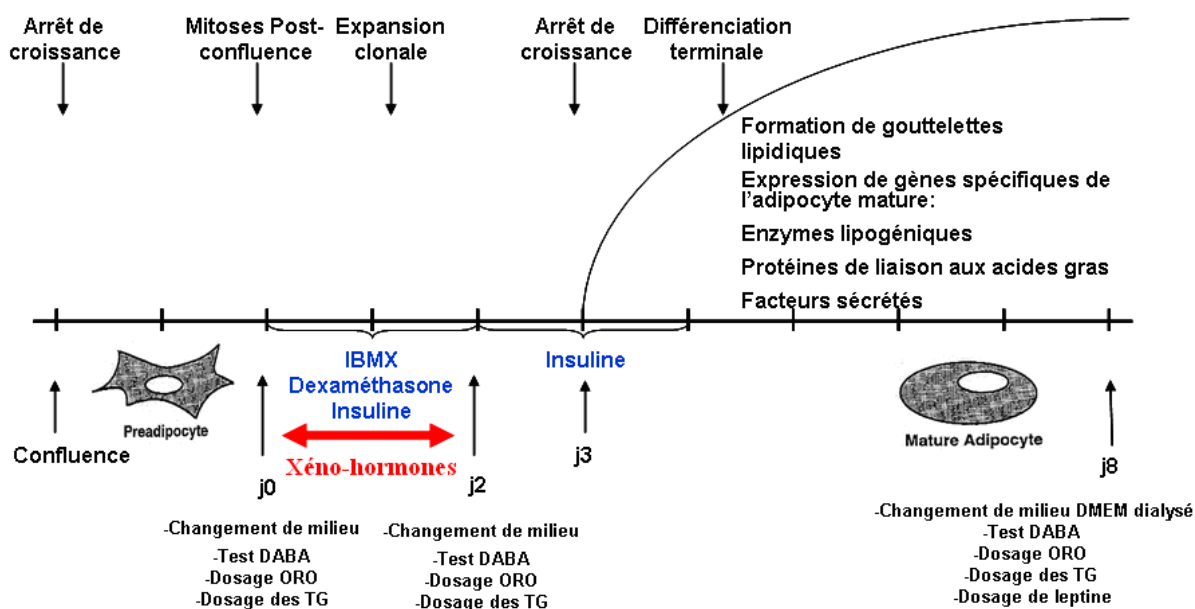


Figure 13 : Schéma expérimental d'exposition des 3T3-L1 aux xéno-hormones [(Ntambi & Young-Cheul 2000) avec modifications]

5.1.3. Traitements

Les traitements par les xéno-hormones ont été effectués pendant la phase d'induction de la différenciation adipocytaire (J0 à J2) et sont ensuite arrêtés. Les molécules ont été dissoutes dans du DMSO (0,1% ; v/v) et les doses testées sur la toxicité et la croissance cellulaire sont reportées dans le tableau 3.

Tableau 3 : Concentrations utilisées pour les traitements cellulaires :

Test	traitement	Gamme de concentration finale
Rouge neutre	Molécule seule (µM)	G : 25. 50. 80. 100 et 120 µM V : 0,01. 0,1. 1. 5 et 10 µM
	Mélange G/V (µM/µM)	25/1, 50/1, 80/1, 100/1 25/10, 50/10, 80/10, 100/10
Prolifération cellulaire	Molécule seule (µM)	G : 25 µM; V: 10 µM
	Mélange G/V (µM/µM)	25/0,1 µM. 25/1. 25/10.

5.2. Dosages biochimiques

5.2.1. Mesure de la toxicité par le test de rouge neutre

Le test du rouge neutre est un test d'exclusion qui permet d'évaluer la viabilité cellulaire : les cellules normales en culture absorbent et retiennent facilement le colorant. Des altérations de la membrane cellulaire ou celles des lysosomes de la cellule par une substance chimique perméabilise la membrane et permet la fuite du Rouge Neutre, les cellules apparaîtront plus claires. La quantité de teinture emprisonnée dans les lysosomes des cellules vivantes sera mesurée par spectrofluorimétrie ([Rat et al 1994](#)). La toxicité est évaluée au cours des deux premiers jours de traitement, c'est-à-dire au début de la différenciation.

A la fin des traitements (J2), les cellules sont rincées avec 1 mL de PBS puis incubées avec 1 ml de milieu sans SVF contenant $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de rouge neutre pendant 3 h à 37 °C, sous 10,2% (v/v) de CO₂. Elles sont ensuite rincées au PBS (1 mL/ puits) et le rouge neutre est extrait des cellules par ajout de 1 mL de mélange acide acétique/éthanol/eau (50/1/49 ; v/v/v) et placé sous agitation 30 min à l'obscurité. La fluorescence du rouge neutre est mesurée dans chaque puits ($\lambda_{\text{excitation}} = 535 \text{ nm} / \lambda_{\text{émission}} = 580 \text{ nm}$) au lecteur de plaques VICTOR³V (Perlin Elmer, Courtaboeuf, France). La quantité de rouge neutre correspondante est calculée par rapport à une gamme étalon de rouge neutre. Les résultats sont exprimés en pourcentage du témoin n'ayant été traité que par du DMSO 0,1%. Un composé est considéré cytotoxique s'il entraîne une viabilité cellulaire inférieure ou égale à 75% de celui du témoin DMSO.

5.2.2. Dosage de la quantité d'ADN par le test du DABA

Ce test permet d'apprécier la quantité de cellules dans la culture sur la base du taux global d'ADN. La quantité d'ADN dans les cellules à J0, J2 et J8 est mesurée par la méthode fluorimétrique du DABA. L'acide diaminobenzoïque dihydrochloride réagit avec le désoxyribose de l'ADN de façon hautement spécifique et produit un composé fluorescent sous haute température et à forte concentration en acide. A J0, J2 et J8, le milieu est aspiré puis les cellules sont rincées avec du PBS (1 mL/puits), et fixées par deux rinçages avec du méthanol (2x 500 μL). Les puits sont ensuite vidés et séchés sous hotte pendant 1 h. Chaque puits est rempli par 100 μl d'une solution de DABA à 0,30 g.mL^{-1} (une mesure de densité optique à 260 nm est nécessaire afin d'évaluer la concentration exacte en ADN de la solution) puis la plaque est incubée à l'étuve 1 h à 60 °C. L'agitation à l'obscurité pendant 10 min en présence d'acide chlorhydrique 1 N (1 mL/puits) permet de stopper la réaction. Les plaques sont lues en spectrofluorimétrie ($\lambda_{\text{excitation}}=405 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{émission}}=485 \text{ nm}$) sur le lecteur

FluoroLite 1000 (Dynatech, Hauts-de-Seine, France). Une gamme étalon d'ADN de thymus de veau allant de 0 à 10 µg/puits est utilisée pour la quantification d'ADN contenu dans chaque puits ([Kissane & Robins 1958](#)).

5.2.3. Dosage des lipides par coloration des lipides à l'Huile Rouge [Oil-red O (ORO)]

Les lipides synthétisés et accumulés par l'adipocyte au cours de sa maturation peuvent être visualisés après coloration spécifique par l'ORO ([Vankoningsloo et al 2005](#)), qui colore les lipides totaux en rouge. Les cellules sont rincées par 1 mL de PBS et fixées pendant 2 min avec 500 µL de paraformaldéhyde (3,7% ; m/v) dans du PBS. Elles sont ensuite incubées avec 0,5 mL/puits de solution d'ORO (0,5% ; m/v) dans une solution d'isopropanol/eau (60/40 ; v/v) pendant 30 min à température ambiante. Après 2 rinçages par du PBS (1 mL/puits), les puits sont photographiés pour visualiser l'intensité de la coloration. Puis, l'ORO est extraite des vacuoles adipocytaires par addition d'isopropanol (0,5 mL/puits) et agitation 15 min. La quantité d'ORO relarguée est mesurée par spectrophotométrie ($\lambda = 590$ nm) au lecteur de plaque Victor³V (Perlin Elmer, Courtaboeuf, France), et calculée par rapport à une gamme étalon d'ORO (0 à 5 g/L). Les résultats sont exprimés en (g/L).

5.2.4. Dosage des triglycérides intracellulaires

La quantité de triglycérides intracellulaires produite par les adipocytes est mesurée à l'aide du kit de dosage enzymatique (TG PAP 150, BioMérieux, France). Son principe repose sur la détection spectrophotométrique d'un composé coloré formé à partir d'un substrat et d'H₂O₂ : par hydrolyse enzymatique des triglycérides cellulaires où le glycérol libéré est phosphorylé puis oxydé avec formation concomitante d'H₂O₂. Les cellules sont rincées avec du PBS (1mL/puits) puis lysées par 3 cycles de congélation/décongélation (à -80 °C). Les puits sont ensuite incubés avec 1 mL de réactif enzymatique 5 min à 37 °C puis lus en spectrophotométrie au lecteur de plaques Victor³V (Perlin Elmer, Courtaboeuf, France), à 510 nm. La quantité de triglycérides est calculée par rapport à une gamme étalon de glycérol réalisée à partir du standard contenu dans le kit (0 à 2 g/L).

5.2.5. Dosage de la leptine

La leptine présente dans les sérums des rats traités (étude *in vivo*), ainsi que dans le milieu de culture à J8 (étude *in vitro*) est dosée par spectrophotométrie à l'aide du kit ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*). Les puits de la microplaque sont tapissés avec un anticorps de capture capable de lier spécifiquement l'antigène recherché selon les instructions du fabricant (Mediagnost, Allemagne). La concentration de leptine est mesurée par spectrophotométrie ($\lambda = 450$ nm, filtre de

référence ≥ 590 nm) au lecteur de plaque Victor³V (Perlin Elmer, Courtaboeuf, France). Les résultats sont exprimés en (pg/mL).

6. Analyses statistiques des données

Dans toutes les analyses statistiques des études *in vivo*, la portée est considérée comme l'unité de base (donnée expérimentale). Autrement dit, chacune des données analysées se réfère à une portée N, qu'il s'agisse de la moyenne des valeurs obtenues pour chaque animal d'une même portée, ou de la valeur obtenue pour un animal pris au hasard dans chaque portée (les données des femelles non prises sont éliminées lors des tests statistiques). Les résultats sont exprimés sous forme des moyennes \pm SEM (*Standard Error Mean*).

Suivi de la gestation et de la lactation : Le poids corporel, consommation de nourriture et prise d'eau pour les mères et la descendance ont été analysés au moyen de modèles mixtes pour prendre en compte la nature des données : mesures répétées. Pour chaque génération, les mesures concernant la période de gestation ont été analysées séparément des mesures portant sur la période de lactation, étant donné que la portée n'était pas conservée intégralement après la naissance. Dans toutes les analyses, la partie aléatoire du modèle inclut au moins un effet portée (ou mère) aléatoire pour tenir compte de la variabilité liée à la portée (respectivement la mère par ex). La partie fixe du modèle comprend les effets des facteurs « groupe de traitement » et « jour d'observation », ainsi que l'interaction groupe x jour. D'autres effets aléatoires ont été envisagés et successivement ajoutés lorsqu'ils étaient significatifs (test du rapport de vraisemblance): un effet linéaire du jour, ainsi qu'un effet quadratique, les jours étant codés 0, 7, 14, 21 ; L'ajout de ces termes aléatoires supplémentaires permet de tenir compte d'une variabilité des pentes ou courbures de la réponse , d'une portée à l'autre (respectivement d'une mère à l'autre) ([Pinheiro et al 2012](#)).

La durée de gestation, le nombre de nouveau-nés par portée, le nombre d'implantation embryonnaire, les pertes post implantatoires, le cannibalisme (%) et le sex-ratio font l'objet d'une analyse de variance (ANOVA) suivi d'une comparaison des moyennes (test de Dunnet) quand les conditions de normalité et d'homogénéité des variances sont respectées, et le cas échéant d'une analyse de variance non paramétrique (Kruskal-Wallis) suivi du test de Mann-Whitney. L'effet est considéré significatif pour des valeurs de $p < 0,05$.

Comportement maternel : La variabilité de chaque comportement maternel a été analysée au moyen d'un GEE (*Generalized estimation equation model*) avec une loi binomiale et une fonction de lien logit. Une structure de corrélation 'échangeable' a été choisie supposant une corrélation constante entre les observations réalisées à différentes occasions sur la même mère. Le premier modèle inclut un effet groupe, un effet linéaire du jour, un effet quadratique du jour, ainsi que les interactions entre groupe et effet linéaire et quadratique. Après avoir vérifié qu'aucune de ces interactions n'était significative, elles ont été supprimées du modèle, et l'effet principal groupe a été testé. L'effet est considéré significatif lorsque la valeur absolue de la statistique associée $-1,95 > z > 1,95$.

Comportements gustatifs : Les tests gustatifs ont été réalisés sur trois jours. L'analyse statistique des données a été analysée sur la base d'une analyse de variance qui prend en compte le caractère répétitif des mesures (ANOVA à mesure répétées) suivi d'une comparaison des moyennes (test de Newman-Keuls ou test de Dunnet), on considérant le traitement et le sexe comme des variables indépendantes. La significativité des effets a été considérée pour plusieurs valeurs de p (* : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$). En raison du nombre limité d'animaux, les effets présentant une tendance ($p < 0.1$) sont également précisés dans le texte.

Données d'observations et de mesures du sevrage à l'âge adulte (F1 & F2): Les données de croissance et développement relevées du sevrage à l'âge adulte, de même que toutes les données relatives aux analyses d'échantillons biologiques sont exprimées en valeur moyenne \pm SEM pour chaque groupe ; elles sont analysées indépendamment pour chaque sexe et pour chaque stade (un animal par portée/sexe/stade de développement). Lorsque les données prennent en compte plusieurs individus par portées (distance ano-génitale, ouverture vaginale), les analyses statistiques sont établies sur la moyenne \pm SEM de la valeur moyenne obtenue au sein de chaque portée (l'unité = portée).

L'index de la distance ano-génitale (AGD), et l'apparition de la puberté sont analysés séparément pour les mâles et les femelles sur la base d'une analyse de variance (Anova) suivie d'une comparaison des moyennes (test post-hoc : dunnet ou newman Keuls) quand les conditions de normalité et d'homogénéité des variances sont respectées, ou par une Anova non paramétrique de Kruskal-Wallis suivi du test de Mann-Whitney le cas échéant. Il en est de même pour l'analyse des données morphométriques (tissu adipeux, glandes salivaires), l'impédance-mètrie ainsi que les données issues des analyses biochimiques (western blots) et des dosages sériques.

Les données relatives aux études moléculaires (qPCR) ont été analysées par le logiciel REST qui est couplé aux appareils de mesure, qui prend en compte les gènes d'intérêts et les gènes de références (Cf. détail paragraphe qPCR). La validation des gènes de référence implique une expression stable et indépendante du traitement. Pour cela, une analyse de variance (Anova) et une comparaison de moyenne des Ct obtenus pour le gène de référence chez le lot témoin et le lot traité (test de Dunnett) est réalisée. Les gènes sont validés pour une valeur de $p > 0.1$. L'expression des gènes d'intérêt est ensuite rapportée à celle du gène de référence, la valeur donnée par ce rapport R prend en compte l'efficacité et la différence de Ct entre témoin et traité. Pour chaque groupe, les résultats sont exprimés en valeur moyenne des ratios \pm Ecart type et sont analysés par le logiciel REST© qui effectue par un test de randomisation ($n=2000$) et réalise l'analyse statistique sur cette extrapolation. La significativité des effets a été donnée pour plusieurs valeurs de p (* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$).

Etudes in vitro : Les essais en plaques multi-puits sont réalisés en triplet, et répétés sur 3 expériences indépendantes. Les résultats sont exprimés sur la base des moyennes \pm SEM (Standard Error Mean) obtenues à partir de la valeur moyenne des trois puits de chaque expérience. Les différences entre traitements cellulaires sont analysées sur la base d'une analyse de variance (ANOVA) suivie d'une comparaison des moyennes (test de Dunnett ou de Newman Keuls) quand les conditions de normalité et d'homogénéité des variances sont respectées, ou par test de comparaison multiple non paramétrique de Kruskal-Wallis suivi du test de Mann-Whitney le cas échéant. Le seuil minimum de significativité retenu est $p < 0,05$.

Les analyses de variances (Anova) et les comparaisons de moyennes (Dunnett, Mann-Whitney etc) ont été réalisées à l'aide du logiciel Statistica [version 10 (StatSoft, Maisons-Alfort, France)]. Le logiciel R a été utilisé pour les analyses au moyen d'un modèle linéaire mixte (nlme, Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R package version 3.1-103), et GEE (Generalized estimation equation model, <http://CRAN.R-project.org/package=gee>) avec une loi binomiale et une fonction de lien logit.

RESULTATS

CHAPITRE 1: CARACTERISATION DES EFFETS DU BPA LORS D'EXPOSITIONS CHRONIQUES A FAIBLES DOSES

Les précédentes études menées au laboratoire ont identifié des effets de la génistéine et de la vinclozoline, seule ou en mélange, sur les préférences gustatives dès des doses inférieures au mg/kg. Lorsque nous avons commencé ces travaux, il n'y avait aucune donnée sur les effets de très faibles doses de BPA sur les préférences gustatives. Cependant, quelques études mentionnaient des effets d'expositions précoces sur le développement de la glande mammaire ([Tharp et al 2012](#)) ([Vandenberg et al 2008](#)), l'appareil reproducteur mâle ([Salian et al 2009c](#)) ou le comportement ([Nakamura et al 2011](#)), en particulier sur le comportement maternel ([Palanza et al 2002b](#)) pour des doses d'expositions journalières inférieures ou voisines du µg/kg.

Avant d'aborder l'étude des mélanges, nous nous sommes attachés à caractériser les effets de faibles doses de BPA lors d'une exposition chronique chez l'adulte (*rats mâles et femelles F0 en gestation/lactation*) et lors d'une exposition continue (*F1 exposés de la conception à l'âge adulte*) sur des paramètres associés au comportement et au développement. Les effets ont été observés sur la progéniture F1 exposée depuis la conception via la mère à la plus faible dose (5 µg/kg PC/j) et sur la génération suivante non exposée (F2). Afin de préciser la nature de ces effets éventuels, nous avons complété notre étude en considérant en parallèle d'autres altérations phénotypiques associées au comportement et/ou au développement et pour lesquelles les effets du BPA à des doses inférieures à 50 µg/kg PC/j sont très discutés dans la littérature. On trouve des études qui concluent sur la présence d'effet du BPA sur des paramètres de reproduction telle que la fertilité ([Cabaton et al 2011](#)) ([Nanjappa et al 2012](#)) ([Salian et al 2009c](#)) ([Salian et al 2009b](#)), et d'autres qui concluent sur l'absence d'effet du BPA sur des paramètres de reproduction et de développement ([Cagen et al 1999](#)) ([Ferguson et al 2011](#)) ([Tyl et al 2002](#)) ([Tyl et al 2008](#)).

Dans cette optique, nous avons voulu confirmer la présence ou l'absence d'effet du BPA dans nos conditions, et plusieurs paramètres ont été pris en compte :

- Le comportement maternel a été observé sur les mères exposées seulement pendant la gestation (F0) et sur leurs filles, c'est-à-dire sur la progéniture exposée depuis la conception jusqu'à l'âge adulte (F1) à une très faible dose de BPA (5 µg/kg PC/j). Ces données sont attendues pour évaluer les effets à l'âge adulte après une exposition précoce.

- Les préférences gustatives ont été mesurées sur cette même progéniture F1 (exposée à 5 µg/kg PC/j) et sur la génération suivante F2 (non exposée), la littérature laissant entrevoir de possibles effets multi-générationnels. Une étude complémentaire prenant en compte les effets sur les préférences gustatives en fonction de la dose d'exposition a été menée chez le mâle adulte après une exposition de 6 semaines afin de préciser et de valider les effets faibles doses.
- Les effets du BPA sur la croissance et le développement ont également été observés sur les deux générations: ils permettent de statuer sur les effets hormonaux du BPA sur la F1 et d'évaluer d'éventuels effets multi-générationnels sur la F2.

Ce premier chapitre rapporte les effets du BPA sur le développement et le comportement et pour lesquels les résultats ont été acceptés pour publication (*Cf. annexe 2*) au journal «*The Laryngoscope*» (Etude effet dose du BPA sur les préférences gustatives chez le rat adulte) et soumis au journal «*Neurotoxicology and Teratology*» (Effets d'une exposition continue sur le développement, le comportement maternel et les préférences gustatives). Cependant d'autres paramètres propres au BPA tel que le bilan métabolique (glycémie, dosage sériques...etc.) et l'impédance-métrie...etc., ont été analysés ultérieurement et seront exposés dans le chapitre suivant pour être comparés aux effets des mélanges.

1. Modulation du comportement maternel

Contrairement aux études qui abordent les effets de faibles doses de BPA sur le comportement social et sexuel, les effets du BPA sur le comportement maternel sont moins étudiés. Ils ont été décrits chez la souris exposée à 10 µg/kg PC/j en fin de gestation ([Palanza et al 2008](#)) ([Palanza et al 2002b](#)), et chez le rat exposé à 40 µg/kg PC/j pendant la gestation et la lactation ([Della Seta et al 2005](#)). Dans les deux cas, une altération du comportement maternel est observée et suggère des effets sur les circuits neuronaux à l'âge adulte. Sur la base de ces données et des protocoles utilisés, notre objectif est de préciser les effets du BPA sur le comportement maternel dans nos conditions expérimentales. Comme décrit dans le chapitre précédent, nous avons pris en compte des activités associées au comportement maternel, et d'autres associées à des comportements dits « non maternels ».

1.1. Effet d'une exposition pendant la période de gestation et de lactation (F0)

Les conditions expérimentales se résument comme suit : les mères F0 sont exposées *per os* dès le premier jour de gestation et réparties en deux lots, un lot témoin recevant seulement l'huile de maïs, et un lot traité quotidiennement par le BPA à la dose de 5 µg/kg PC. Le comportement maternel est observé pendant les 8 premiers jours qui suivent la mise-bas (J1-J8), c'est-à-dire au cours de la quatrième semaine de traitement. L'action du BPA sur les quatorze activités qui définissent le comportement maternel est reporté dans le tableau 1.

Position par rapport au nid : l'observation de la position de la mère par rapport au nid (*Resting out/in side of the nest*) chez les mères traitées avec le BPA révèle plus de temps passé à l'extérieur du nid, donc loin de la portée. Elles sont donc moins actives auprès de leurs petits, ce qui se traduit par le fait qu'elles reconstruisent moins souvent leurs nids dans les cages (*Nest building*) (Tableau 1).

Position par rapport à l'allaitement: le comportement de la mère au cours de l'allaitement se définit selon trois types de positions: deux positions actives, i.e. « *arc-boutée* » et « *moyenne* », et une position « *passive* ». Chez les témoins, la position « *passive* » lors de la première semaine qui suit la naissance est peu fréquente ; la position « *arc boutée* », où les petits sont abrités sous l'animal, est légèrement plus adoptée que la position sur le flanc (*position moyenne*). Par contre, chez les mères traitées par le BPA, on constate une augmentation de la position « *passive* » au détriment des deux autres positions (Tableau 1). Les soins donnés aux petits traduisent l'attachement de la mère : toilettage, léchage de la région ano-génitale et transport des petits. Comparativement au lot témoin, l'exposition au BPA semble entraîner une baisse dans la fréquence des deux dernières activités (léchage ano-génital et transport d'un petit) bien que les effets ne se révèlent pas significatifs lors de l'analyse statistique [($p < 0,21$; $p < 0,20$) pour les comportements léchage ano-génital et transport d'un petit respectivement].

Comportement « non maternel » : il se caractérise par une importance plus grande d'activités de la mère en lien avec le milieu extérieur et non plus avec sa progéniture (exploration des cages par exemple). Dans notre étude, l'exposition des mères au BPA n'a pas affecté non plus de manière significative le comportement « *non maternel* », sur la base des activités telles que l'exploration ou le propre toilettage de la mère (Tableau 1).

Tableau 1: Effets d'une exposition gestationnelle (F0) et continue (F1) au BPA sur le comportement maternel.

Observations	F0		F1	
	Contrôle	BPA	Contrôle	BPA
Le nid				
<i>Repos dehors du nid</i>	53,57 ± 12,07	41,96 ± 11,80	17,85 ± 03,57	44,04 ± 02,75*
<i>Repos à l'intérieur du nid</i>	76,56 ± 02,28	77,34 ± 02,87	70,31 ± 03,28	45,31 ± 02,28
<i>Construction du nid</i>	37,50 ± 05,52	20,53 ± 04,56	39,06 ± 02,83	05,62 ± 05,14
La position d'allaitement				
<i>Arc-bouté</i>	47,32 ± 09,34	52,67 ± 05,87	96,42 ± 01,86	63,09 ± 07,55*
<i>Allaitement moyen</i>	35,15 ± 06,13	41,40 ± 05,40	29,76 ± 01,19	20,23 ± 07,55*
<i>Allaitement passif</i>	01,56 ± 01,02	03,12 ± 01,18	00,00 ± 00,00	01,19 ± 01,19
Soins des petits				
<i>Léchage des petits</i>	22,65 ± 02,62	22,65 ± 02,34	25,00 ± 03,34	18,75 ± 06,25
<i>Léchage ano-génital</i>	03,12 ± 01,67	01,56 ± 01,02	15,62 ± 03,91	12,50 ± 03,34
<i>Transport des petits</i>	08,03 ± 03,42	01,78 ± 01,16	10,93 ± 01,56	04,68 ± 02,28
Comportements non-maternels				
<i>Rearing</i>	22,32 ± 03,42	17,85 ± 03,81	17,18 ± 03,28	21,87 ± 03,12
<i>Exploration</i>	16,40 ± 02,87	12,50 ± 02,89	18,75 ± 04,09	14,06 ± 03,68
<i>Toilettage</i>	29,46 ± 05,47	33,03 ± 04,85	16,66 ± 03,44	51,19 ± 04,46
<i>Nourriture</i>	14,06 ± 02,83	08,59 ± 02,34	10,93 ± 04,97	12,50 ± 03,34
<i>Boisson</i>	04,46 ± 01,87	05,35 ± 02,61	06,25 ± 02,36	07,81 ± 03,28

Le BPA est administré quotidiennement *per os* à la dose de 5 µg/kg PC/j via la mère pendant la gestation et la lactation, puis directement tous les deux jours à partir du sevrage jusqu'à l'âge adulte. Le pourcentage des mères présentant le score **1** ou **0** pour une activité donnée a été moyenné pour chaque lot (n=12/lot pour la F0) (n=08/lot pour la F1). Les résultats sont exprimés selon la moyenne ± SEM de ces pourcentages. Les données ont fait l'objet d'une analyse de variance (Anova) au moyen d'un GEE (*Generalized estimation equation model*). Les valeurs indexées d'une * indiquent une différence significative par rapport au lot témoin (p < 0,05).

1.2. Effet d'une exposition chronique depuis la conception jusqu'à la date d'accouplement (F1)

Le comportement maternel des femelles F1 est observé comme précédemment lors de la première semaine de lactation. A la différence des mères F0, les femelles F1 ne sont pas traitées pendant la période de gestation, ni pendant la lactation, mais seulement depuis le premier jour de la

période utérine via la mère jusqu'au sevrage, puis directement *per os* tous les deux jours depuis le sevrage jusqu'à la veille de la mise en couple.

Dans l'ensemble les mères exposées présentent une baisse dans la construction du nid. Parallèlement, on note une baisse significative dans les positions d'allaitement dites actives (*arc-bouté et l'allaitement moyen*) [($z=-2,92$, $p=0,002$) ($z=2,84$; $p=0,004$) respectivement]), alors qu'aucune femelle n'a été observée dans la position passive dans le lot témoin (Tableau 1). Chez les animaux traités au BPA, on observe une tendance à réduire les soins donnés aux petits qui est apparemment associée à une augmentation des soins de la mère pour elle-même (Tableau 1). Cette baisse d'activité concorde avec une augmentation du repos en dehors de leurs nid, loin de leurs portées ($z=2,50$; $p=0,01$) et une augmentation de l'exploration de son environnement (Tableau 1).

1.3. Conclusion

Tandis que l'exposition au BPA à une très faible dose (5 µg/kg PC/j) a peu d'effet lorsque l'exposition est limitée à la période de gestation qui précède la mise bas, l'exposition chronique (de la conception à l'accouplement) à la même dose perturbe de manière significative le comportement maternel, et ce bien que le traitement soit interrompu dès le premier jour de leur gestation. Cette diminution de la prise en charge de la portée par les mères traduit une masculinisation comportementale des femelles qui pourrait avoir été programmée lors de l'exposition utérine.

Cette étude montre que la sensibilité des femelles au BPA pour une dose faible de 5 µg/kg PC/j varie selon la période d'exposition, et que les effets sont plus marqués lorsque l'exposition débute dès la conception. Elle confirme donc l'influence particulière d'une exposition précoce au BPA à faibles doses sur les troubles du comportement et justifie l'étude des effets potentiels du BPA sur les préférences gustatives à cette même faible dose.

2. Modulation des préférences gustatives

L'action des perturbateurs endocriniens sur les préférences gustatives est peu documentée et concerne un nombre limité de molécules. Cependant, la littérature rapporte l'action d'exposition prénatales en composés œstrogéniques (mélanges de PCBs ; nonyl phenol, méthoxychlor, arochlor) sur la consommation de sucré et/ou de salé et sur le dimorphisme sexuel qui leur est associé

([Ferguson et al 2000](#)) ([Flynn et al 2005](#)) ([Hany et al 1999](#)) ([Lilienthal et al 2005](#)). Une autre étude fait également état de l'impact du TCDD (2, 3, 7, 8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine) sur la sélection d'aliment gras chez des rats exposés ([Tuomisto et al 2000](#)). Sur la base de ces travaux, nous avons donc exploré les effets du BPA sur les préférences pour les goûts « sucré », « salé » et « gras » chez des animaux F1 issus de la même expérimentation. Les données relevées à l'âge immature visent à identifier les effets précoces (*i.e.* gestation/lactation) de l'exposition tandis que les effets observés à l'âge adulte visent à identifier les effets chroniques de l'exposition de la conception jusqu'à l'âge adulte. En parallèle, une étude effet-dose a été menée pour valider les effets faibles doses lors d'une exposition ciblée à l'âge adulte chez le rat mâle.

2.1. Effet d'une exposition chronique à l'âge adulte sur les préférences gustatives chez le rat mâle

Cette étude a été réalisée avec des rats mâles adultes qui avaient servi à l'accouplement des mères F0. Deux mois après l'accouplement, ils ont été répartis en 4 groupes (n=6), et traités avec le BPA à différentes doses pendant 6 semaines. Le bisphénol A était directement administré dans l'eau de boisson de manière à apporter 5 µg ; 50 µg ; 5 mg ou 12,5 mg/kg PC/j. Les tests de préférence au sucré, salé et au gras ont été effectués pendant la quatrième et la cinquième semaine de traitement.

a) Préférence au sucré : La consommation de sucré, évaluée sur la prise d'une solution de saccharine (0,3%) est diminuée par le BPA d'une manière inversement proportionnelle à la dose d'exposition (Figure 1.A1). Cette diminution est déjà significativement importante dès la plus faible dose d'exposition (- 22%) c'est-à-dire 5 µg/kg PC/j, mais elle est approximativement égale à celle observée à la dose 10 fois supérieure de 50 µg/kg PC/j. De même, les effets observés aux deux fortes doses sont quasiment identiques et présentent une diminution significative d'environ 66% par rapport à la consommation du lot témoin ($p < 0,05$; figure 1.A1). Cette diminution de la consommation de la solution sucrée s'accompagne d'une augmentation significative de la consommation d'eau, qui évolue proportionnellement à la dose de traitement ($p < 0,05$; figure 1.A2) sauf pour la dose la plus forte (12,5 mg/kg PC/j). En conséquence, ceci se traduit par une diminution de la préférence au sucré qui évolue selon une courbe inversement proportionnelle à la dose de traitement ($p < 0,05$; figure 1.A3). La figure 1 regroupe les effets obtenus sur la consommation d'une solution (saccharine, NaCl ou d'huile) et d'eau pure et la préférence qui en résulte en fonction de la dose d'exposition au BPA.

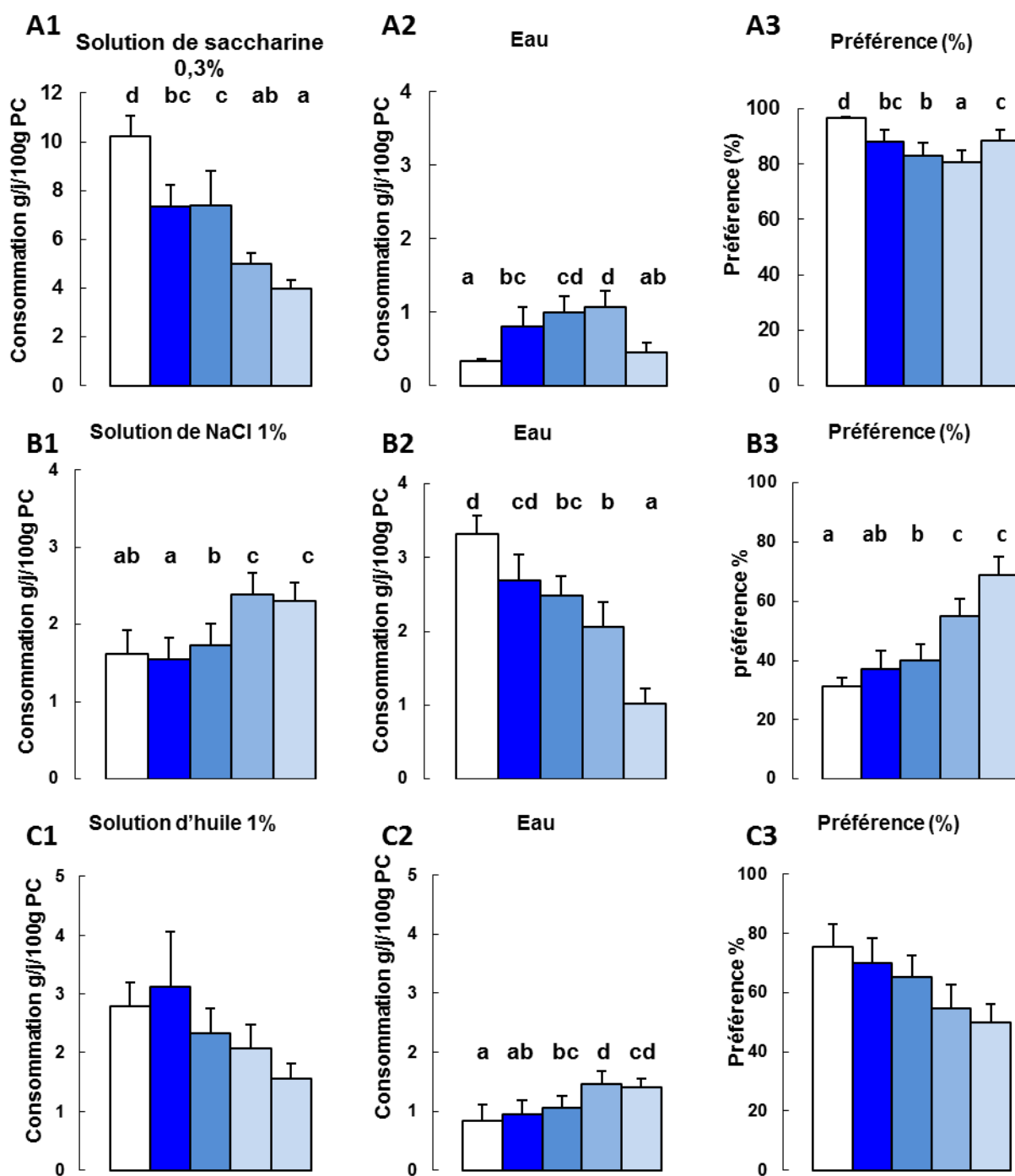


Figure 1: Effets du BPA sur les préférences au sucré (saccharine 0,3%), salé (NaCl 1%) et au gras (huile 1%) chez des rats mâles exposés à l'âge adulte. Le BPA est administré dans l'eau de boisson. Les résultats sont exprimés en valeur moyenne \pm SEM (n=6/groupe). Les valeurs ont fait l'objet d'une analyse de variance (Anova) suivie de comparaison des moyennes (test de Kruskal Wallis). Les lettres apposées sur les diagrammes indiquent des différences significatives entre chaque lot ($p < 0,05$). □ Contrôle ; ■ BPA 5 µg/kg PC/j ; ■ BPA 50 µg/kg PC/j ; ■ BPA 5 mg/kg PC/j ; ■ BPA 12,5 mg/kg PC/j.

b) Préférence au salé : La consommation au salé, évaluée sur la prise d'une solution salée (NaCl 1%) évolue de manière totalement opposée (Figure 1.B1). Sans effet significatif par rapport au témoin chez les animaux recevant les deux faibles doses, l'ingestion de BPA entraîne une hausse

significative et comparable de la consommation de sel chez les animaux soumis aux deux fortes doses d'exposition (+ 45%, $p < 0,05$; figure 1.B1). Parallèlement, on observe une diminution de la consommation d'eau qui est proportionnelle à la dose d'exposition, et cet effet apparaît significatif dès la dose de 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ PC/j. ($p < 0,05$; figure 1.B2). De fait, il en résulte une augmentation de la préférence au salé qui augmente de manière significative selon une courbe dose réponse. Ainsi, alors que les animaux témoins préfèrent consommer de l'eau pure, et donc présentent naturellement une certaine aversion pour l'eau salée, la présence de BPA dans l'eau de boisson oriente le choix gustatif vers la consommation de sel et la préférence atteint plus de 70% pour la plus forte concentration, et revêt le caractère d'une préférence anormalement forte pour le goût salé ($p < 0,05$; figure 1.B3).

c) Préférence au gras : La consommation de gras est souvent associée à des mets particulièrement sucrés ou salés. Dans nos conditions expérimentales, les animaux témoins sont naturellement attirés par l'émulsion d'huile à 1% et présentent une préférence supérieure à 70% (Figure 1.C3). L'exposition au BPA semble entraîner une diminution de la consommation de la solution grasse inversement proportionnelle à la dose d'exposition, mais ces effets ne sont pas significatifs selon l'analyse statistique des données (Figure 1.C1). Toutefois, cette baisse concorde avec une augmentation significative de la consommation d'eau ($p < 0,05$; figure 1. C2). Ceci se traduit par une baisse de la préférence au gras proportionnelle à la dose d'exposition. Cet effet n'est pas donné significatif au regard d'une analyse de variance (Anova), cependant, la comparaison des moyennes de chaque lot par rapport à la moyenne du lot témoin selon un test de Student indique un effet qui est significatif dans les lots exposés aux deux concentrations les plus fortes (5 mg/kg PC/j et 12,5 mg/kg PC/j) ($p < 0,05$; figure 1.C3).

En conclusion, cette étude préliminaire établit les effets d'une exposition orale sur les préférences gustatives au sucré, au salé et au gras qui évoluent selon la dose d'exposition. Dans nos conditions expérimentales, cet effet s'exprime très légèrement après 6 semaines d'exposition à la plus faible doses, *i.e.* celle qui se rapproche le plus de nos conditions d'exposition alimentaire, et cet effet n'apparaît pas statistiquement significatif. Toutefois, cette étude laisse entrevoir de possibles effets aux faibles doses d'exposition lors d'une exposition chronique plus prolongée, notamment lorsque celle-ci débute dès la période utérine.

Cette étude soutient donc la pertinence d'une étude des effets du BPA à la plus faible dose pour une exposition de la conception à l'âge adulte. Compte tenu du dimorphisme sexuel décrit pour les préférences au sucré et au salé, les effets sur les préférences gustatives (sucré, salé et gras) sont

effectués aux différents stades de développement (immature et adulte) pour les deux sexes (mâles et femelles).

2.2. Effet d'une exposition précoce (gestation/lactation) sur les préférences gustatives chez le rat immature au sevrage (J21-J25)

a) Préférence au sucré : A l'âge immature, la différence de consommation de saccharine et d'eau pure entre les mâles et les femelles est telle que le dimorphisme sexuel est très peu accentué, avec une préférence au sucré qui est de l'ordre de 75% pour les mâles et 70% pour les femelles (Figure 2. A3). En revanche, les mâles exposés au BPA, consomment à peu près la même quantité de la solution sucrée et d'eau que les témoins tandis qu'on note une diminution globale de la consommation des deux biberons chez les femelles (Figure 2. A1 et A2). Ceci a pour conséquence d'amoinrir le dimorphisme sexuel sur la prise de saccharine et d'eau. Toutefois la préférence au sucré n'est pas simultanément affectée et la différence de préférence entre les mâles et les femelles ne se traduit pas par une accentuation du dimorphisme sexuel (Figure 2. A3).

b) Préférence au salé : à l'âge immature les mâles et les femelles du lot témoin consomment la même quantité de la solution salée (Figure 2.B1), et les mâles comme les femelles préfèrent consommer de l'eau pure (Figure 2.B2). Dans le lot exposé au BPA, la consommation d'eau salée tend à augmenter chez les mâles au dépend de la consommation d'eau pure, ce qui a pour conséquence d'augmenter aussi la préférence. A l'inverse, chez les femelles, on note une légère diminution de la consommation d'eau salée qui n'est cependant pas compensée par une augmentation de la prise d'eau pure. Toutefois, on note une légère diminution de la préférence. Ces légères modifications du comportement ont pour conséquence d'accroître la différence de préférence entre les mâles et les femelles et de faire apparaître un dimorphisme sexuel significatif sur la préférence, les femelles préférant moins le salé que les mâles. ($p < 0,05$) (Figure 2.B3).

c) Préférence au gras : à l'âge immature les mâles et les femelles du lot témoin consomment beaucoup plus de solution grasse que d'eau pure et présentent une préférence de l'ordre de 70%. Les animaux exposés au BPA ne présentent pas de différence de consommation significative par rapport aux témoins. Il en résulte qu'une exposition au BPA n'affecte pas la préférence au gras (Figure 2.C3).

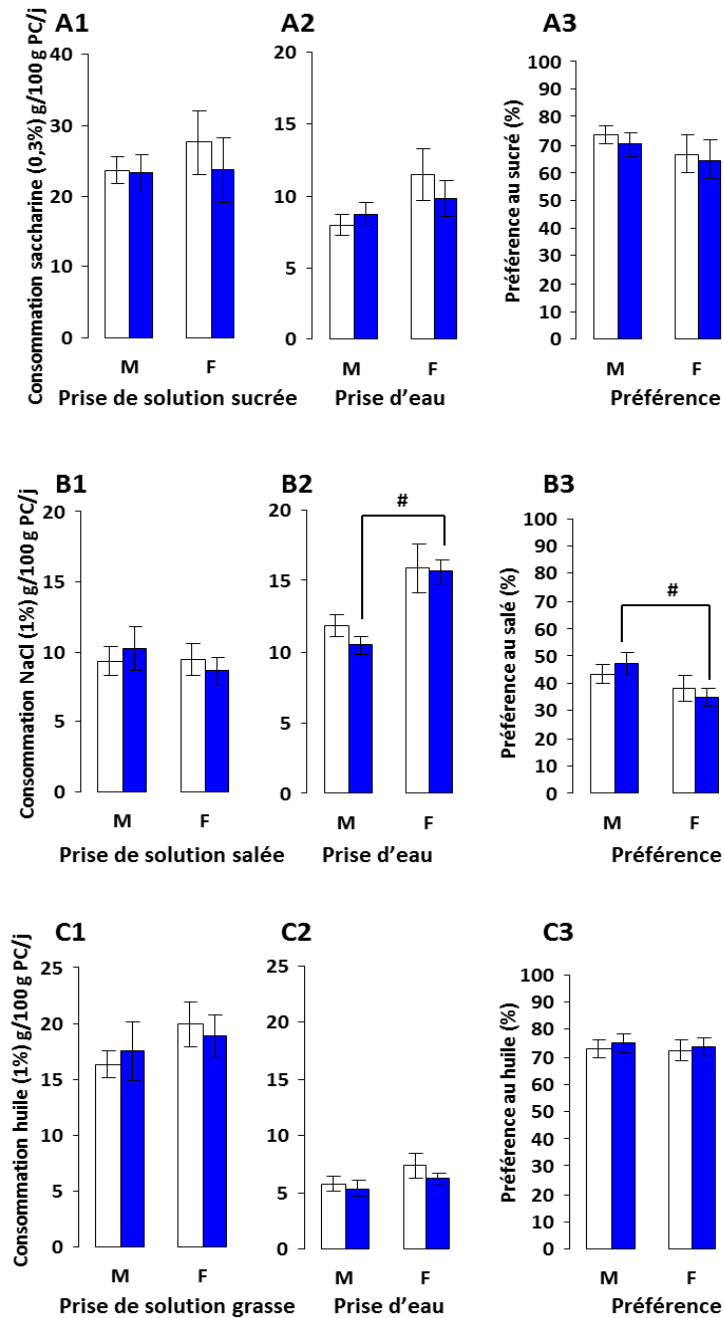


Figure 2: Effets du BPA sur les préférences au sucré (saccharine 0,3%), au salé (NaCl 1%) et au gras (huile 1%) chez des rats exposés *in utero*. Le BPA est administré quotidiennement *per os* à la dose de 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ PC/j via la mère pendant la gestation et la lactation. Les résultats sont exprimés selon la moyenne \pm SEM (n=12/sexe/groupe). Les données ont fait l'objet d'une analyse de variance (Anova mesures répétées). \square Contrôle \blacksquare BPA. # indique un dimorphisme sexuel dans l'un des groupes témoin ou BPA (P<0,05).

2.3. Effet d'une exposition continue de la conception à l'âge adulte sur les préférences gustatives du rat adulte (J100)

a) Préférence au sucré : comme le montrent les données d'observation du lot témoin, chez les mâles adultes, les consommations d'eau sucrée et d'eau pure sont plus faibles que celles relevées chez les animaux immatures, tandis que celles des femelles restent du même ordre de grandeur. Cette diminution chez le mâle n'étant pas compensée par une consommation d'eau pure, la préférence au sucré est équivalente pour les deux sexes et avoisine les 90%. Chez les animaux exposés au BPA, nous pouvons noter une diminution de la consommation de saccharine qui est plus forte chez les femelles que chez les mâles. Cette diminution s'accompagne d'une diminution de la consommation d'eau chez le mâle et d'une augmentation chez la femelle, et ces différences de consommation font apparaître un dimorphisme sexuel significatif sur la consommation d'eau pure ($p < 0,05$). Cependant, la diminution de la préférence qui en résulte est insuffisante pour entraîner un dimorphisme sexuel significatif sur la préférence au sucré chez l'adulte (Figure 3.A).

b) Préférence au salé : la consommation d'eau salée chez les mâles adultes est également inférieure à celle observée chez les mâles au sevrage, induisant tout comme pour le sucré un dimorphisme sexuel significatif ($p > 0,05$). Cependant, les mâles consomment davantage d'eau pure que d'eau salée, d'où une légère aversion (40%) tandis que les femelles consomment une quantité équivalente d'eau de telle sorte qu'elles présentent une préférence neutre (50%). Le BPA n'affecte pas la prise de salé, ni celle d'eau, et par conséquent non plus le niveau de la préférence. Cependant, ces faibles variations suffisent pour que le dimorphisme observé pour la préférence du salé devienne significatif dans le lot traité au BPA ($p < 0,05$) (Figure 3.B3).

c) Préférence au gras : contrairement aux saveurs précédentes, la consommation d'émulsion d'huile et d'eau est environ 3× plus faible chez les jeunes mâles mais aussi chez les jeunes femelles adultes que celles relevées chez les animaux immatures (Figure 3.C1), mais la préférence des animaux reste du même ordre (70%) et équivalente pour les deux sexes. L'exposition chronique au BPA n'affecte donc pas de manière significative la prise du gras, toutefois une légère diminution de la préférence se dessine pour les deux sexes (Figure 3.C3).

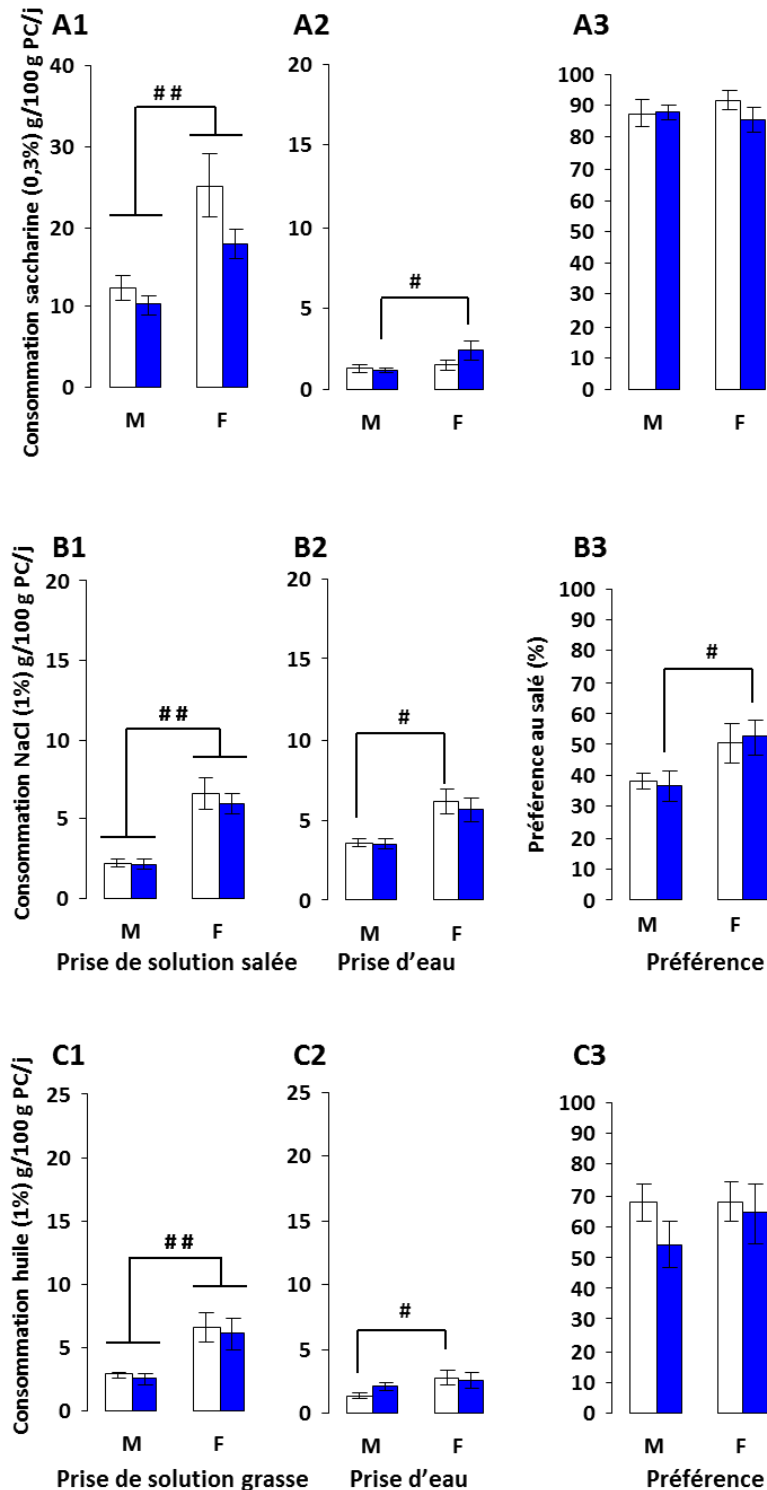


Figure 3: Effets du BPA sur les préférences au sucré (saccharine 0,3%), au salé (NaCl 1%) et au gras (huile 1%) chez des rats exposés de la conception à l'âge adulte (exposition continue). Le BPA est administré quotidiennement per os à la dose de 5 µg/kg PC/j via la mère pendant la gestation et la lactation, puis directement tous les deux jours à partir du sevrage jusqu'à l'âge adulte. Les résultats sont exprimés selon la moyenne ± SEM (n=12/sexe/groupe). Les données ont fait l'objet d'une analyse de variance (Anova mesures répétées). □ Contrôle ■ BPA. # indique un dimorphisme sexuel dans l'un des groupes témoin ou BPA. ## indique un dimorphisme sexuel dans les deux groupes témoin et BPA (P<0,05).

En résumé, la consommation d'eau sucrée, salée et huilée diminue avec l'âge chez les mâles mais reste constante chez les femelles, et ceci se traduit par un dimorphisme sexuel significatif chez l'adulte. Toutefois, mis à part pour la consommation d'eau salée, les effets du BPA n'ont pas de répercussions majeures sur les préférences. L'exposition au BPA à la faible dose de 5 µg/kg PC/j qui débute dès la conception n'a que des effets mineurs sur la consommation de ces saveurs et peu de répercussions significatives sur la préférence des jeunes adultes. Cependant, ces différences semblent s'accroître avec l'âge adulte. La diminution de la consommation à l'âge adulte touche surtout les femelles, dont la consommation se rapproche de celle du mâle.

2.4. Effet multi-générationnel d'une exposition continue à faible dose (conception-âge adulte) sur le dimorphisme sexuel des préférences gustatives de la progéniture non exposée (F2 J25/J100)

Afin de vérifier la possibilité de transmission des effets à la descendance (génération F2), les tests de préférence sont effectués pour les deux stades de développement (immature et adulte). Cette génération F2 est obtenue en croisant des mâles et des femelles F1 qui ont été exposés depuis la conception jusqu'au jour de l'accouplement. Les animaux F2 n'ont donc jamais été exposés au BPA.

a) Préférence au sucré : comme le montre la figure 4, dans le lot témoin, les animaux immatures de la génération F2 consomment davantage de solution sucrée que ceux de la génération F1, et cela se traduit par une plus grande préférence au sucré (près de 90%) pour les deux sexes. Ce phénomène est récurrent dans les expérimentations menées au laboratoire depuis une dizaine d'années : nous supposons que cette différence est associée à une différence de programmation foetale des mères F0 (nourries avec un régime standard de chez Harlan de la conception jusqu'au début de l'expérimentation) par rapport aux mères F1 (nourries au régime semi-synthétique L5 depuis la conception). De fait, nous considérons ces valeurs comme des valeurs témoins de référence pour la génération F2 dans nos conditions expérimentales.

Chez les descendants de sexe mâle du lot BPA, nous observons une légère baisse dans la prise de saccharine au stade immature par rapport aux témoins ; cette baisse cause l'apparition d'un dimorphisme sexuel significatif dans la consommation du sucré à l'âge immature ($p < 0,05$). Une baisse significative dans la prise d'eau est également observée chez les animaux des deux sexes ($p < 0,05$), avec un effet plus prononcé chez les femelles qui se traduit par un dimorphisme sexuel significatif pour la prise d'eau ($p < 0,05$). Cette différence inter-sexe pour les deux paramètres (prise

de saccharine et d'eau) provoque un dimorphisme significatif pour la préférence au sucré à l'âge immature des animaux issus de parents traités au BPA ($p < 0,05$) (Figure 4.A).

A l'âge adulte, le dimorphisme sexuel pour la consommation de saccharine est retrouvé dans le lot témoin et persiste dans le lot BPA, mais on peut noter une tendance à la diminution de la prise de saccharine. Cette diminution de la consommation est également constatée sur la prise d'eau, avec un effet significatif chez les femelles où l'on retrouve une différence inter sexe chez les animaux issus du lot BPA ($p < 0,05$). Néanmoins, aucun effet sur la préférence au sucré n'a été enregistré (Figure 4.B).

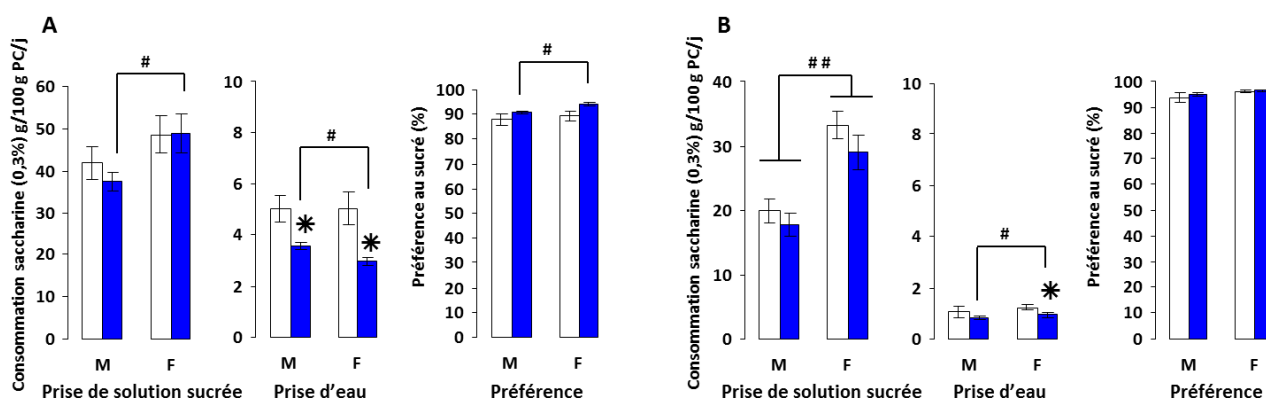


Figure 4: Effets du BPA sur les préférences au sucré (saccharine 0,3%) chez des F2 non exposés, A: immatures, B: Adultes. Les résultats sont exprimés selon la moyenne \pm SEM ($n=12/\text{sexe}/\text{groupe}$). Les données ont fait l'objet d'une analyse de variance (Anova mesures répétées). * indique une différence significative par rapport au lot témoin du même genre. # indique un dimorphisme sexuel dans le groupe témoin ou BPA. ## Indique un dimorphisme sexuel dans les deux groupes témoin et BPA ($p < 0,05$). □ Contrôle ■ BPA.

b) Préférence au salé : comme le montre la figure 5, à l'âge immature, les mâles comme les femelles consomment plus d'eau que de solution salée. Bien que les différences de consommation soient plus accentuées chez les animaux du lot BPA, aucun effet significatif du BPA sur la prise du salé n'est révélé lors de l'analyse statistique. Il en est de même en ce qui concerne la consommation d'eau, bien que la différence de consommation disparaisse, la différence inter-sexe est notée dans le lot témoin ($p < 0,05$). De ce fait aucun effet sur la préférence n'a été enregistré (Figure 5A).

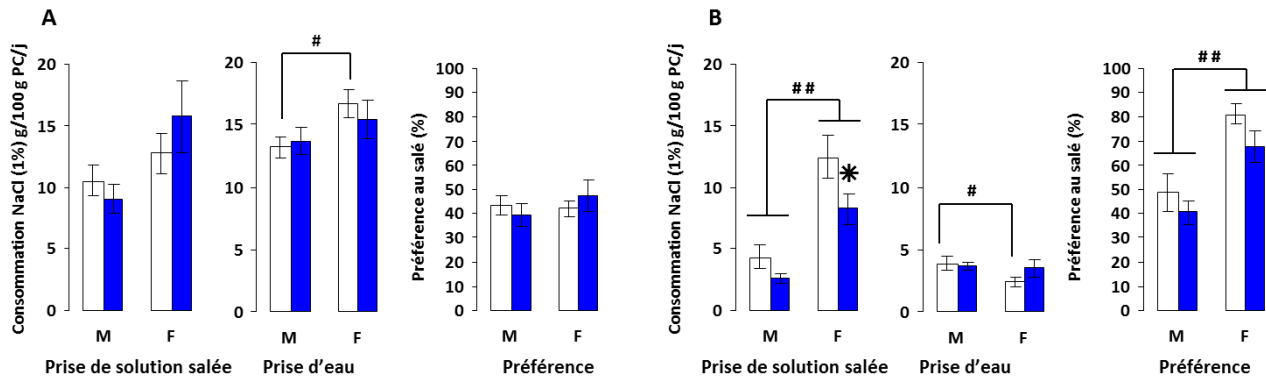


Figure 5: Effets du BPA sur les préférences au salé (salé 1%) chez des F2 non exposés, A: immatures, B: Adultes. Les résultats sont exprimés selon la moyenne \pm SEM (n=12/sexe/groupe). Les données ont fait l'objet d'une analyse de variance (Anova mesures répétées). * indique une différence significative par rapport au lot témoin du même genre. # indique un dimorphisme sexuel dans le groupe témoin ou BPA. ## indique un dimorphisme sexuel dans les deux groupes témoin et BPA (p<0,05). □ Contrôle ■ BPA.

A l'âge adulte, l'exposition au BPA entraîne une baisse dans la consommation de la solution salée chez les mâles (-1,7%) et chez les femelles (- 4,2%), mais celle-ci est significative uniquement chez les femelles (p<0,05). De fait, le dimorphisme sexuel sur la prise d'eau salée est plus prononcé chez les témoins que chez les animaux du lot BPA. Cette diminution est compensée par une augmentation de la prise d'eau qui annule le dimorphisme sexuel observé chez les témoins. Il en résulte une diminution d'environ 10% de la préférence au salé chez les mâles et chez les femelles du lot BPA, sans toutefois affecter le dimorphisme sexuel, la préférence des femelles pour le salé étant plus marquée que chez les mâles (p<0,05), tout comme nous l'avons observé sur la génération F1 (Figure 5B).

c) Préférence au gras : à l'âge immature, une différence inter-sexe significative sur la prise d'eau et de gras apparaît chez les témoins (p<0,05), mais ne se répercute pas sur la préférence. Dans le lot BPA, le dimorphisme sexuel pour la consommation de gras est significatif et de même amplitude que celui observé chez les témoins (p<0,05), cependant les animaux issus du lot BPA ne présentent pas de différence de consommation d'eau ni d'huile par rapport au témoin, et il n'en résulte aucun effet significatif sur la préférence au gras (Figure 6.A).

A l'âge adulte, comme observé dans la première génération, on note une réduction de la consommation du gras chez les deux sexes par rapport au témoin, mais elle s'avère significative uniquement chez les femelles (p<0,05). Cependant, la différence inter-sexe reste significative dans les deux lots (p<0,05). Parallèlement, une légère diminution de la consommation d'eau abolit la différence inter-sexe que l'on avait chez les témoins. Ces légers effets entraînent une légère

diminution de la préférence qui est équivalente pour les deux sexes, et n'entraîne donc pas de dimorphisme sexuel pour la préférence au gras (Figure 6.B).

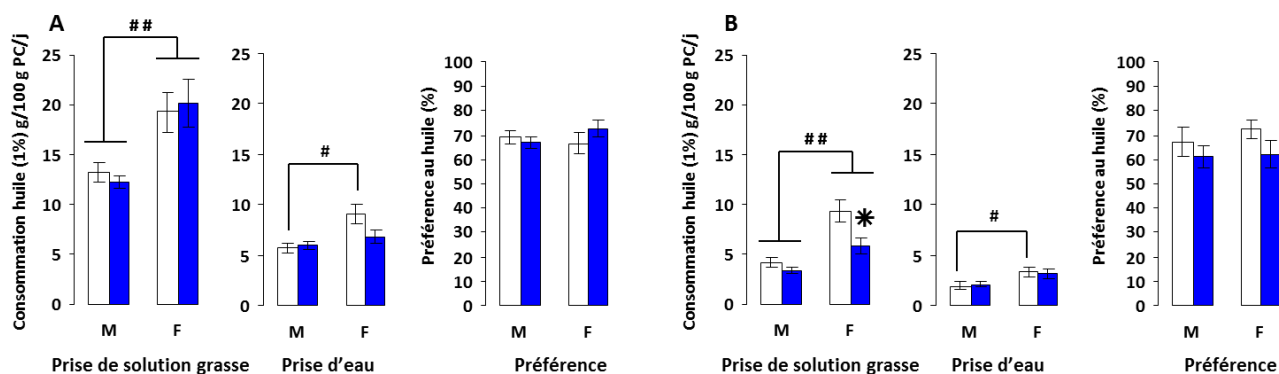


Figure 6: Effets du BPA sur les préférences au gras (huile 1%) chez des F2 non exposés, A: immatures, B: Adultes. Les résultats sont exprimés selon la moyenne \pm SEM (n=12/sexe/groupe). Les données ont fait l'objet d'une analyse de variance (Anova mesures répétées). * indique une différence significative par rapport au lot témoin du même genre. # indique un dimorphisme sexuel dans le groupe témoin ou BPA. ## indique un dimorphisme sexuel dans les deux groupes témoin et BPA ($p < 0,05$). □ Contrôle ■ BPA.

2.5. Conclusion

En résumé, une exposition au BPA chez l'adulte affecte les trois préférences (sucré, salé et gras) pour des doses supérieures ou égales à 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ PC/j surtout pour la préférence au salé, mais avec un effet moins prononcé pour le gras. Chez des animaux exposés depuis la période utérine à la plus faible dose (5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ PC/j) le BPA n'affecte pas d'une manière significative les trois préférences gustatives au sucré, au salé et au gras, mais modifie de manière inverse le dimorphisme de la préférence au salé chez les animaux immatures et adultes. Au niveau de la F2, la diminution systématique de la prise de saveur (sucrée, salée ou grasse) chez les femelles nivèle le dimorphisme sexuel et suggère une masculinisation des femelles. Ceci nous laisse penser qu'une exposition au BPA peut avoir des effets multi-générationnels sur les préférences via une action sur le SNC (*Systeme Nerveux Central*), en particulier des altérations possibles de l'activité aromatique au niveau central (féminisation des mâles ou masculinisation des femelles).

Tableau 2: Effets d'une exposition continue en BPA sur la consommation d'eau, la prise alimentaire et l'évolution du poids corporel chez les mères F0 au cours de la gestation et de la lactation.

Groupe	Temps	Prise d'eau (mL/100 g PC)	Prise de nourriture (g/100 g PC)	Poids corporel (g)
Contrôle	GD 1	ND	ND	228,00 ± 4,2
	GD 6	10,14 ± 0,5	7,13 ± 0,2	249,87 ± 4,5
	GD 13	9,46 ± 0,4	7,78 ± 0,1	279,37 ± 5,2
	GD 21	10,88 ± 0,6	7,03 ± 0,1	347,68 ± 6,6
	PND 8	12,36 ± 0,2	14,98 ± 0,3	273,25 ± 5,0
	PND 15	14,38 ± 0,5	18,04 ± 0,5	272,66 ± 5,6
	PND 21	21,41 ± 1,2	18,15 ± 0,7	255,35 ± 4,3
BPA	GD 1	ND	ND	219,86 ± 3,7
	GD 6	10,89 ± 0,7	7,29 ± 0,2	240,86 ± 4,2
	GD 13	10,25 ± 0,6	7,65 ± 0,1	271,40 ± 4,7
	GD 21	11,19 ± 0,5	6,74 ± 0,1	336,20 ± 5,9
	PND 8	13,09 ± 0,6	15,29 ± 0,3	263,93 ± 4,0
	PND 15	15,99 ± 0,9	19,46 ± 0,8	266,93 ± 4,1
	PND 21	21,88 ± 0,5	18,67 ± 0,4	245,66 ± 4,1

Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM. N.D: non définie. GD: *gestational day*, PND: *post natal day*.

Tableau 3: Effets d'une exposition continue en BPA sur la gestation (F0) et le développement (F1)

	Les mères F0/ la progéniture F1	
	Contrôle	BPA
Durée de gestation (jour)	22,0 ± 0,1	22,1 ± 0,1
Nombre de petits/portée	12,4 ± 0,7	11,6 ± 0,9
Nombre d'implantations embryonnaires/portée	13,4 ± 0,5	12,7 ± 0,6
Perte post-implantatoires (%)	8,3 ± 2,7	10,3 ± 4,4
Malformations, mort-nés et cannibalisme	0	1 + 1 [‡]
Total des malformations (%)	0	4,02
Sex-ratio (pourcentage des mâles/total des naissances)	46,2	47,7
Poids corporel à la mise bas (PND 1) (g)		
Mâle	5,9 ± 0,1	5,8 ± 0,1
Femelle	5,5 ± 0,1	5,5 ± 0,1
Poids corporel au sevrage (g)		
Mâle	46,3 ± 0,7	44,3 ± 0,7 *
Femelle	45,2 ± 0,7	43,7 ± 0,6
Index de la distance ano-génitale (AGDi) au sevrage (mm / g ^{1/3} PC)		
Mâle	4,69 ± 0,08	4,55 ± 0,05 *
Femelle	3,20 ± 0,03	3,19 ± 0,04
Apparition de la puberté		
Séparation du prépuce chez le mâle	44,1 ± 0,7	43,4 ± 0,4
Ouverture vaginale chez la femelle	32,7 ± 0,8	31,7 ± 0,6

Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM. * indique une différence significative par rapport au lot témoin (Mann-Whitney, p < 0,05). ‡ Une femelle est né sans queue et avec une patte arrière gauche.

3. Modulation du développement

Dans la littérature, les données sont controversées concernant les effets du BPA à faibles doses sur le développement. Tyl et al, montrent que le BPA n'est pas tératogène à des doses inférieures à 50 µg/kg PC/j chez le rat ([Tyl et al 2002](#)) et la souris ([Tyl et al 2008](#)), des résultats confirmés par Ferguson et al, ([Ferguson et al 2011](#)). Cependant d'autres auteurs trouvent des effets du BPA a des faibles doses (<50 µg/kg PC/j). Cabaton et al, montrent que le BPA affecte la fertilité chez la souris ([Cabaton et al 2011](#)), ainsi que Salian et al, montrent aussi que le BPA peut affecter la fertilité chez le rat mâle ([Salian et al 2009c](#)). A partir de ces données nous avons voulu confirmer si le BPA peut affecter ou non le développement sur les deux générations, en considérant des paramètres de reproduction (distance ano-génitale, durée de cycles, durée de gestation, pertes post-implantatoires...etc.) et d'autres paramètres tels que le suivi de poids corporel, la prise de nourriture, la prise d'eau,...etc.

3.1. Effet d'une exposition continue sur la génération exposée (F1)

3.1.1. Croissance et développement prénatal

L'effet des traitements avec le BPA sur le développement est évalué par le suivi de l'évolution du poids corporel des mères F0, ainsi que la prise de nourriture et d'eau. Ce suivi permet d'évaluer l'impact des traitements sur la mère et de déterminer des liens avec la croissance et le développement des petits. Dans nos conditions, comme le montre le tableau 2, le BPA n'affecte ni le poids corporel, ni la prise de nourriture et d'eau des mères durant la gestation et la lactation.

Concernant les paramètres de reproduction, l'exposition au BPA à la dose de 5 µg/kg PC/j pendant les 3 semaines de gestation des mères F0 ne semble pas avoir d'effet sur la durée de gestation, ni sur le nombre de rats par portée, ni le nombre de sites implantatoires, suggérant peu d'effet sur le début de l'embryogénèse. Cependant une femelle est née morte, et une deuxième avec une malformation au niveau des pattes arrières dans le lot BPA, ce qui indique que le BPA a affecté le développement de cette femelle durant le développement intra-utérin (Tableau 3).

Le sex-ratio n'est pas affecté par l'exposition au BPA. Par contre la diminution de l'index de la distance ano-génitale enregistrée chez les mâles exposés au BPA ($p < 0,05$), traduit une perturbation de type androgénique sur le développement utérin. L'apparition de la puberté n'est pas affectée par l'exposition au BPA, cela signifie une absence d'effet de type œstrogénique sur l'appareil de reproduction dans les deux sexes (Tableau 3).

Tableau 4: Effets d'une exposition au BPA sur la consommation d'eau, prise de nourriture et évolution du poids corporel chez la F1

Groupe	Temps	Prise d'eau (mL/100g PC)		Prise de nourriture (g/100 g PC)		Poids corporel (g)	
		Mâles	Femelles	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles
Contrôle	PND 34	15,81 ± 0,55	16,64 ± 0,52	15,14 ± 0,58	13,01 ± 0,37	103,5 ± 3,9	102,50 ± 2,1
	PND 40	12,91 ± 0,28	14,36 ± 0,56	12,09 ± 0,34	9,99 ± 0,25	144,83 ± 4,6	130,83 ± 2,4
	PND 47	10,37 ± 0,17	15,26 ± 0,11	10,32 ± 0,24	9,53 ± 0,17	188,66 ± 5,4	148,33 ± 2,7
	PND 54	9,44 ± 0,29	11,72 ± 0,16	8,39 ± 0,09	8,39 ± 0,15	231,08 ± 5,7	169,50 ± 3,2
	PND 62	8,74 ± 0,29	12,54 ± 0,16	7,25 ± 0,03	7,82 ± 0,02	268,25 ± 5,7	188,91 ± 3,5
	PND 68	7,97 ± 0,06	10,90 ± 0,34	7,03 ± 0,13	7,32 ± 0,17	291,75 ± 5,7	201,25 ± 3,6
	PND 75	7,60 ± 0,66	12,03 ± 0,28	6,11 ± 0,02	7,29 ± 0,09	317,5 ± 6,2	212,33 ± 3,7
	PND 82	7,39 ± 0,83	10,58 ± 0,27	5,97 ± 0,08	6,56 ± 0,11	338,58 ± 5,9	227,91 ± 3,8
BPA	PND 34	15,25 ± 0,08	16,31 ± 0,72	15,34 ± 0,39	13,20 ± 0,33	98,75 ± 2,4	96,50 ± 2,7
	PND 40	12,02 ± 0,11	13,44 ± 0,26	11,84 ± 0,32	10,39 ± 0,28	139,75 ± 3,6	123,83 ± 1,8
	PND 47	9,62 ± 0,13	12,55 ± 0,05	10,11 ± 0,20	9,65 ± 0,24	182,50 ± 4,9	144,50 ± 2,1
	PND 54	8,90 ± 0,55	11,00 ± 0,34	8,67 ± 0,20	8,42 ± 0,34	223,83 ± 5,6	164,16 ± 2,3
	PND 62	8,49 ± 0,26	11,51 ± 0,62	7,46 ± 0,10	7,85 ± 0,24	262,75 ± 6,7	182,50 ± 3,0
	PND 68	8,03 ± 0,20	11,07 ± 0,65	7,07 ± 0,01	7,31 ± 0,13	288,50 ± 7,5	199,66 ± 3,6
	PND 75	7,02 ± 0,30	10,92 ± 0,46	6,09 ± 0,05	6,78 ± 0,07	315,58 ± 8,2	213,00 ± 4,2
	PND 82	6,63 ± 0,18	10,75 ± 0,62	5,87 ± 0,08	6,59 ± 0,05	335,75 ± 8,7	223,33 ± 4,5

Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM. PND: *post natal day*.

3.1.2. Développement post natal et malformations

Bien que l'exposition au BPA ne semble pas avoir d'effet sur le poids à la naissance, la croissance de la F1 est observée après la mise bas jusqu'au sevrage et montre que les mâles exposés au BPA ont un poids corporel inférieur à celui des mâles du groupe contrôle ($p < 0,05$). Même constat chez les femelles, par contre la différence n'est pas significative (Tableau 4). Ces effets peuvent provenir d'un mauvais allaitement, compte tenu de l'effet du BPA sur le comportement maternel. Malheureusement la composition du lait n'a pas été évaluée.

Cependant, cette hypothèse est appuyée par le fait que le poids corporel retrouve son équilibre à l'âge adulte et qu'aucune différence n'a été enregistrée entre les deux lots ni pour le poids corporel ni pour la consommation d'eau et la prise de nourriture lors du suivi du sevrage à l'âge adulte (Tableau 4).

Au cours de notre étude, un suivi quotidien des animaux a aussi été réalisé dans le but de détecter d'éventuelles défections du développement du squelette (malformations) ou tout signe de toxicité. Comme le montre la figure 7, une exposition continue (*de la conception à l'âge adulte*) a entraîné l'apparition de trois types de malformations avec un pourcentage de 4,02% sur l'ensemble des rats observés et gardés jusqu'à l'âge adulte dans la génération F1. Ces malformations sont observées à plusieurs niveaux :

Au niveau dentaire : des défauts de poussée dentaire ont été observés, en particulier au niveau des incisives où des couches blanches apparaissent au niveau des extrémités (Figure 7) Les dents ont été prélevées et font l'objet d'un travail de thèse par une des équipes collaboratrices du projet (Université Paris 5). A côté des dents avec des spots blancs, une poussée des dents en biais a été enregistrée au niveau des incisives, et pour éviter que cela affecte la croissance des animaux, nous avons coupé les dents déformées.

Au niveau oculaire : plusieurs rats des deux sexes présentaient une hypertrophie ophtalmique qui se développait avec l'âge. La mesure de la tension oculaire à l'aide d'un tonomètre montre une hypertension au niveau oculaire (données non montrées).

Au niveau de la queue : comme l'illustrent les photos, la queue semblerait tordue, au niveau basal (Figure 7.B1), ou bien au niveau apical proche du bassin (Figure 7.B3), on a remarqué également chez un animal une petite queue (Figure 7.B2).

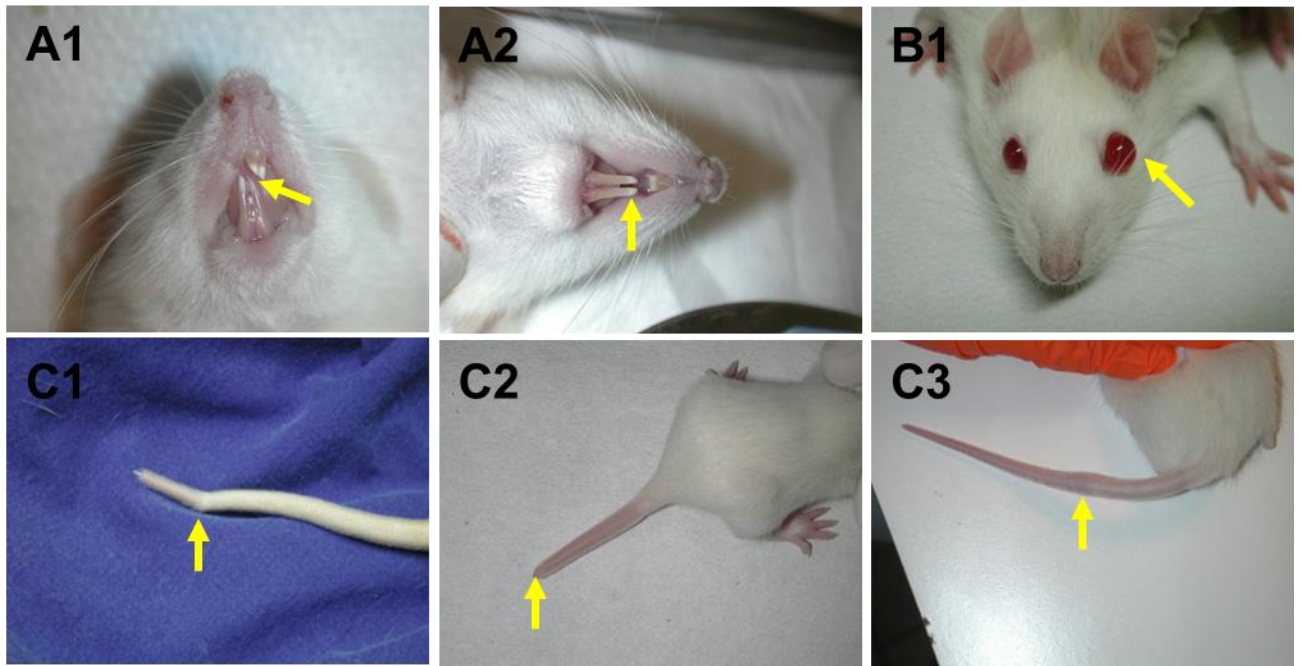


Figure 7: Apparition des malformations (dents, globe oculaire et queues) après une exposition continue (de la conception à l'âge adulte) au BPA (5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ PC/j).

3.2. Répercussion d'une exposition continue de la F1 sur le développement de sa progéniture non exposée (F2)

Aujourd'hui le BPA, comme d'autres perturbateurs endocriniens, est connu pour avoir la capacité d'affecter non seulement la génération exposée, mais aussi les générations descendantes non-exposées, et on parle d'effets multi-générationnels ([Wolstenholme et al 2012](#)). Dans l'objectif d'appuyer les observations relatives aux préférences gustatives, nous avons relevé les mêmes paramètres de développement que ceux de la génération F1.

3.2.1. Croissance et développement pré-pubère

Comme chez les mères F0, le suivi du développement pré-pubère s'étend de la conception à l'apparition de la puberté, incluant la gestation. Dans nos conditions expérimentales, le BPA n'affecte ni le poids corporel, ni la prise alimentaire et la prise d'eau chez les mères F1 pendant la gestation et la lactation (Tableau 5).

Concernant les paramètres de reproduction, comme le montre le tableau 6, une exposition continue (*de la conception à l'âge adulte*) n'affecte pas le durée de gestation, la taille de la portée, ni le nombre d'implantation utérine. Cependant chez les femelles F1, le pourcentage des pertes post-implantatoires est supérieur dans le lot BPA, mais l'analyse statistique n'est pas significative. En réalité, deux ratons sont mort-nés dans ce lot, et une femelle est morte au moment de la mise-bas,

l'examen de l'utérus a révélé 7 ratons morts. Ces résultats des paramètres de gestation peuvent traduire un développement intra-utérin anormal, mais aussi un dysfonctionnement dans la synthèse ou l'action de l'ocytocine, une hormone clé synthétisée au niveau de l'hypothalamus et qui joue un rôle primordial dans la parturition (Tableau 6).

Tableau 5: Effets d'une exposition au BPA sur la consommation d'eau, la prise de nourriture et l'évolution du poids corporel chez les mères F1

Groupe	Temps	Prise d'eau (mL/100 g PC)	Prise de nourriture (g/100 g PC)	Poids corporel (g)
Contrôle	GD 1	ND	ND	240,50 ± 05,1
	GD 6	9,31 ± 0,6	7,52 ± 0,4	262,66 ± 06,3
	GD 13	9,43 ± 0,4	6,63 ± 0,2	281,56 ± 06,0
	GD 21	11,58 ± 1,3	6,67 ± 0,2	338,42 ± 08,7
	PND 6	9,15 ± 0,4	10,84 ± 0,6	273,42 ± 10,2
	PND 13	13,78 ± 0,5	17,69 ± 0,5	278,28 ± 10,0
	PND 21	15,33 ± 0,6	15,65 ± 0,5	256,14 ± 10,8
BPA	GD 1	ND	ND	243,17 ± 08,3
	GD 6	8,34 ± 0,8	6,49 ± 0,1	257,28 ± 09,3
	GD 13	9,33 ± 0,6	6,59 ± 0,2	279,21 ± 10,0
	GD 21	11,10 ± 0,8	6,63 ± 0,2	349,42 ± 11,9
	PND 6	8,87 ± 0,5	10,55 ± 0,7	271,57 ± 07,4
	PND 13	13,68 ± 0,4	17,81 ± 0,5	272,42 ± 08,2
	PND 21	16,00 ± 0,6	15,85 ± 0,4	255,00 ± 07,7

Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM. GD: *gestational day*, PND: *post natal day*.

Le sex-ratio n'est pas affecté malgré un pourcentage de 39,4% mâles contre 48,2% dans le lot témoin. En effet ce pourcentage résulte d'une portée atypique constituée de 10 femelles et seulement 2 mâles, donc on ne peut pas conclure que la diminution du sex-ratio résulte de l'imprégnation œstrogénique durant la gestation. La diminution de l'index de la distance ano-génitale enregistrée chez les mâles de la F1 persiste encore dans la F2 et est plus accentuée ($p < 0,01$) mais l'apparition de la puberté dans les deux sexes n'est pas affectée (Tableau 6).

Contrairement à la F1 le suivi de l'évolution du poids corporel de la F2 à la naissance et durant la période de la lactation n'a pas été affecté (Tableau 7). Cependant à l'âge adulte le poids corporel de la F2 augmente d'une manière significative chez les mâles, mais surtout chez les femelles ($p < 0,05$) (Figure 8), mais sans pour autant qu'une augmentation de prise de nourriture ni de consommation d'eau ne soit révélée (Tableau 7). *Cela peut être dû à une action du BPA au niveau de l'adipocyte*
Des éléments de réponse seront apportés dans les chapitres suivants.

Tableau 6: Effets de l'exposition au BPA sur les paramètres de gestation (F1) et de développement (F2)

	Les mères F1/La progéniture F2	
	Contrôle	BPA
Durée de gestation (jour)	22,3 ± 0,2	22,3 ± 0,1
Nombre de petits/portée	11,9 ± 1,4	12,4 ± 1,1
Nombre d'implantations embryonnaires/portée	12,9 ± 1,4	15,1 ± 0,8
Pertes post-implantatoires (%)	8,7 ± 3,0	12,9 ± 3,7
Malformations, mort-nés et cannibalisme	0	2 + 7 #
Total des malformations (%)	0	4,04
Sex-ratio (pourcentage des mâles/total des naissances)	48,2	39,4
Poids corporel à la mise bas (PND 1) (g)		
Mâle	5,6 ± 0,2	5,8 ± 0,2
Femelle	5,5 ± 0,2	5,5 ± 0,2
Poids corporel au sevrage (g)		
Mâle	41,9 ± 1,0	41,4 ± 1,4
Femelle	40,8 ± 1,2	40,5 ± 1,3
Index de la distance ano-génitale (AGDi) au sevrage (mm / g ^{1/3} PC)		
Mâle	5,06 ± 0,06	4,86 ± 0,04 **
Femelle	3,47 ± 0,04	3,33 ± 0,07
Apparition de la puberté		
Séparation du prépuce chez le mâle	43,8 ± 0,4	43,5 ± 0,4
Ouverture vaginale chez la femelle	31,8 ± 0,9	32,5 ± 0,9

Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM. ** indique une différence significative par rapport au lot témoin (Mann-Whitney, $p < 0,01$). # Une femelle est morte durant la mise-bas, et l'examen l'utérus a révélé 7 ratons morts.

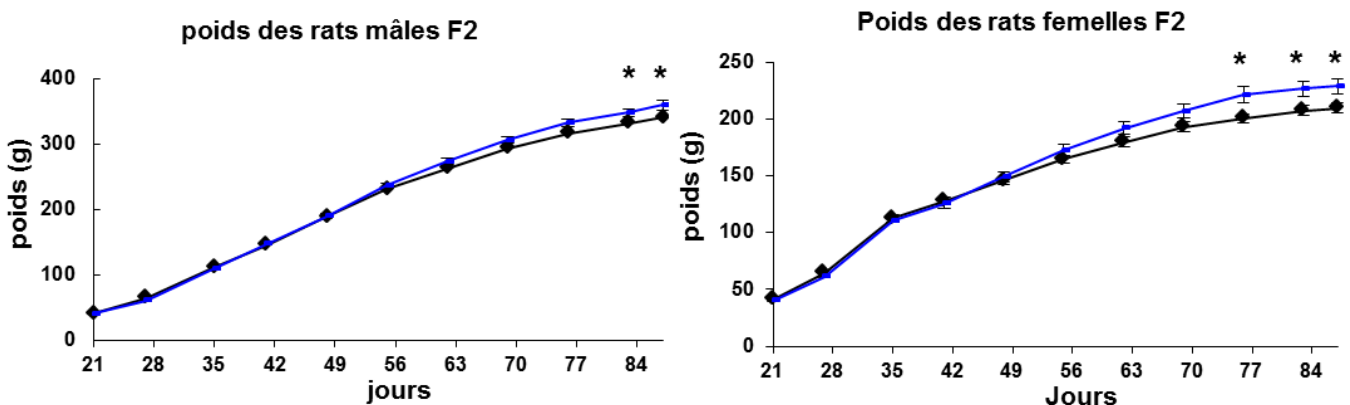


Figure 8 : Evolution du poids corporel chez des rats F2 dont les deux parents ont été exposés au BPA. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n=12/sexe/groupe). Les données ont fait l'objet d'une analyse de variance (Anova mesures répétées). * indique une différence significative par rapport au lot témoin du même genre ($p < 0,05$). □ Control ■ BPA.

Tableau 7: Effets de l'exposition au BPA sur la consommation d'eau et la prise de nourriture chez la F2

Groupe	Temps	Prise d'eau (mL/100 g PC)		Prise de nourriture (g/100 g PC)	
		Mâles	Femelles	Mâles	Femelles
Contrôle	PND 37	16,21 ± 0,62	20,10 ± 1,69	12,60 ± 0,27	12,37 ± 0,10
	PND 41	13,97 ± 0,60	18,07 ± 1,78	11,61 ± 0,23	9,77 ± 0,18
	PND 48	13,40 ± 0,53	17,51 ± 2,36	8,91 ± 0,56	8,73 ± 0,33
	PND 55	11,58 ± 0,88	14,80 ± 1,72	7,94 ± 0,09	7,66 ± 0,21
	PND 62	11,01 ± 1,12	13,92 ± 1,64	7,44 ± 0,16	7,71 ± 0,31
	PND 69	9,77 ± 1,45	12,22 ± 1,63	6,59 ± 0,16	6,90 ± 0,11
	PND 76	8,31 ± 0,52	13,48 ± 0,79	5,94 ± 0,06	6,76 ± 0,18
	PND 83	7,41 ± 0,26	12,96 ± 1,09	5,87 ± 0,11	6,68 ± 0,18
BPA	PND 37	16,21 ± 0,48	18,38 ± 0,83	13,60 ± 0,22	13,01 ± 0,24
	PND 41	13,92 ± 1,17	15,87 ± 0,30	11,49 ± 0,22	10,39 ± 0,18
	PND 48	13,07 ± 1,09	14,81 ± 0,37	10,29 ± 0,08	9,07 ± 0,18
	PND 55	10,76 ± 0,93	13,10 ± 0,44	8,55 ± 0,01	8,11 ± 0,16
	PND 62	9,80 ± 1,12	11,96 ± 0,93	7,56 ± 0,05	7,41 ± 0,21
	PND 69	9,63 ± 0,94	11,03 ± 0,67	6,85 ± 0,08	6,98 ± 0,18
	PND 76	8,05 ± 0,83	10,41 ± 0,46	5,87 ± 0,12	6,63 ± 0,22
	PND 83	7,05 ± 0,93	11,86 ± 0,69	5,62 ± 0,14	5,81 ± 0,20

Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM. PND: *post natal day*.

3.2.2. Malformations

Dans la génération F2, un suivi quotidien des animaux identique à celui de la génération F1 a été réalisé afin de détecter tous signes éventuels de toxicité ou apparitions de malformations. Ce suivi révèle que dans la génération F2 (non exposée, mais dont les deux parents ont été exposés au BPA 5µg/kg PC/j), le pourcentage des malformations retrouvé dans le lot BPA est à peu près le même que pour la F1 (4,04%); Cependant, on y retrouve seulement des altérations du squelette (queues tordues), et quelques anomalies de la poussée dentaire. Cependant au niveau dentaire les taches blanches observés dans la première génération ont disparu. De même, on ne retrouve pas d'anomalies ophtalmiques.

4. Conclusion générale et discussion : effets faibles doses du BPA et période d'exposition

Ce chapitre rapporte plusieurs effets du BPA lors d'une exposition chronique à faibles doses chez le rat. Les résultats obtenus montrent que ces effets varient en fonction du stade physiologique, de la période et de la dose d'exposition, et qu'une exposition à la plus faible dose peut avoir des répercussions sur la descendance non exposée.

Lors de nos expositions, nous avons exploré les effets de différentes faibles doses choisies selon des critères bien définis : 12,5 mg/kg PC/j (apportée par une eau de boisson saturée en BPA), 5 mg/kg PC/j (dose sans effet adverse observée, = (NOAEL), 50 µg/kg PC/j (dose journalière admissible ou DJA) et 5 µg/kg PC/j, une dose proche des taux d'exposition alimentaire ou de doses pour laquelle des effets reprotoxiques sont décrits ([Salian et al 2009c](#)) ([Willhite et al 2008](#)). Notre étude principale vise à identifier les effets d'une exposition continue à une très faible dose de BPA (5 µg/kg PC/j), une dose 10 fois inférieure à la dose journalière acceptable, sur le développement et le comportement sur trois générations (F0, F1 et F2).

Dans cette étude, le rôle primordial de la fenêtre d'exposition a été relevé sur le comportement maternel, pour lequel la perturbation majeure est observée après une exposition continue depuis les stades précoces de la vie (F1 ayant subi une pré-exposition continue depuis la période utérine jusqu'à l'accouplement), alors que celui de la F0, dont l'exposition débute seulement au premier jour de la gestation n'est pas affecté. Ces effets sur le comportement sont bien moins marqués lorsque l'on considère les préférences gustatives, pour lesquelles le dimorphisme sexuel, qui apparaît avec l'âge, est peu affecté lors d'une exposition continue (F1). Cependant, on observe une tendance générale à une moindre consommation des saveurs chez les femelles à l'âge adulte, une tendance qui traduit des perturbations au niveau central qui pourraient être reliées aux troubles observés sur le comportement maternel, et qui tend à se perpétuer sur les femelles adultes de la génération F2 non exposée. Les répercussions d'une telle exposition sur la F2 sont confirmées lorsqu'on considère les paramètres développementaux portant sur le squelette (malformations) et la masse adipeuse (surpoids de la F2), cette dernière étant plus marquée chez la femelle. Cette discussion apporte divers arguments sur ces considérations.

Dans la littérature, plusieurs études ont montré que l'exposition précoce (*in utero*) ou continue au BPA à des faibles doses [2 ng-20 µg/kg PC/j] provoque des effets sur le développement ([Braniste et](#)

[al 2010](#)) ([Howdeshell et al 1999](#)) ([Newbold et al 2009](#)) ([Salian et al 2009c](#)) , ou sur le comportement maternel ([Della Seta et al 2005](#)) ([Palanza et al 2002b](#)), ou gustatif ([Xu et al 2011a](#)), ou social ([Rubin et al 2006](#)) ([Xu et al 2011b](#)), Cependant, dans d'autres études, les auteurs ne trouvent pas d'effet ([Tyl et al 2002](#)) ([Tyl et al 2008](#)) ([Stump et al 2010](#)). Cette divergence de résultats peut être due aux différences de conditions expérimentales qui portent sur les modèles utilisés (souris, rats par exemple), la durée d'exposition, ou bien encore sur l'utilisation des régimes standards qui contiennent des taux de phyto-estrogènes faibles mais suffisants pour masquer l'action des xéno-hormones ([Ruhlen et al 2008](#)) ([Stroheker et al 2003a](#)).

Dans nos conditions expérimentales, où on a utilisé un régime sans phyto-estrogènes, l'exposition au BPA n'a pas affecté les paramètres de gestation ni le comportement alimentaire. Cependant, les effets sur le comportement maternel suggèrent une action du BPA de type œstrogénique au niveau central, car les hormones sexuelles agissent sur l'hypothalamus pour réguler le comportement maternel ([Sheehan & Numan 2002](#)). A ce niveau on trouve également d'autres hormones et des neurotransmetteurs tels que l'ocytocine, la vasopressine et la dopamine, qui sont eux aussi impliqués dans la régulation du comportement maternel ([Mann & Babb 2004](#)) ([Bosch & Neumann 2012](#)). L'ocytocine est également impliquée dans la mise-bas et la lactation. Un dysfonctionnement de sa synthèse au niveau central aurait peut-être des conséquences d'une part sur les contractions utérines, ce qui pourrait expliquer le nombre des mort-nés trouvés dans le groupe BPA, et d'autre part sur la lactation, ce qui pourrait expliquer la diminution du poids corporel au sevrage dans le lot BPA. Cet effet sur le poids corporel au sevrage n'est pas retrouvé dans la F2, et ceci pourrait provenir du fait que les mères F1 n'étant plus exposées pendant la gestation et la lactation, ont eu des parturitions et des lactations normales. Les malformations, la baisse de la distance ano-génitale et l'augmentation de poids corporel à l'âge adulte observés dans la deuxième génération non exposée montrent également la possibilité de transmission d'effet vers des générations suivantes, mêmes si elles ne sont plus exposées. Ces effets sont peut-être dus à des mécanismes épigénétiques (acétylation d'ADN, méthylation d'ADN), car de tels effets sont décrits dans la littérature ([Kundakovic & Champagne 2011](#)).

Les résultats concernant les tests de préférences gustatives montrent l'existence d'un dimorphisme sexuel pour la préférence au sucré et au salé, déjà décrit par plusieurs auteurs dans la littérature ([Curtis et al 2004](#)) ([Curtis et al 2005](#)), et identifient un dimorphisme sexuel pour le goût du gras. Nos travaux montrent également une légère altération dans ce dimorphisme sexuel des préférences gustatives qui s'accroît dans la deuxième génération : il est donc possible que le BPA

affecte le cerveau lors des premières étapes embryonnaires de la différenciation cellulaire. Ces résultats sont en accord avec la littérature, où des altérations sur le dimorphisme sexuel sont observées après des expositions *in utero* au BPA ([Palanza et al 2008](#)).

L'exposition continue au BPA à 5 µg/kg PC/j n'affecte pas les préférences au sucré ni au salé, cependant une tendance générale à baisser la prise de salé est observée chez les mâles et les femelles, cette baisse est peut être due à une perturbation dans la régulation de l'homéostasie des fluides physiologiques, où l'ocytocine semble jouer un rôle primordial ([McCann et al 2003](#)). Dans les deux générations F1 et F2 et les deux stades de développement (immatures et adultes) les femelles ont tendance à réduire leur prise d'eau et de solution sucré, salé ou gras, pour atteindre à peu près le même niveau de consommation du celui des mâles dans le lot BPA. Ceci signifie une légère masculinisation des femelles, un phénomène qui a été déjà décrit dans plusieurs études sur le comportement social ou sexuel ([Porrini et al 2005](#)) ([Dessi-Fulgheri et al 2002](#)). Prenant les résultats dans leur globalité, la diminution de différence inter-sexe confirme qu'une exposition au BPA à une faible dose peut avoir des effets sur le comportement qui peuvent être dus à une action au moment de la différenciation sexuelle du cerveau. Toutefois, si l'on prend en compte l'étude effet-dose menée chez le mâle adulte, un effet direct peut aussi être suspecté.

En effet, cette étude a permis de montrer qu'une exposition orale en BPA via l'eau de boisson modifiait de manière sélective les préférences gustatives (surtout pour le salé et le sucré), et ceci de manière indéniable pour des doses équivalentes à la NOAEL (5 mg/kg PC/j), mais aussi, même si c'est de manière moins prononcée, à des doses inférieures ou égales à la dose journalière acceptable qui est de 50 µg/kg PC/j (<http://www.epa.gov/iris/subst/0356.htm>).

La diminution de la préférence au sucré et l'induction de la consommation d'eau salée révèlent un profil d'action du BPA typique des composés œstrogéniques, comme le montrent plusieurs études sur la régulation hormonale et environnementale des préférences gustatives ([Ferguson et al 2003](#)) ([Flynn et al 2005](#)) ([Kenney & Redick 1980](#)) ([McGivern & Henschel 1990](#)). La régulation des préférences gustatives pourrait s'opérer à plusieurs niveaux, incluant le système nerveux central, le tissu adipeux, et l'activité des glandes salivaires.

Ainsi, il est connu que la préférence au salé est sous la dépendance de la concentration de sodium de la salive ([Delwiche & O'Mahony 1996](#)) et qu'une grande concentration salivaire en sel entraîne une moins grande sensibilité au goût salé. Une action sur les glandes salivaires, en particulier au

niveau de l'absorption/résorption du sodium, pourrait expliquer l'augmentation de la consommation du salé dans notre étude. De plus, une étude menée en parallèle au sein de notre laboratoire sur la régulation des sécrétions salivaires par les perturbateurs endocriniens (C. Tiffon, post-doctorat) révèle que ces effets sur les préférences gustatives s'accompagnent aussi d'une modification de l'expression de divers gènes qui codent les protéines gustatives sécrétées par les glandes sous-mandibulaires, Cela peut révéler une action du BPA au niveau de la cavité orale, et qui pourrait entraîner une perturbation de l'homéostasie de la cavité buccale.

Dans le même sens, une autre étude récente menée au laboratoire identifie clairement la glande salivaire submandibulaire comme une cible des perturbateurs endocriniens lors d'expositions prénatales ([Kouidhi et al 2012b](#)), on peut donc penser qu'une altération dans la morphogénèse de cette glande hormono-régulée à l'âge immature affecte à postériori les préférences gustatives (sucré, salé et gras).

Des altérations au niveau des glandes salivaires peuvent être également à l'origine de la perturbation des préférences au sucré et au gras. Dans la première étude les consommations de sucré et de gras sont inversement proportionnelles à la dose de BPA. Cependant des études dans la littérature montre l'existence de corrélations entre des hypo-fonctionnements des glandes salivaires et l'hyperglycémie enregistrée chez les personnes diabétiques ([Borges et al 2010](#)) ([Moore et al 2001](#)). Cela laisse supposer un lien direct ou indirect entre le fonctionnement des glandes salivaires et la régulation de l'homéostasie énergétique et des préférences gustatives (sucré et gras) qui pourrait expliquer les modifications des préférences enregistrées dans nos conditions expérimentales. Tout ceci nous a conduit à porter une attention particulière à ces organes lors de l'étude d'exposition chronique du BPA seul ou en mélange avec d'autres perturbateurs endocriniens (Cf. Chapitre IV).

L'autre hypothèse qui pourrait expliquer les modifications des préférences gustatives, est celle d'une action au niveau du système nerveux central, sur les centres régulateurs de préférences gustatives. Le BPA traverse la barrière hémato-encéphalique, même à l'âge adulte (c'est-à-dire après la fin du développement du cerveau). Doerge et al, ont montré que deux heures de temps sont suffisantes pour que le BPA traverse la barrière hémato-encéphalique chez des rats Sprague-Dawley ([Doerge et al 2011](#)). Une fois dans le cerveau, le BPA peut agir comme un composé œstrogénique et peut affecter le dimorphisme sexuel, ainsi que l'expression de neurotransmetteurs qui régulent la consommation de nourriture et d'eau, une hypothèse qui pourrait également expliquer les modifications de consommations observées dans notre étude.

A ce niveau, nous avons constaté une diminution de la consommation d'eau proportionnelle à la dose d'exposition chez les mâles adultes : cette hypovolémie peut résulter d'une action sur les zones du SNC (hypothalamus-hypophyse) impliquées dans le contrôle de la soif, ou encore une action directe du BPA au niveau du néphron (au niveau rénal), comme le suggèrent plusieurs études montrant la capacité des perturbateurs endocriniens œstrogéniques à affecter l'appareil rénal ([Latendresse et al 2001](#)) ([Ulleras et al 2008](#)) ([Kuo et al 2011](#)). Au niveau central, on sait que le BPA peut également affecter le noyau supra optique, principal site de synthèse de la vasopressine, hormone antidiurétique qui agit sur le néphron pour augmenter la rétention d'eau. Les œstrogènes peuvent agir sur le noyau supra optique, et modifier l'expression des récepteurs à la vasopressine, qui peut modifier la rétention d'eau au niveau périphérique ([Stachenfeld & Taylor 2009](#)). Ceci peut engendrer un dysfonctionnement dans le système rénine-angiotensine qui est sensé réguler la volémie dans l'organisme, mais aussi réguler les sécrétions salivaires ([Garcia et al 1977](#)).

Les effets observés sur les préférences gustatives au sucré et au gras et sur le comportement maternel chez la femelle suggèrent aussi des perturbations au niveau central y compris l'axe hypothalamo-hypophysaire. Un axe qui est également impliqué dans le contrôle du comportement et de la physiologie de la reproduction ([Adewale et al 2011](#)), où une exposition au BPA peut altérer l'expression de certains gènes tels que l'ER β et les récepteurs à la mélanocortine qui jouent un rôle crucial dans la signalisation du complexe ocytocine/vasopressine. Ce complexe à son tour joue un rôle dans le comportement socio-sexuel ([Patisaul et al 2012](#)). D'autre part, le fait que ces effets s'expriment sur la génération F2 non exposée laisse entrevoir de possibles effets épigénétiques conformes aux récents travaux montrant l'action précoce du BPA sur le comportement social via une action sur les voies de régulation épigénétique des neurotransmetteurs ([Wolstenholme et al 2012](#)) ([Wolstenholme et al 2011](#)). Notre étude mériterait donc d'être complétée par des études d'expression de marqueurs moléculaires associés au comportement (expression de l'ocytocine) au niveau hypothalamo-hypophysaire.

En conclusion, cette étude précise les effets de faibles doses de BPA sur des paramètres de développement et de comportement. Ces effets soulignent la vulnérabilité élevée pendant la période utérine et identifient des effets multi-générationnels qui touchent le développement et le comportement. Cette étude justifie une approche des effets de mélange de BPA avec d'autres perturbateurs endocriniens puisque nous sommes rarement exposés à une seule molécule à la fois, et bien souvent le bol alimentaire apporte simultanément plusieurs molécules à faibles doses.

CHAPITRE 2 : CARACTERISATION DES EFFETS DE L'EXPOSITION CONTINUE A DES MELANGES DE PE A FAIBLES DOSES (F0 ET F1)

Depuis quelques années le problème des effets cocktails commence à inquiéter la communauté scientifique, mais dans la littérature les études des mélanges de perturbateurs endocriniens sont peu documentées. Quelques études *in vivo* montrent qu'une exposition à un cocktail de perturbateurs endocriniens constitué de molécules anti-androgéniques à des doses inférieures à la NOAEL pour chaque molécule, affecte la période de gestation et entraîne des effets reprotoxiques chez le rat ([Christiansen et al 2009](#)) ([Jacobsen et al 2010](#)). Mais peu d'études considèrent les effets cocktails constitués de molécules aux propriétés hormonales distinctes, et la question se pose donc de savoir *quels seront les effets d'une exposition à un mélange dont les molécules constitutantes n'ont pas les mêmes propriétés hormonales.*

Au laboratoire et depuis quelques années, la question d'effet cocktail de molécules à propriétés hormonales différentes est abordée de manière intégrative. Chez le mâle, l'étude d'un mélange constitué de vinclozoline et de génistéine a permis d'enregistrer des effets de type reprotoxique qui sont majorés avec le mélange comprenant la plus faible dose de génistéine et de vinclozoline (1 mg/kg PC/j ([Eustache et al 2009](#)), des effets qu'on retrouve aussi sur le développement des cellules germinales chez le fœtus ([Lehraiki et al 2011](#)), mais également chez la femelle au niveau de la glande mammaire ([El Sheikh Saad et al 2011](#)) ou de la glande salivaire ([Kouidhi et al 2012b](#)). Des interactions entre phytoestrogènes et œstradiol ou Bisphénol A ont aussi été identifiées sur l'appareil reproducteur femelle ([Gradolatto 2004](#)) ([Phrakonkham 2007](#)) et des travaux récents montrent que d'autres organes en lien avec les processus gustatifs peuvent être affectés par une exposition à un mélange de perturbateurs endocriniens [([Kouidhi et al 2012a](#)) *accepté*].

Dans la continuité de ces travaux, et sur la même méthodologie que celle présentée au chapitre précédent, cette étude a pour objectif d'identifier les effets de mélanges de perturbateurs endocriniens à faibles doses sur le développement et sur le comportement sur plusieurs générations. Ces mélanges sont constitués à partir de BPA (BPA ; 5µg/kg PC/j) et de la génistéine (G ; 1mg/kg PC/j), deux composés œstrogéniques de référence et de la vinclozoline (V ; 10 µg/kg PC/j), un anti-androgène dont les métabolites peuvent exercer des effets œstrogéniques.

Ils ont été étudiés en mélange binaire (TGV, GVf, GB, VB), ou ternaire (GVB), à des faibles doses, et les effets sur le comportement maternel et alimentaire (prise et préférences gustatives) et le développement ont été comparés entre les différents lots. Le lot identifié « TGV » correspond au traitement en génistéine et Vinclozoline equipondéral (1mg/kg PC/j) précédemment étudié au laboratoire. Il sert de mélange de référence (TGV = Témoin GV) et permet de connaître l'impact de la diminution en teneur en vinclozoline dans les autres mélanges en comparant avec le mélange GV, ou V est apporté à une dose 100 fois plus faible (10 µg/kg PC/j). Cette étude des mélanges a été menée simultanément à l'étude des effets du BPA présentée au chapitre précédent et porte sur trois générations : F0, F1 et F2.

1. Modulation du comportement maternel

1.1. Effet faible dose d'une exposition pendant la période de gestation et de lactation (F0)

Le comportement maternel est évalué comme précédemment durant les 8 premiers jours qui suivent la mise-bas, sur la base des mêmes critères d'observation de la mère.

D'une manière générale, l'exposition des F0 pendant la gestation et la lactation n'affecte pas les trois positions d'allaitement (arc-boutée, moyenne, passive) quel que soit le traitement. Curieusement le fait de diminuer le taux de vinclozoline (mélange GVf) favorise le temps passé à l'allaitement puisque les femelles allaitent plus en position moyenne par rapport au lot témoin (GEE : $z = 2,11$; $p < 0,05$) (Figure 1).

Concernant la position de la mère par rapport au nid (Resting out/in side of the nest), les mères du lot contrôle ainsi que celles qui sont traitées passent plus de temps à l'intérieur de leurs nids, avec leurs portées. Cependant tous les traitements à l'exception du lot BPA affectent la construction du nid (Nest building). Cela se traduit par : - une baisse significative dans les lots traités par les mélanges binaires, la teneur en Vinclozoline n'influençant pas la réponse (TGV : $z = 3,53$; $p < 0,001$) (GVf : $z = -3,13$; $p < 0,001$) (GB : $z = -3,55$; $p < 0,001$) (VB : $z = 4,30$; $p < 0,0001$) par rapport au lot témoin, et par : - une augmentation significative chez les mères traitées avec le mélange ternaire (GVB : $z = -5,25$; $p < 0,0001$) (Figure 2).

La comparaison inter-groupe permet de classer les groupes selon la nature de leurs effets. Au regard de l'observation sur la construction du nid, les effets d'une exposition aux mélanges binaires se distinguent globalement de ceux induits par le mélange ternaire GVB (TGV vs GVB : $z=2,62$; $p<0,01$), et le BPA (TGV vs BPA : $z=2,71$; $p<0,01$) (Figure 2), et dans le cas particulier du mélange ternaire les femelles sont plus actives et passent plus de temps à construire leurs nids que dans les autres lots. [TGV ($z=-2,62$; $p<0,01$), BPA ($z=-4,80$; $p<0,0001$), GB ($z=-2,11$; $p<0,05$), GVf ($z=-2,33$; $p<0,01$)] (Figure 2). A noter que pour le lot BPA la statistique n'indique pas de différence significative par rapport au lot témoin. Celle-ci prend en compte le caractère répété de la mesure qui, comme le montre la figure 2, présente une courbe réponse asymptotique.

Lorsqu'on analyse les soins de la mère par rapport aux petits, on ne note pas de différence significative entre les lots en ce qui concerne le toilettage et le léchage de la région ano-génitale. Cependant l'activité « transport des petits », une augmentation significative de l'activité par rapport au lot témoin est enregistrée dans le lot recevant le mélange ternaire (GVB) ($z=-2,39$; $p<0,01$) tandis qu'une réponse intermédiaire est obtenue chez les mères exposées aux mélanges binaires (Figure 2). La comparaison inter groupe nous informe que le comportement des mères traitées au mélange TGV ne diffère pas de celui des autres groupes, alors que celles ayant reçu le mélange ternaire GVB présentent des effets plus prononcés que ceux enregistrés dans le groupe exposé au BPA ($z=-2,28$; $p<0,05$) (Figure 2).

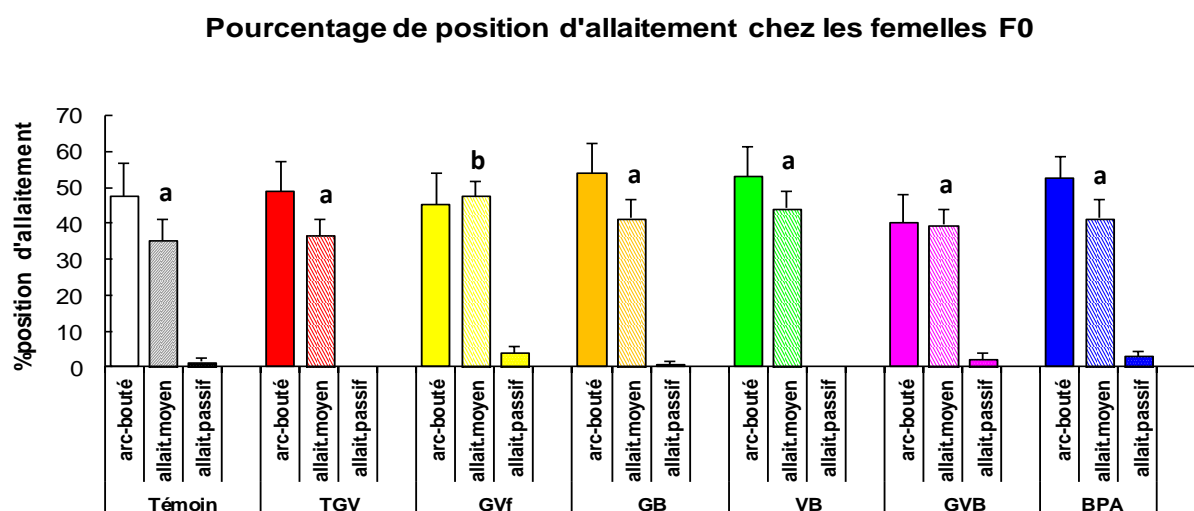
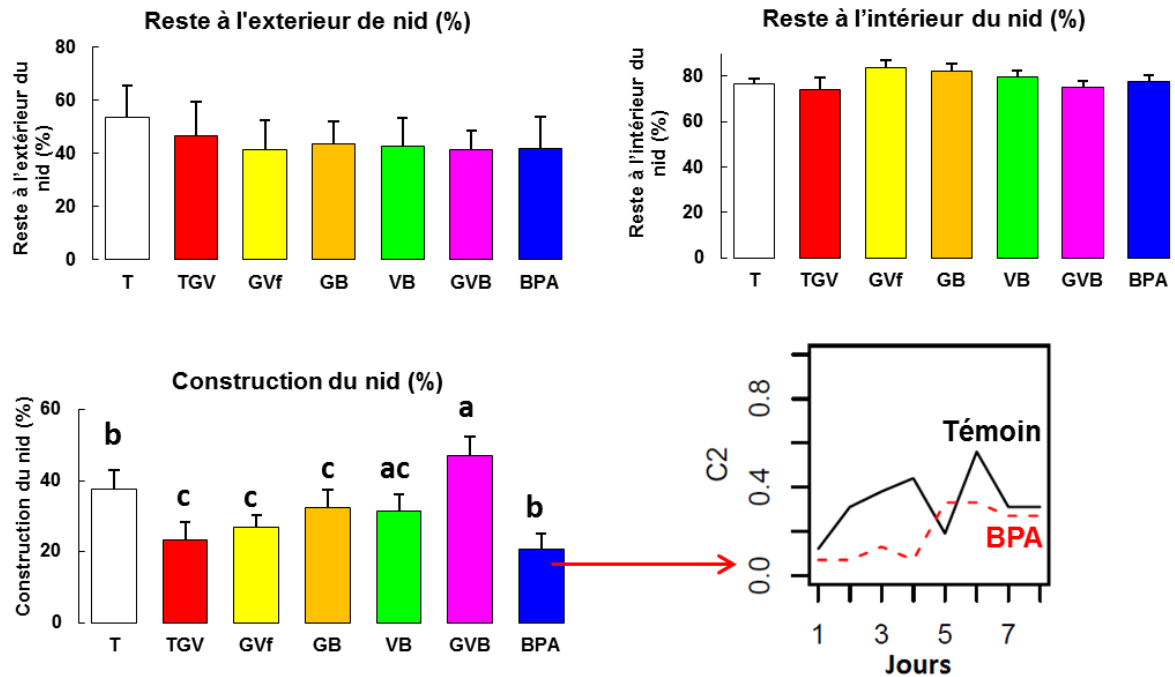


Figure 1 : Effets d'une exposition durant la gestation et la lactation aux perturbateurs endocriniens sur le comportement maternel (positions d'allaitement) des mères F0. Les résultats sont représentés par la moyenne (%) \pm SEM. a, b : des lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes (Modèle GEE, $-1,95 < z > 1,95$).

Le nid



Soins des petits

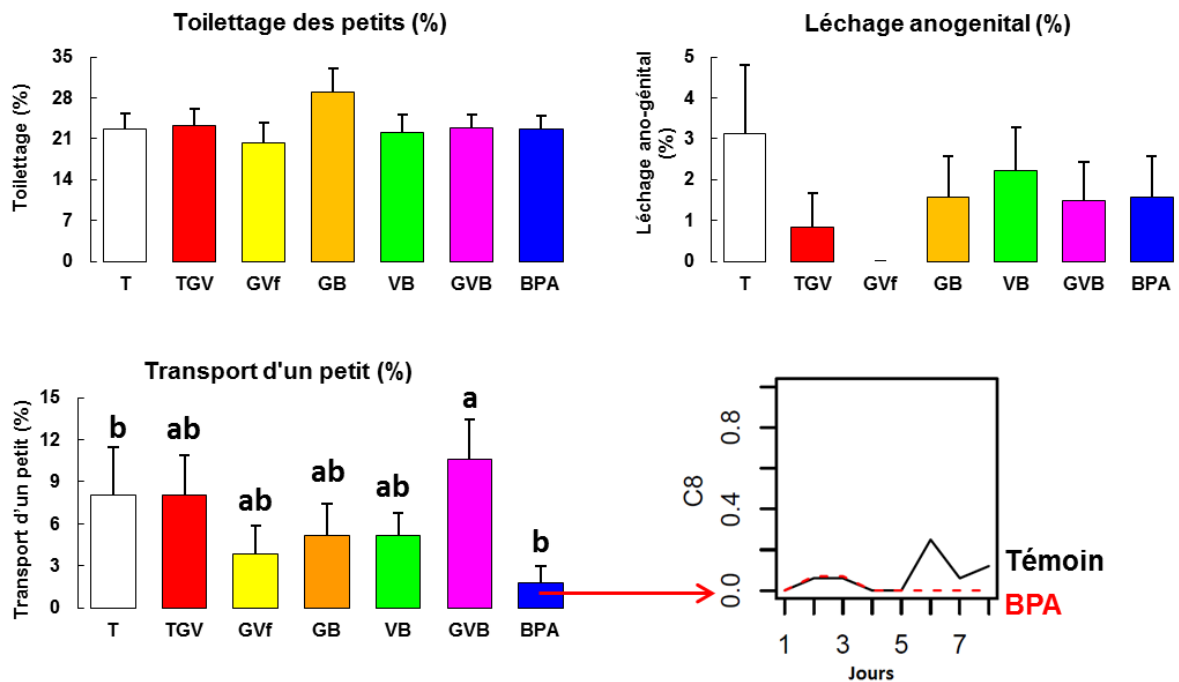


Figure 2 : Effets d'une exposition durant la gestation aux perturbateurs endocriniens sur le comportement maternel (la position par rapport au nid, la construction du nid et les soins des petits) des mères F0. Les résultats sont représentés par la moyenne (%) \pm SEM. a, b, c : des lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes (modèle GEE, $-1,95 > z > 1,95$).

Les données d'observations parallèles associées aux comportements « *non maternels* », ie des activités propres à la mère telle que l'exploration et son propre toilettage, sont représentées dans la figure 3.

La comparaison des réponses entre les différents lots de traitements par rapport au lot témoin ne montre pas d'effet sur l'exploration, mis à part une tendance à la baisse pour le lot GB.

A l'inverse, à l'exception du lot BPA et du lot GVB, la position spécifique de la mère pour l'activité : « *Se redresse sur les pattes arrière* », est significativement diminuée par rapport au témoin dans les lots TGV ($z=3,38$; $p<0,001$), GVf ($z=-3,48$; $p<0,001$), GB ($z=-3,24$; $p<0,001$), VB ($z=3,35$; $p<0,001$). Alors que celles qui sont exposées au mélange ternaire GVB présentent une augmentation significative par rapport au témoin ($z=-4,27$; $p<0,0001$), mais aussi par rapport au lot BPA ($z=-4,18$; $p<0,0001$), et aux lots GB ($z=-2,39$; $p<0,01$) et VB ($z=-2,48$; $p<0,01$) mais pas par rapport aux lots GVf et TGV. Si l'on compare avec le BPA, comme le groupe BPA (composé œstrogénique) n'est pas différent du témoin, on retrouve des réponses significativement différentes pour les lots GVf ($z=3,27$; $p<0,001$), TGV ($z=3,50$; $p<0,001$), GB ($z=2,97$; $p<0,05$), VB ($z=2,85$; $p<0,001$), GVB ($z=4,18$; $p<0,0001$). De même, les femelles du lot TGV présentent une fréquence de cette position différente par rapport à celles du lot BPA ($z=-3,50$; $p<0,001$) (Figure 3).

Le selfgrooming (auto toilettage des mères) est uniformément affecté par nos traitements avec les mélanges: TGV ($z=4,10$; $p<0,001$), GVf ($z=-4,80$; $p<0,001$), GB ($z=3,90$; $p<0,001$), VB ($z=4,25$; $p<0,001$), GVB ($z=-4,27$; $p<0,001$) (Figure 3), contrairement à ce qui est observé chez les mères recevant seulement le BPA. Ainsi, la comparaison intergroupe montre que tous les groupes n'ont pas le même effet que le BPA [GB ($z=3,18$; $p<0,01$), GVB ($z=3,82$; $p<0,001$), GVf ($z=4,86$; $p<0,0001$), TGV ($z=3,57$; $p<0,0001$), VB ($z=3,84$; $p<0,001$)]. Autre résultat, le mélange binaire GVf (vinclozoline à faible dose) à un effet plus prononcé que celui de TGV (vinclozoline forte dose) ($z=1,92$; $p<0,06$) (Figure 3).

Concernant le comportement alimentaire, le grignotage(ou prise de nourriture) n'est pas affecté par les traitements, la diminution observée dans le lot VB n'étant pas validée par l'analyse statistique (Figure 3).

Par contre, la prise d'eau est augmentée par les deux mélange binaires contenant de la vinclozoline à faible dose : GVf ($z=-2,35$; $p<0,01$) et le VB ($z=2,12$; $p<0,05$) (Figure 3). Les mères exposées au mélange binaire GVf sont plus souvent en train de boire que dans les autres lots [BPA

($z=2,62$; $p<0,01$), GB ($z=2,23$; $p<0,05$), TGV ($z=2,80$; $p<0,01$)]. Cependant le lot TGV a une action moins prononcée, et une différence significative est enregistrée avec lots GVf ($z=-2,80$; $p<0,01$) et le lot VB ($z=2,33$; $p<0,05$) (Figure 3).

Les comportements non-maternels

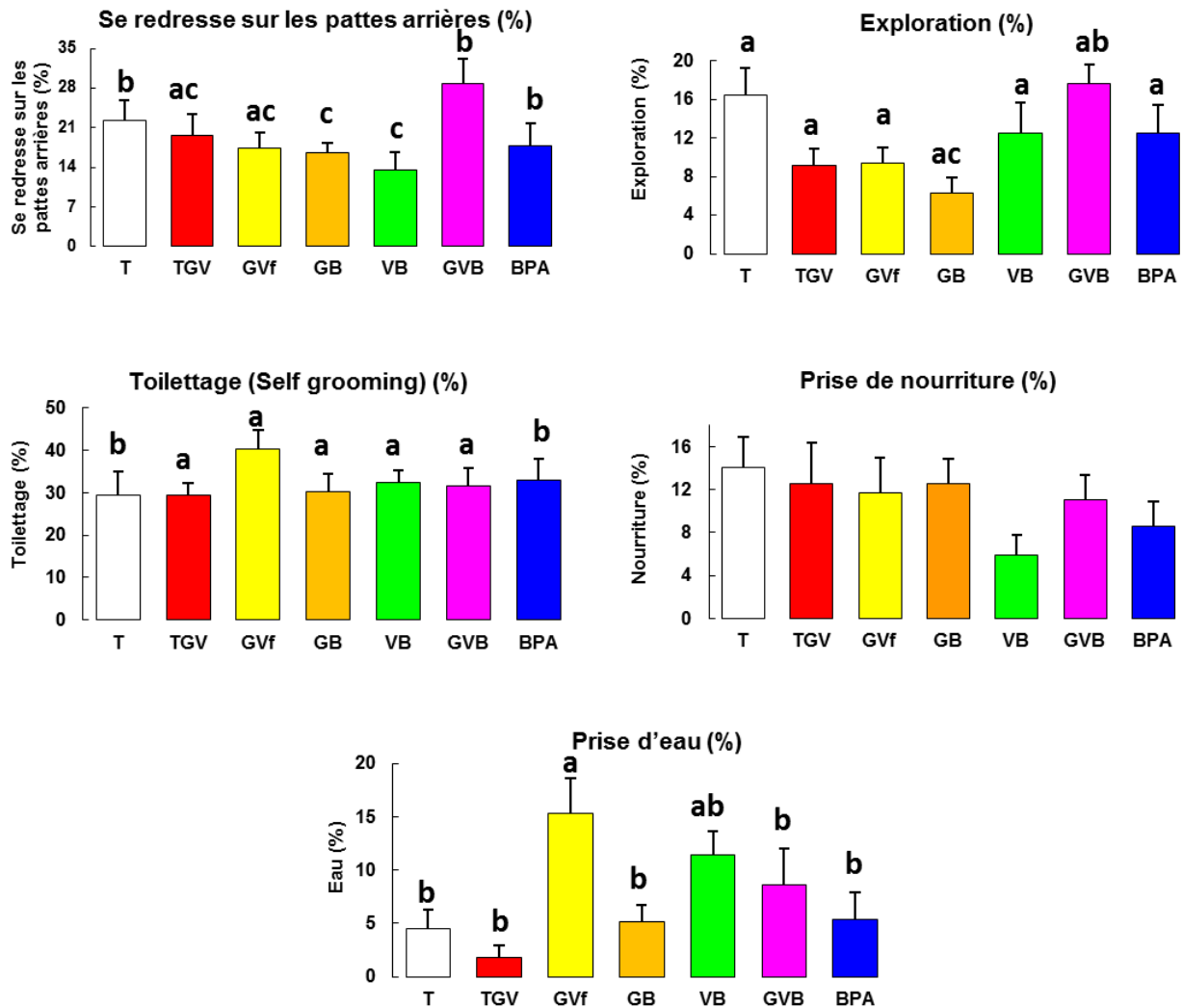


Figure 3 : Effets d’une exposition durant la gestation aux perturbateurs endocriniens sur le comportement non maternel des mères F0. Les résultats sont représentés par la moyenne (%) \pm SEM. a, b: des lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes (modèle GEE, $-1,95 > z > 1,95$).

En résumé, tandis que le BPA seul affecte peu ou pas le comportement maternel des mères exposées pendant la gestation et la lactation, notre étude identifie des effets significatifs sur plusieurs paramètres comportementaux associés au comportement maternel et non maternel. Ces effets varient selon la nature du mélange, et le mélange ternaire ne produit pas systématiquement les effets les plus néfastes, au contraire. Enfin, il faut noter que la plus faible teneur en vinclozoline peut entraîner des effets supérieurs au mélange contenant la plus forte dose.

1.2. Effet faible dose d'une exposition chronique précédent la période de gestation-lactation (depuis la conception jusqu'à l'accouplement à l'âge adulte)

Nous rappelons que les femelles F1 sont traitées depuis le premier jour de la période utérine via la mère jusqu'au sevrage, puis directement *per os* tous les deux jours depuis le sevrage jusqu'à la veille de la mise en couple (elles ne sont pas traitées pendant la période de gestation, ni pendant la lactation). Comme dans la F0, le comportement maternel de la descendance est observé dans la première semaine qui suit la mise-bas suivant le même protocole.

La figure 4, montre que nos mélanges modifient l'attitude des mères lors de l'allaitement en entraînant une baisse significative dans la position « arc bouté » dans tous les lots par rapport au lot témoin : TGV ($z=2,98$; $p<0,01$), GVf ($z=2,98$; $p<0,01$), GB ($z=2,05$; $p<0,05$), VB ($z=-3,65$; $p<0,001$), GVB ($z=4,66$; $p<0,0001$), BPA ($z=-2,92$; $p<0,01$). L'allaitement en position moyenne est également baissé mais cet effet est significatif uniquement dans le lot BPA ($z=2,84$; $p<0,01$). Bien que la position passive ne semble pas affectée par nos traitements, une tendance à la baisse est enregistrée dans tous les lots.

La comparaison intergroupe identifie des effets similaires pour les groupes d'exposition aux mélanges TGV et GVf, mais plus prononcés que les effets enregistrés suite à l'exposition au mélange ternaire GVB, où une baisse significative est enregistrée ($z= 2,68$, $p<0,01$). Le mélange ternaire a des effets également différents de ceux des autres groupes [BPA ($z=4,91$; $p<0,001$), GB ($z= 3,96$; $p<0,001$), GVf ($z= 2,90$; $p<0,01$), VB ($z= 2,83$; $p<0,01$)]. Le BPA seul n'affecte pas la position arc bouté, ce qui explique la différence des effets enregistrés par rapport aux autres groupes [GB ($z= -2,26$; $p<0,01$), GVf ($z=-3,23$; $p<0,001$), TGV ($z=-3,27$; $p<0,001$), VB ($z=-3,26$; $p<0,001$)] (Figure 4). Aucune différence inter groupe n'est enregistrée pour la position d'allaitement moyenne et passive (Figure 4).

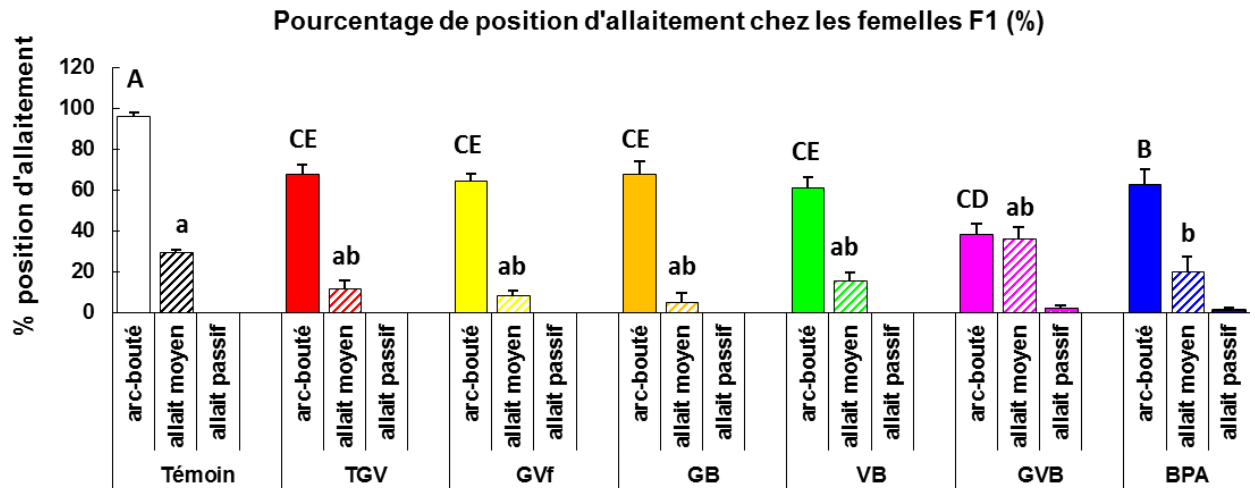
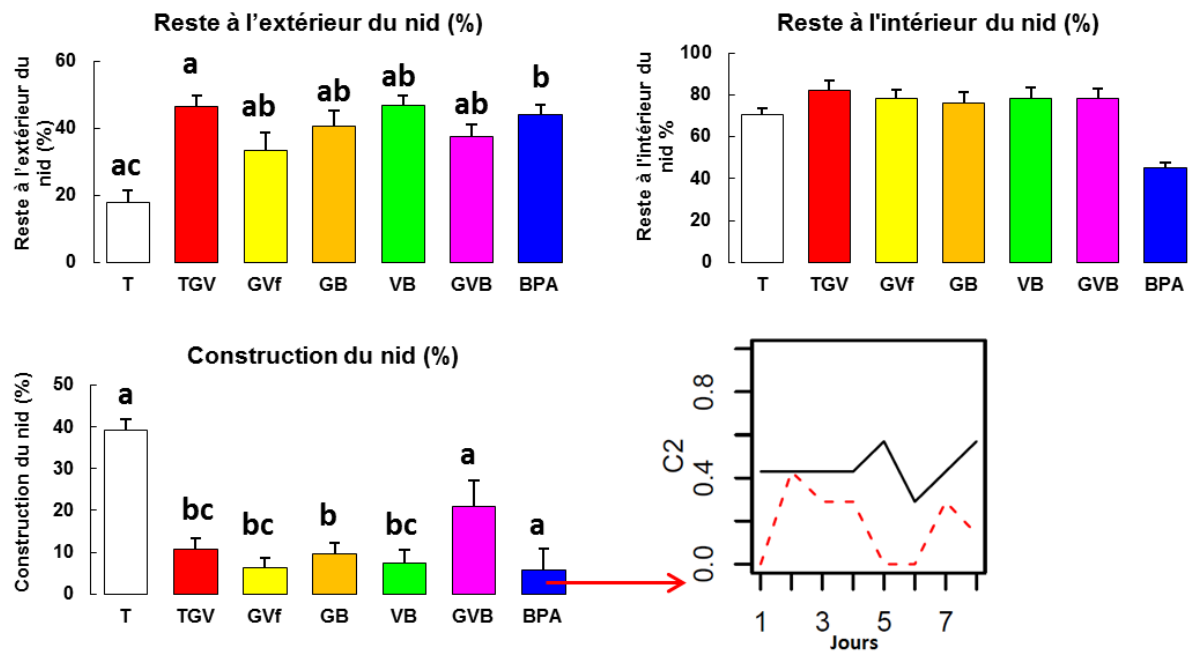


Figure 4 : Effets d'une exposition continue (de la conception à l'âge adulte) aux perturbateurs endocriniens sur le comportement maternel (positions d'allaitement) des mères F1. Les résultats sont représentés par la moyenne (%) \pm SEM. A, B, C, D, E : des lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes pour l'allaitement en arc-bouté (modèle GEE, $-1,95 > z > 1,95$). a, b des lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes pour l'allaitement en position moyenne (modèle GEE, $-1,95 > z > 1,95$).

Le nid



Soins des petits

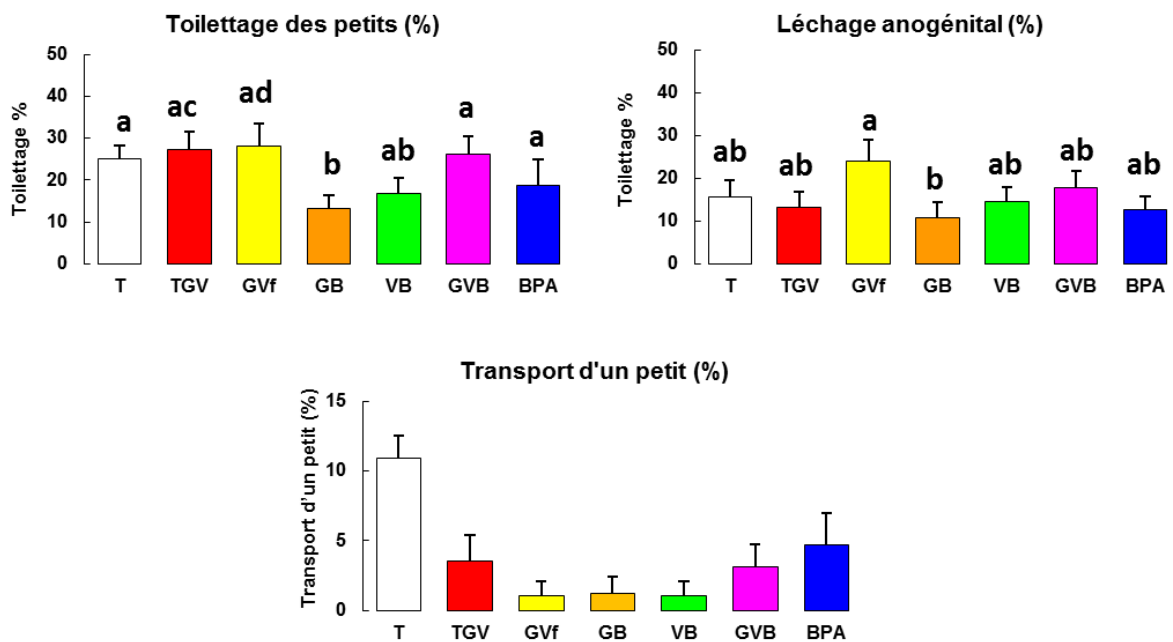


Figure 5 : Effets d'une exposition continue (de la conception à l'âge adulte) aux perturbateurs endocriniens sur le comportement maternel (la position par rapport au nid, la construction du nid et les soins des petits) des mères F1. Les résultats sont représentés par la moyenne (%) \pm SEM. a, b, c, d : des lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes (modèle GEE, $-1,95 > z > 1,95$).

La figure 5 présente la position des mères par rapport au nid. Dans cette génération (F1), les mères passent plus de temps à l'extérieur du nid, au repos loin de leurs portées, mais les résultats sont seulement significatifs pour le lot BPA ($z= 2,50$; $p<0,01$). Cependant une baisse significative d'activité représentée par la construction du nid est enregistrée par rapport au témoin dans tous les lots exposés aux mélanges binaires : TGV ($z= 2,30$; $p<0,05$), GVf ($z= 2,30$; $p<0,05$), GB ($z= 2,12$; $p<0,05$), VB ($z= -2,37$; $p<0,01$). On observe le même profil d'action pour le BPA avec le mélange ternaire GVB, mais les résultats ne sont pas significatifs. Cependant, la comparaison inter groupe montre que seul le mélange TGV (forte concentration de V) est différent du BPA ($z= 2,00$; $p<0,05$) pour la position « repos en dehors du nid », tandis qu'aucune différence est enregistrée pour le « repos à l'intérieur du nid » (Figure 5). Concernant la « construction du nid », l'absence d'effet dans les lots GVB et BPA par rapport au lot témoin explique la différence inter groupe de : GVB [GVf ($z=-1,98$; $p<0,05$)], et de BPA [GVf ($z= -4,91$; $p<0,01$), TGV ($z=-2,37$, $p<0,01$), GB ($z= 2,74$; $p<0,01$), VB ($z=-2,85$; $p<0,01$)] (Figure 5).

Le toilettage des petits n'est pas non plus significativement affecté par nos traitements, à l'exception du lot GB, où une baisse significative est observée ($z=2,12$; $p<0,05$).

Les autres paramètres ne sont pas affectés (léchage ano-génital et transport des petits), mis à part une baisse dans le transport des petits mais les résultats ne sont pas significatifs (Figure 5). La comparaison inter groupe concernant le toilettage des petits montre à nouveau que le mélange TGV n'a pas les mêmes effets que le mélange GVf ($z= 3,47$; $p<0,001$) alors que le mélange binaire GB semble avoir le plus d'effet et qu'il diffère des autres lots : [GVB ($z= 2,41$; $p<0,01$), TGV ($z=2,23$; $p<0,05$), BPA ($z= 2,22$; $p<0,05$), GVf ($z= 2,59$; $p<0,01$)] (Figure 5). L'absence d'effet dans le lot GVB peut expliquer les différences significatives enregistrées par rapport aux autres lots [VB ($z= -2,28$; $p<0,01$)]. On établit le même constat avec le BPA [GVf ($z=3,47$; $p<0,001$), VB ($z= -2,09$; $p<0,05$)] (Figure 5). L'analyse des différences inter groupe pour le léchage de la région ano-génitale montre que l'action du mélange binaire GVf est différente de celle exercée par le mélange GB ($z=2,30$; $p<0,01$) (Figure 5), et aucune différence inter groupe n'est enregistrée pour le transport des petits.

Les comportements non-maternels

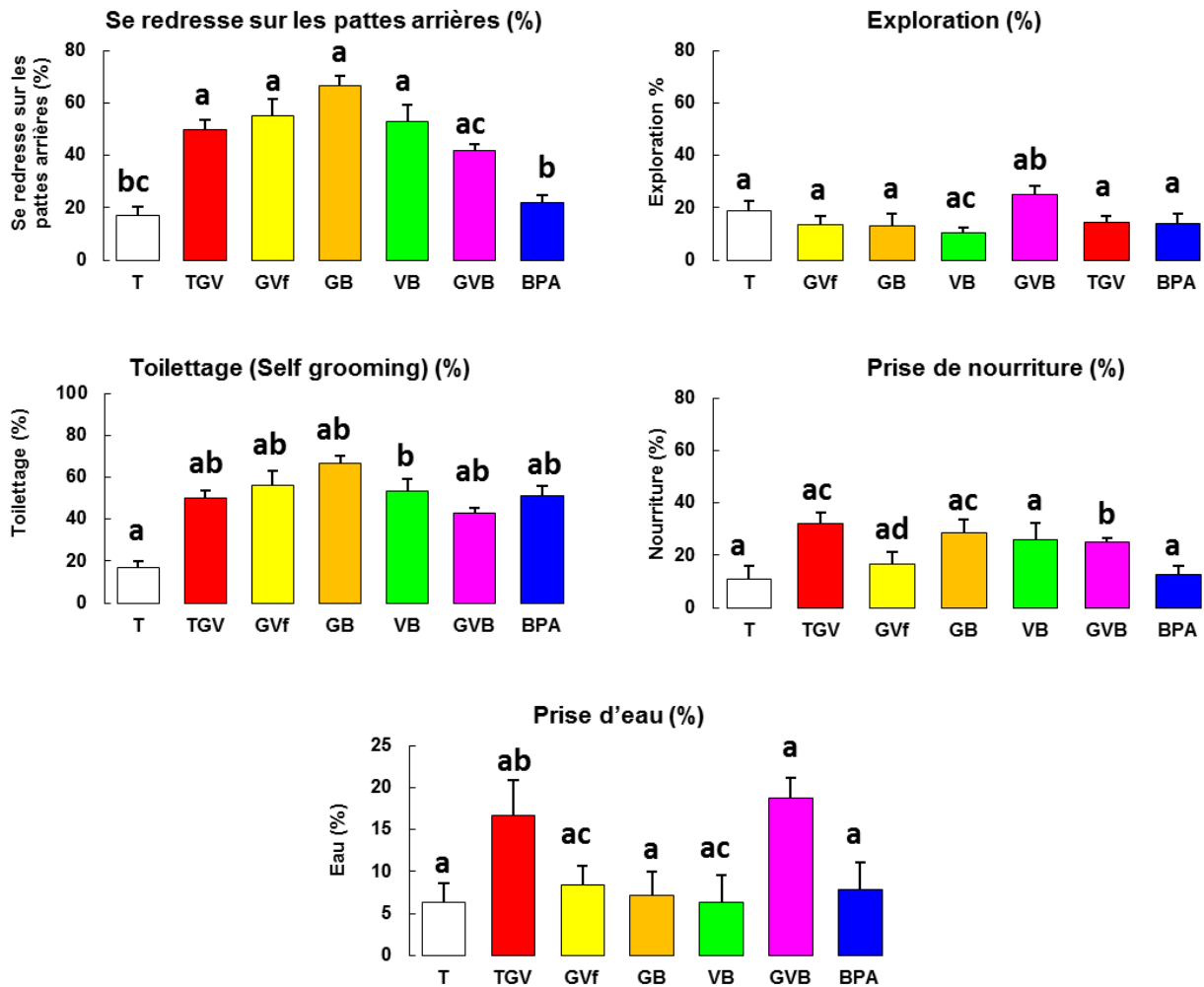


Figure 6 : Effets d'une exposition continue (de la conception à l'âge adulte) aux perturbateurs endocriniens sur le comportement non maternel des mères F1. Les résultats sont représentés par la moyenne (%) \pm SEM. a, b, c, d : des lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes (modèle GEE, $-1,95 > z > 1,95$).

En ce qui concerne les comportements non-maternels, comme le montre la figure 6, la fréquence de la position des mères sur les pattes arrières est augmentée par tous nos mélanges binaires, avec une augmentation significative dans les lots : TGV ($z = -3,37$; $p < 0,001$), GVf ($z = -3,37$; $p < 0,001$), GB ($z = -3,33$; $p < 0,001$), VB ($z = 2,35$; $p < 0,01$). Chez les mères exposées au mélange ternaire GVB on note une tendance à l'augmentation mais les résultats ne sont pas significatifs.

La comparaison inter groupe de cette observation, montre que les mélanges binaires provoquent le même profil d'action, et leur différence par rapport au lot témoin explique également leur différence avec le lot BPA [GB ($z = 3,79$; $p < 0,0001$), GVB ($z = 2,21$; $p < 0,05$), GVf ($z = 3,17$; $p < 0,001$), TGV ($z = 2,89$; $p < 0,01$), VB ($z = 2,69$; $p < 0,01$)] puisqu'il n'a pas d'effet par rapport au lot

témoin (Figure 6). Une forte tendance à l'augmentation existe aussi dans le lot GVB par rapport au lot GB ($z=1,94$; $p<0,06$).

Le paramètre « exploration » n'est affectée par aucun de nos traitements comme le montre la figure 6. Cependant une différence inter groupe pour ce comportement (exploration) est significative entre les deux lots GVB/VB ($z= -2,21$; $p<0,05$) (Figure 6).

Concernant le selfgrooming (toiletage), une tendance à l'augmentation est enregistrée dans tous les lots traités mais elle est significative uniquement dans le lot VB ($z= -3,79$; $p<0,0001$). Cependant aucune différence inter groupe n'a été enregistrée (Figure 6).

De même, la prise de nourriture tend à être plus fréquente dans tous les lots, mais de manière significative uniquement chez les mères exposées au mélange ternaire GVB ($z= -1,98$; $p<0,05$) (Figure 6). L'analyse des différences inter groupes montre que le lot exposé au mélange binaire GVf est différent de celui exposé au TGV ($z= -2,33$; $p<0,01$), et au GB ($z= -2,18$; $p<0,05$) (Figure 6). Le paramètre « prise d'eau » n'est pas affecté sauf dans les lots TGV et GVB où on enregistre une tendance à l'augmentation par rapport au témoin. Cependant des différences inter groupe sont significatives pour les lots GVf et VB par rapport au lot TGV [GVf ($z=-2,00$; $p<0,01$), VB ($z= -2,17$; $p<0,05$)] (Figure 6).

En résumé, les effets des mélanges sur le comportement maternel des animaux exposés depuis la conception sont la plupart du temps supérieurs à celui du BPA, mais varient aussi selon la composition du mélange. L'intensité et la fréquence de ces effets sont augmentées par rapport à la génération précédente. En conclusion de cette première partie, il est difficile d'attribuer les effets sur un paramètre donné à une fonction œstrogénique ou anti-androgénique et donc de prédire l'action des molécules selon leur nature œstrogénique ou anti-androgénique, car d'autres paramètres interviennent, tels que la dose de chaque molécule dans un mélange. C'est le cas des différences d'action dans nos mélanges binaires : TGV et GVf où la seule différence est la dose de la vinclozoline (1 mg ou 10 µg). L'autre paramètre important est celui du nombre de molécules qui constitue le mélange, et nos résultats montrent que ce n'est pas toujours le mélange le plus complexe qui a le plus d'effets.

2. Modulation des préférences gustatives

2.1. Effet faible dose d'une exposition précoce (gestation/lactation) sur le dimorphisme sexuel des préférences gustatives

2.1.1. Chez le rat immature (J25)

Dans la continuité de notre première étude sur le BPA, celle-là vise à identifier les effets des mélanges de perturbateurs endocriniens sur les préférences gustatives ainsi que sur l'expression du dimorphisme sexuel qui y est associé. A notre connaissance et à ce jour il n'y a pas d'étude qui traite le sujet des effets cocktails sur des préférences gustatives et le dimorphisme sexuel. Cependant quelques études montrent la capacité des perturbateurs endocriniens à altérer ce dimorphisme sexuel chez le rongeur ([Palanza et al 2002a](#)). Parmi les trois saveurs qui ont été testées, le dimorphisme sexuel n'est pas bien marqué à l'âge immature. Nos résultats sont conformes aux données de la littérature qui précisent que ce dimorphisme apparaît à l'âge adulte sous l'influence des hormones sexuelles ([Curtis et al 2004](#)). Notre modèle expérimental est donc bien adapté pour observer l'évolution des préférences gustatives « sucré », « salé » et « gras » sous l'action des PE en fonction du stade de développement.

a) Le sucré :

Comme mentionné au chapitre précédent, chez les témoins, les mâles consomment un peu moins de sucre que les femelles dans le lot des témoins, mais la préférence au goût sucré est équivalente et le dimorphisme sexuel est insignifiant au stade immature. De même à ce stade, un traitement par le BPA a peu d'effet, chez le mâle comme chez la femelle. En revanche, des divergences entre mâle et femelles apparaissent dans les lots recevant des mélanges (Figure 7).

Chez les mâles, les 3 mélanges binaires contenant la vinclozoline (GVf, VB et TGV) entraînent une augmentation dans la consommation de sucré. Pour le lot VB on observe une plus grande consommation chez les mâles traités par rapport au témoin (+ 26% ; $p < 0,05$), cette différence est compensée par une diminution de la consommation d'eau (Figure 7). A la différence de nos expérimentations antérieures, ce mélange TGV entraîne bien une augmentation de la prise de sucré et de la préférence chez le mâle, mais cela ne ressort pas significatif, et la diminution de la teneur en vinclozoline dans le mélange GVf n'a pas de conséquence.

Chez les femelles, on observe quelques fluctuations entre les lots au niveau de la prise de saccharine : seul le mélange GVB stimulerait la consommation de saccharine tandis que le mélange VB, contrairement à ce que nous observons chez le mâle, est sans effet. Pour les autres lots, on note une tendance à diminuer la consommation de saccharine, surtout pour le mélange GB. En parallèle, la consommation d'eau chez les femelles est légèrement plus faible pour tous les lots traités, et cet effet est plus marqué pour le lot traité avec le mélange ternaire GVB (Figure 7).

Le calcul des préférences montre qu'il existe une préférence au sucré chez les mâles aussi bien que chez les femelles (>70%). Les fluctuations observées dans la prise de saccharine ne se répercutent pas de manière significative sur les préférences. Dans le même sens aucune différence inter groupe n'a été enregistrée chez les mâles comme chez les femelles (Figure 7).

b) Le salé :

Dans le lot témoin, les mâles consomment les mêmes quantités de solution salée que les femelles au stade immature. Dans les lots traités, chez les mâles comme chez les femelles, les traitements n'ont pas affecté la consommation du salé. La consommation d'eau n'est pas affectée non plus si l'on compare par rapport au témoin du même sexe, cependant, mis à part pour le lot GB, un dimorphisme sexuel apparaît dans tous les lots ($p < 0,05$) (Figure 7). A noter que la consommation d'eau est élevée (> 10 mL/j) au cours de ce test, en particulier chez les femelles (Figure 7). Toutefois, le pourcentage de la préférence au salé n'a pas dépassé les 50% (c'est même une légère aversion), et aucun traitement ne semble l'affecter, sauf dans le lot BPA, où le dimorphisme s'accroît par diminution de la préférence chez les femelles ($p < 0,05$). Aucune différence inter groupe n'est enregistrée chez les mâles comme chez les femelles (Figure 7).

c) Le gras :

Au stade immature, les mâles consomment moins de solution huileuse que les femelles, mais leur consommation n'est pas significativement affectée par les traitements. Chez les femelles, par contre, deux mélanges binaires, le GB et le TGV, entraînent une légère baisse dans la consommation du gras. Parallèlement, aucun traitement ne semble affecter la consommation d'eau quel que soit le sexe, cependant le dimorphisme sexuel s'exprime de manière significative chez les rats exposés au mélange binaire TGV ($p < 0,05$). La préférence au gras n'est pas affectée par nos traitements chez les deux sexes (Figure 7). Dans le même sens, la comparaison inter groupe confirme cette absence

d'effet du traitement, bien que, chez les femelles, le mélange GVf semble avoir une action distincte de celle du TGV (Figure 7).

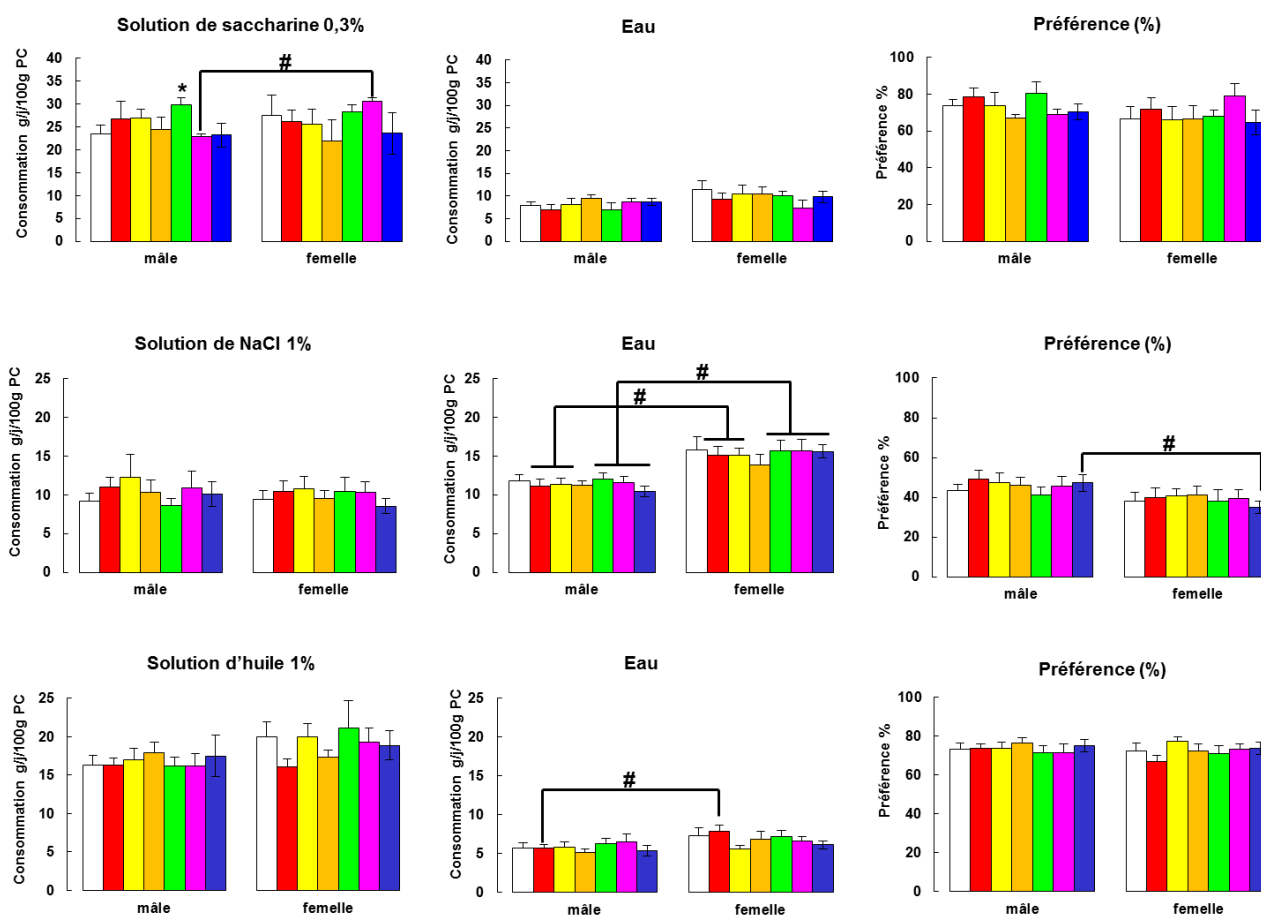


Figure 7 : Effets des perturbateurs endocriniens sur la consommation de saccharine (0,3%), NaCl (1%), d'huile (1%) et d'eau et sur la préférence chez les rats F1 à l'âge immature exposés *in utero*. Les résultats sont représentés par la moyenne \pm SEM (n=12/sexe/groupe). * indique une différence significative par rapport au lot témoin du même genre. # indique un dimorphisme sexuel (Anova mesures répétées, $p < 0,05$). □Contrôle, ■TGV, ■GVf, ■GB, ■VB, ■GVB, ■BPA.

2.1.2. Chez le rat adulte (J100)

a) Le sucré :

Comme le montre la figure 8, les femelles dans le lot témoin consomment deux fois plus de saccharine que les mâles, pour une consommation équivalente d'eau, donnant lieu à un dimorphisme significatif.

Dans les lots traités, on constate de nombreuses fluctuations de consommation de saccharine et d'eau pour les deux sexes. Prise individuellement et comparées au témoin du même sexe, elles ne sont pas statistiquement significatives (Figure 8). Cependant, lorsqu'on prend en compte le dimorphisme, on constate que ces fluctuations dans la consommation de saccharine suffisent pour faire disparaître le dimorphisme dans le lot GVf alors qu'il reste significatif dans tous les autres lots ($p < 0,05$). De plus, chez la femelle, ces différences sont compensées par des fluctuations de consommation d'eau dans les lots traités qui aboutissent à l'apparition d'un dimorphisme sexuel pour les lots contenant la vinclozoline et/ou le BPA : TGV, GVf, VB et BPA (Figure 8). A l'inverse, l'association genisteine /Bisphénol A n'a pas d'effet.

Toutefois, le calcul de la préférence au sucré n'identifie pas d'effet significatif des traitements, sauf dans le lot GB, où l'effet significatif sur la moindre consommation d'eau ($p < 0,05$) se répercute sur la préférence de manière suffisante pour entraîner un dimorphisme sexuel significatif ($p < 0,05$). (Figure 8).

b) Le salé :

Les mâles consomment normalement deux fois moins de solution salée que les femelles d'où la présence d'un dimorphisme sexuel pour cette saveur ($p < 0,05$). Il en est de même pour la consommation d'eau, qui est supérieure chez les femelles. Cette différence de consommation se traduit par une faible préférence (voir une légère aversion) pour le salé chez les mâles par rapport aux femelles. Lorsqu'on considère les effets des traitements, on ne constate pas d'effets significatifs sur les consommations de salé chez les mâles comme chez les femelles par rapport au témoin du même sexe, et la différence inter sexe est maintenue dans tous les groupes. La consommation d'eau n'est pas affectée non plus, cependant le dimorphisme sexuel est perdu dans tous les lots à l'exception du lot GVf ($p < 0,05$)

Chez les femelles traitées par les mélanges GB et VB, l'augmentation de la prise de salé est compensée par une prise d'eau, et il en résulte un dimorphisme sexuel significatif sur la préférence. A l'inverse, dans le lot BPA, c'est la diminution de préférence chez les mâles qui entraîne un dimorphisme significatif. Curieusement, les effets du mélange GVB ne ressortent pas significatifs lors de notre analyse statistique, qui prend en compte le caractère répété de la mesure (Figure 8).

Le pourcentage de la préférence au salé est de 40% chez les mâles, et aucun traitement ne semble l'affecter lorsqu'on compare par rapport au témoin du même sexe, de même qu'aucune différence inter groupe n'est enregistrée dans les deux sexes. Un dimorphisme sexuel significatif est cependant identifié dans les lots GB, VB et BPA ($p < 0,05$) (Figure 8).

c) **Le gras :**

Chez l'adulte, la consommation de gras est très supérieure chez la femelle par rapport au mâle, mais cette surconsommation s'accompagne aussi d'une plus forte consommation d'eau. De fait, bien qu'une forte différence inter sexe soit enregistrée pour la prise des deux boissons, il n'y a pas de différence inter-sexe sur la préférence au gras, qui dans les deux cas est proche de 70%. En ce qui concerne l'effet des traitements sur la consommation de gras, on note des fluctuations plus importantes chez la femelle que chez le mâle, mais celles-ci ne suffisent pas à abolir le dimorphisme sexuel qui se maintient dans tous les lots ($p < 0,05$).

De même, les traitements n'affectent pas de manière significative la consommation d'eau chez les mâles, tandis qu'une baisse significative est observée chez les femelles du lot TGV ($p < 0,05$), et qu'un dimorphisme est uniquement détecté dans le lot VB ($p < 0,05$). La préférence au gras n'est pas affectée par nos traitements chez les deux sexes, mais une tendance à la baisse est notée dans le lot BPA (Figure 8). Aucune différence inter groupes n'a été enregistrée chez les deux sexes.

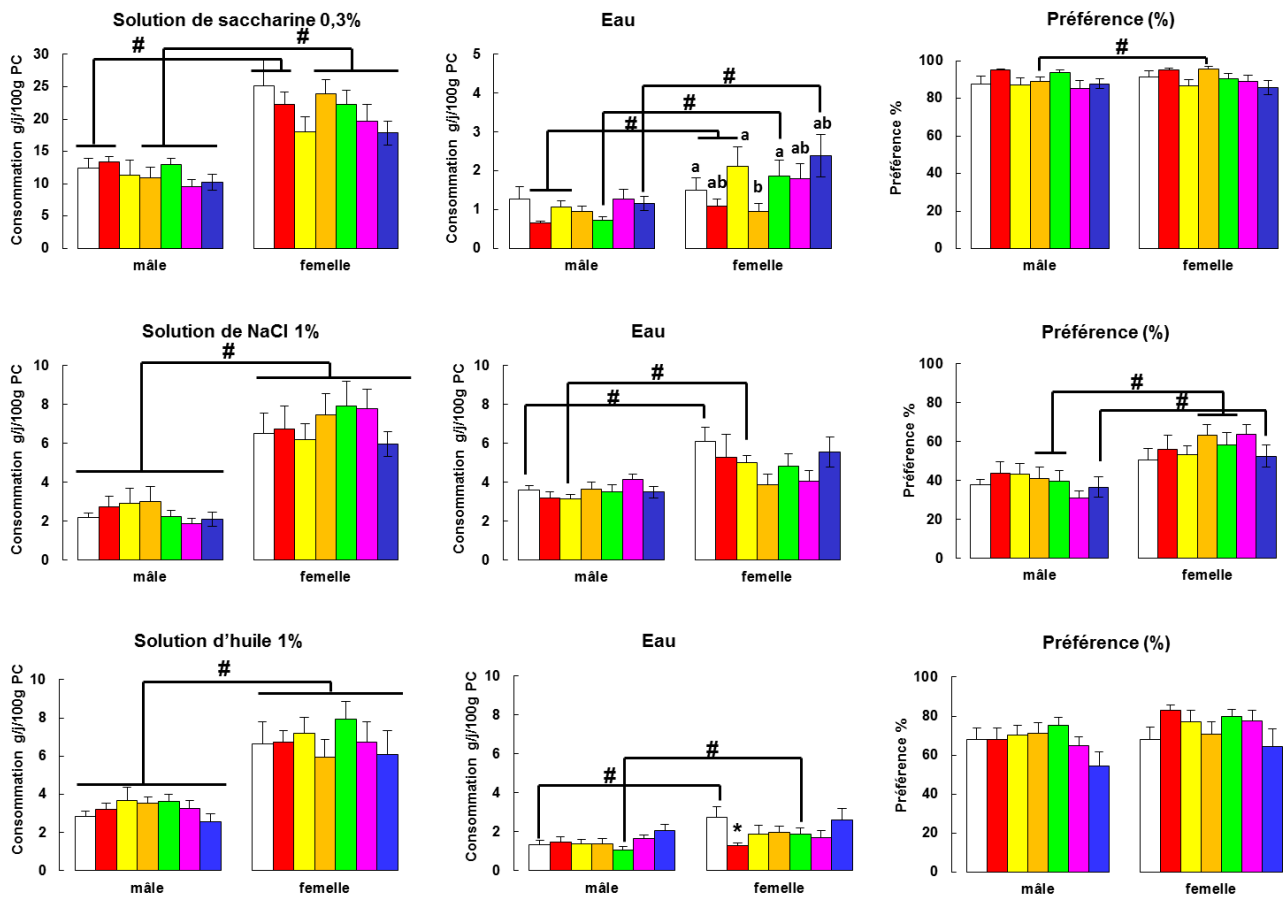


Figure 8 : Effets d'une exposition continue (de la conception à l'âge adulte) aux perturbateurs endocriniens sur la consommation de saccharine (0,3%), NaCl (1%), d'huile (1%) et d'eau et la préférence chez les rats F1 à l'âge adulte. Les résultats sont représentés par la moyenne \pm SEM (n=12/sexe/groupe). * indique une différence significative par rapport au lot témoin du même genre. # indique un dimorphisme sexuel (Anova mesures répétées, $p < 0,05$). □Contrôle, ■TGV, ■GVf, ■GB, ■VB, ■GVB, ■BPA.

En résumé, une exposition précoce à des mélanges de PE module faiblement les préférences gustatives chez le rat quel que soit le sexe. Toutefois, l'exposition au mélange GB conduit à une meilleure expression du dimorphisme sexuel portant sur la préférence du sucré et du salé

2.2. Effet multi-générationnel d'une exposition continue à faible dose sur le dimorphisme sexuel des préférences gustatives de la descendance non exposée (F2)

2.2.1. Chez le rat immature (J25)

a) Le sucré :

Chez les mâles, nos traitements entraînent une baisse dans la consommation de sucré surtout dans le lot GVf où elle est significative ($p < 0,05$). Chez les femelles une baisse dans la consommation du sucré est également retrouvée dans le lot GVf, mais aussi dans les lots VB, GVB ($p < 0,05$). Par ailleurs, la différence inter-sexe est plus prononcée dans les lots GVB et BPA ($p < 0,05$). Chez les mâles comme chez les femelles une baisse significative dans la prise d'eau est enregistrée dans les lots TGV et BPA ($p < 0,05$) où un dimorphisme sexuel apparaît dans ce dernier lot ($p < 0,05$) (Figure 9).

Le calcul des préférences identifie l'action des deux traitements (TGV et GVf) chez les mâles ainsi que chez les femelles : ($p < 0,05$) (Figure 9). Une baisse significative de la préférence est également enregistrée chez les femelles dans le lot BPA ($p < 0,06$) où un dimorphisme sexuel apparaît ($p < 0,05$) (Figure 9).

Cependant l'analyse des différences inter groupe sur la consommation de la solution sucrée, ne révèle aucune différence significative. Par contre, la prise d'eau pour le mélange binaire GVf est inférieure à celle du mélange TGV (vinclozoline forte dose), tout comme celle du lot BPA ($p < 0,05$), et ceci chez les deux sexes. Concernant la préférence, les deux lots traités au mélange GV se distinguent de tous les autres groupes, le lot GVf étant significativement inférieur, à l'image de celui observé dans le lot BPA, et le lot TGV étant significativement supérieur dans les deux sexes ($p < 0,05$) (Figure 9).

b) Le salé :

La plus forte consommation du salé chez les femelles par rapport aux mâles est retrouvée dans tous les groupes, et un dimorphisme sexuel est présent chez les rats exposés aux mélanges GVf, et à ceux contenant le BPA (GB, VB et GVB). Chez les mâles, à l'exception du lot TGV, où la consommation est supérieure à celle du lot témoin, tous les autres traitements diminuent la consommation du salé, en particulier dans les lots GB et GVB ($p < 0,05$) (Figure 9). Chez les femelles,

le profil d'action des molécules est moins prononcé que celui des mâles, et aucun effet n'est significatif.

Parallèlement, on note que la prise d'eau compense les variations observées pour la prise de salé : c'est en particulier le cas pour le lot TGV et le lot VB. Chez la femelle, ces variations ne sont pas significatives. Cependant la différence inter-sexe observée dans le lot témoin n'est pas retrouvée dans les lots traités. (Figure 9).

A noter une réponse différente du mélange binaire TGV par rapport au mélange contenant la plus faible dose de vinclozoline (GVf) vis-à-vis de la consommation de salé et d'eau chez mâles, mais les effets sont pas significatifs sauf dans la prise du salé (Figure 9). Aussi une différence significative est enregistrée entre le lot TGV et le lot GVB ($p < 0,05$). Pour la prise d'eau le mélange TGV est différent du VB ($p < 0,05$) (Figure 9).

Le calcul de la préférence chez les mâles montre une baisse significative seulement dans les lots recevant la génistéine couplée au BPA, i.e. les lots GB et GVB ($p < 0,05$), avec la présence d'un dimorphisme sexuel significatif dans le lot GVB ($p < 0,05$). A noter que chez les mâles, le niveau de la préférence au salé dans le lot GVB est différent de celui des lots Témoin et TGV ($p < 0,05$) tandis que chez les femelles aucune différence inter groupe n'est enregistrée, quel que soit le paramètre considéré (prise de salé, d'eau ou préférence).

c) Le gras :

D'une manière générale, les femelles consomment plus de gras que les mâles quel que soit le lot considéré. Toutefois, le dimorphisme sexuel de la consommation d'huile n'est pas maintenu dans tous les lots en raison des effets différents obtenus sur l'un ou l'autre sexe. C'est le cas des lots GVf, VB et GVB, pour lesquels la consommation chez les mâles n'est pas du tout affectée alors qu'elle est plus ou moins diminuée chez les femelles. Cependant chez les mâles comme chez les femelles, aucun de nos traitements ne semble affecter de manière significative la consommation de gras.

Concernant la prise d'eau, le dimorphisme inter sexe observé dans le lot témoin est uniquement retrouvé dans le lot VB ($p < 0,05$).

Pour un même sexe, aucun traitement n'affecte prise de gras, d'eau ou la préférence au gras chez les deux sexes. Et l'analyse des différences inter groupes ne révèle aucune différence significative chez les deux sexes (Figure 9).

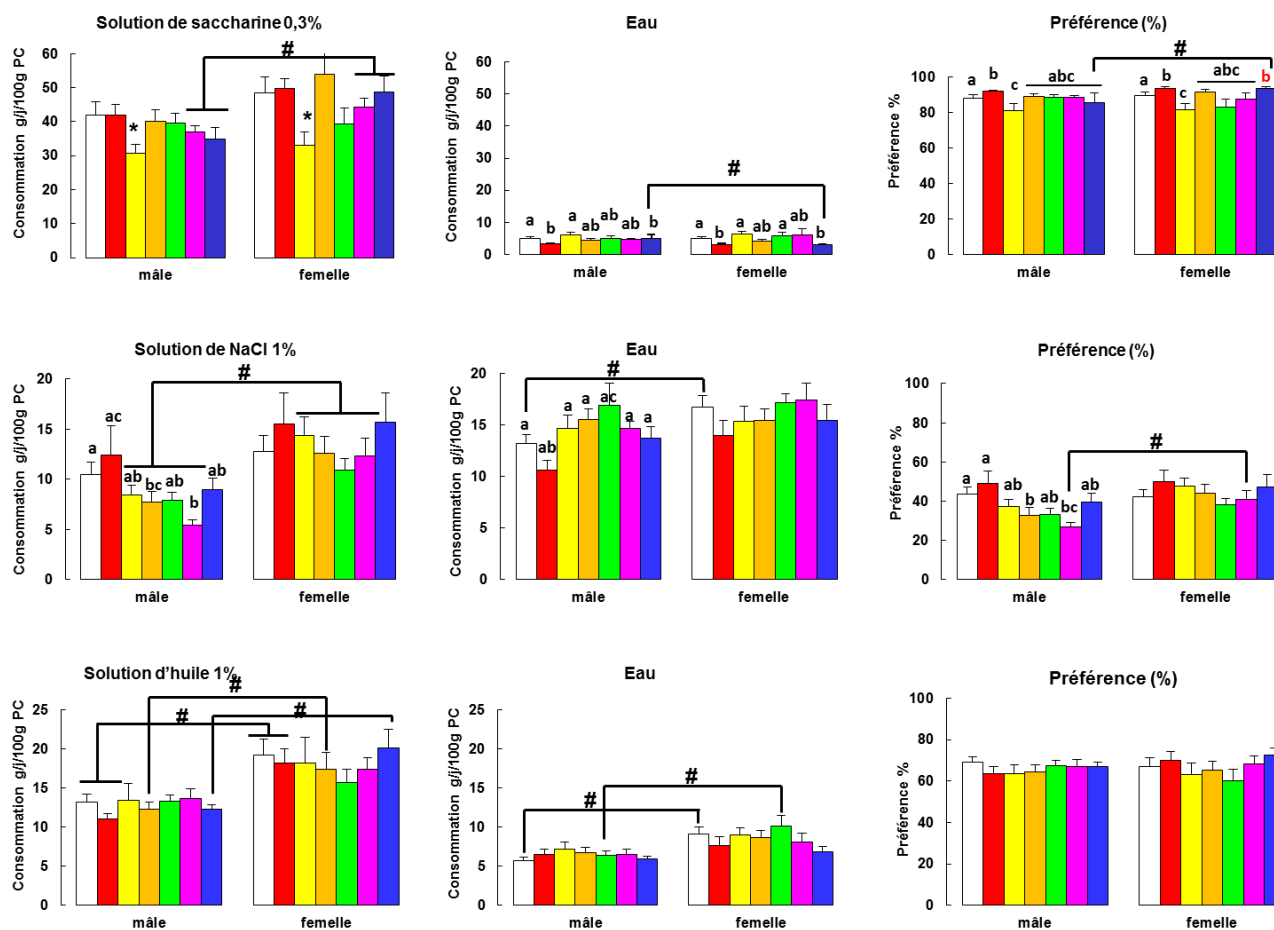


Figure 9 : Effets des perturbateurs endocriniens sur la consommation de saccharine (0,3%), NaCl (1%), d'huile (1%) et d'eau et la préférence chez les rats F2 non exposés à l'âge immature dont les deux parents ont été exposés. Les résultats sont représentés par la moyenne \pm SEM (n=12/sexe/groupe). * indique une différence significative par rapport au lot témoin du même genre. # indique un dimorphisme sexuel. a, b, c : des lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes (Anova mesures répétées, $p < 0,05$). b : signifie une différence significative par rapport au lot témoin avec $p < 0,06$. □ Contrôle, ■ TGV, ■ GVf, ■ GB, ■ VB, ■ GVB, ■ BPA.

2.2.2. Chez le rat adulte (J100)

a) Le sucré :

A l'âge adulte les mâles consomment moins de solution sucrée que les femelles, et ce dimorphisme sexuel est présent dans tous les lots. Cependant, alors que la consommation du sucré n'est pas significativement affectée par les traitements chez les mâles, une baisse générale est enregistrée chez les femelles, et cette baisse est significative dans les deux lots recevant le mélange génisteine /vinclozoline, *i.e.* les lots GVf et TGV ($p < 0,05$) (Figure 10).

Concernant la prise d'eau chez les mâles comme chez les femelles, aucun traitement n'affecte significativement la prise d'eau, une tendance à l'augmentation de la prise d'eau est observée dans les lots GVf et VB. Le dimorphisme sexuel est maintenu tandis que la diminution de la prise d'eau chez les mâles des lots TGV, GB et GVB suffit pour abolir la différence inter sexe, contrairement aux variations observées dans le lot BPA ($p < 0,05$) (Figure 10).

Aucun traitement n'affecte les préférences au sucré dans les deux sexes, mais une différence inter sexe est observée dans le lot VB ($p < 0,05$). Dans le même sens aucune différence inter groupe n'a été enregistrée chez les mâles ainsi que chez les femelles (Figure 10).

b) Le salé :

Chez les rats du groupe contrôle, les mâles consomment 3 fois moins de solution de salé que les femelles ($p < 0,05$), et ce dimorphisme sexuel est présent dans tous les lots. Chez les mâles tous nos traitements entraînent une baisse dans la prise du salé, mais elle est significative uniquement dans deux lots VB et GVB ($p < 0,05$) (Figure 10). Chez les femelles c'est le même profil d'action des molécules mais la baisse est significative uniquement dans le lot BPA ($p < 0,05$) (Figure 10).

La consommation d'eau ne traduit pas systématiquement une compensation de la consommation de salé : aucun traitement ne l'affecte chez les mâles. Chez les femelles, seul le mélange VB entraîne une augmentation significative dans la prise d'eau ($p < 0,05$) qui se traduit par une baisse significative dans le calcul de la préférence ($p < 0,05$). Une légère tendance à baisser la préférence chez les mâles ainsi que chez les femelles est observée dans tous les autres lots (Figure 10).

Aucune différence inter groupe n'a été enregistrée chez les mâles et chez les femelles cependant le mélange GVB semble avoir un effet amplificateur surtout chez les mâles (Figure 10).

c) Le gras :

La prise de la solution grasse est deux fois moins importante chez les mâles par rapport aux femelles dans le lot témoin comme dans les autres lots ($p < 0,05$). Cependant nos traitements n'ont pas d'effet sur la prise du gras chez les mâles, alors que chez les femelles, une tendance à baisser la prise du gras est significative dans le lot BPA ($p < 0,05$) (Figure 10).

La prise d'eau n'est pas affectée ni chez les mâles ni chez les femelles à l'exception du lot GB où les femelles consomment moins d'eau ($p < 0,05$). Le dimorphisme sexuel est présent uniquement dans le lot témoin et le VB ($p < 0,05$) (Figure 10).

Enfin le calcul de la préférence montre que nos traitements n'affectent pas la préférence par rapport au témoin d'un même sexe, mais une différence inter sexe est observée dans les lots GVF, TGV et GB ($p < 0,05$) (Figure 10).

L'analyse des différences inter groupes montre que chez les mâles la consommation de la solution grasse dans le groupe GVf semble avoir l'effet le plus prononcé. Ce mélange agit d'une manière opposée au mélange VB, et il en résulte une différence significative ($p < 0,05$). Cette différence persiste lors du calcul de la préférence. Chez les femelles aucune différence inter groupe n'est enregistrée (Figure 10).

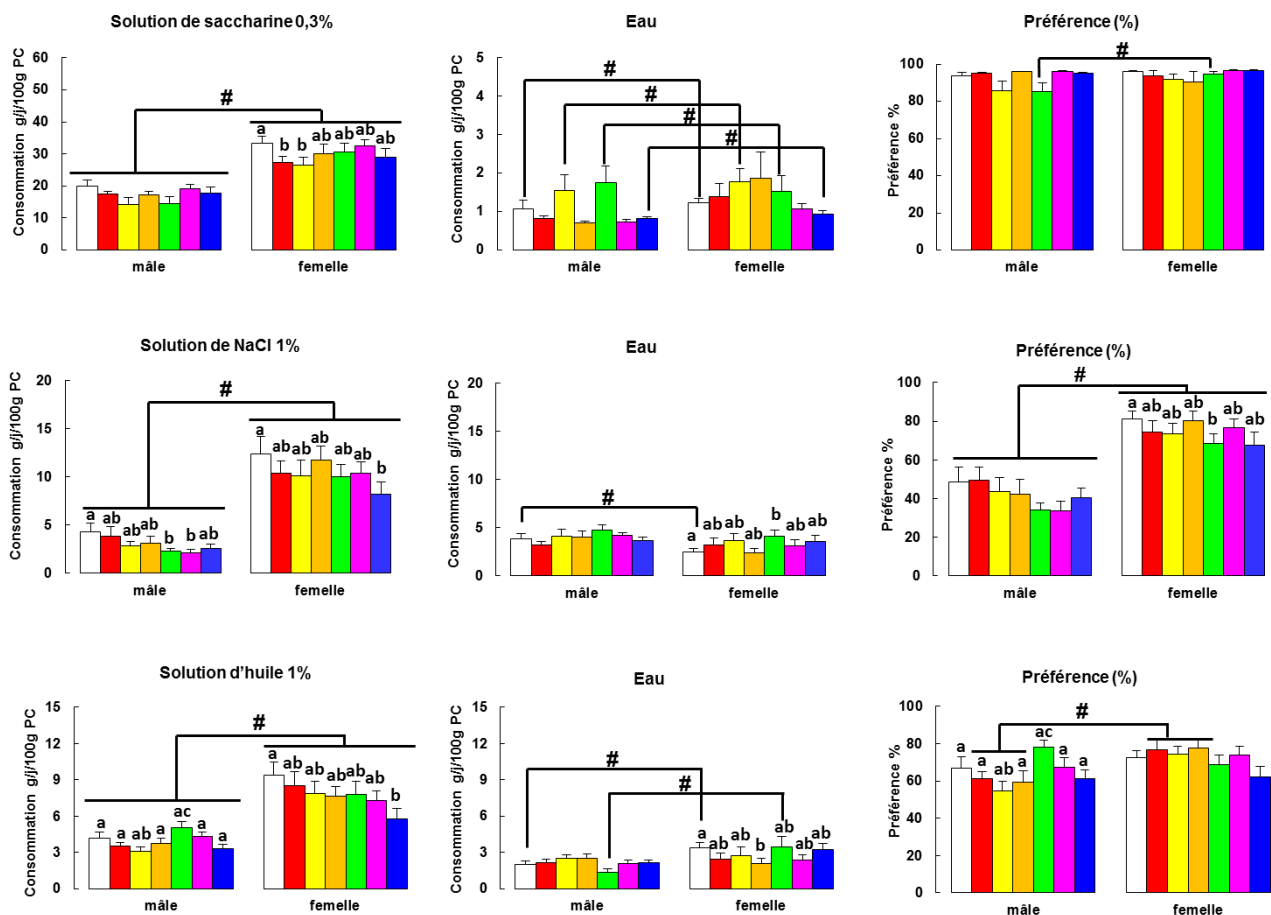


Figure 10 : Effets des perturbateurs endocriniens sur la consommation de saccharine (0,3%), NaCl (1%), d'huile (1%) et d'eau et la préférence chez les rats F2 non exposés à l'âge adulte dont les deux parents ont été exposés. Les résultats sont représentés par la moyenne \pm SEM ($n=12$ /sexe/groupe). * indique une différence significative par rapport au lot témoin du même genre. # indique un dimorphisme sexuel. a, b, c : des lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes (Anova mesures répétées, $p < 0,05$). □Contrôle, ■TGV, ■GVf, ■GB, ■VB, ■GVB, ■BPA.

2.3. Conclusion

Cette étude confirme le fait qu'il n'existe pratiquement pas de dimorphisme sexuel sur les préférences au stade immature. Avec l'âge, l'engouement des mâles pour les solutions (saccharine, NaCl et l'huile) diminue et un dimorphisme sexuel apparaît pour les trois saveurs étudiées : sucré, salé et gras. Lorsque les tests de préférence sont effectués chez les animaux immatures, les effets sont faibles et rares, cependant, on voit apparaître des dimorphismes, notamment pour la saveur salée. (J25, F1). A l'âge adulte, la consommation est souvent réduite, notamment chez les femelles, et le dimorphisme ne s'exprime pas dans tous les lots. Les effets sont surtout représentés dans les lots VB et GB.

En deuxième lieu notre étude montre l'existence des effets multi-générationnels qui sont majorés à la génération suivante lors des tests de préférences gustatives, et on constate un nombre plus important de dimorphismes sexuels significatifs dès le stade immature. A l'inverse, à l'âge adulte, le dimorphisme des préférences gustatives diffère de celui du lot témoin, en particulier pour le sucré et le gras. Ainsi, alors qu'il est absent chez les témoins, le dimorphisme pour le sucré apparaît dans le lot VB et celui pour le gras dans la plupart des lots. Enfin, il faut noter que le BPA exerce des effets plus prononcés lorsqu'il est administré seul qu'en mélange, et que le mélange ternaire est souvent le moins actif.

Ces tests de comportement apparaissent comme des méthodes non invasives pour identifier des marqueurs d'effets potentiels des perturbateurs endocriniens. Toutefois, les réponses obtenues nécessitent d'être juxtaposées à d'autres données de développement avant de conclure sur la possibilité de prédire de manière bien définie des effets strictement œstrogéniques ou anti-androgéniques. Notre étude illustre bien le fait que la nature des composants (œstrogénique ou anti-androgénique) est non prédictive des effets propres des mélanges, ce qui rend difficile et complexe la caractérisation des effets des mélanges.

3. Altération du développement

Les données sur l'exposition aux mélanges de perturbateurs endocriniens sur le développement sont peu nombreuses. Afin de pouvoir vérifier la possibilité de synergie, d'opposition ou d'addition des molécules qui constituent nos mélanges, nous avons suivi nos animaux sur deux générations.

3.1. Effets directs sur la génération exposée (F1)

3.1.1. Croissance et développement

Les effets des traitements avec le BPA sur le développement ont été évalués par le suivi de l'évolution de poids corporel des mères F0, ainsi que la prise de nourriture et d'eau. Ce suivi permet d'évaluer l'impact des traitements sur la mère et de suspecter des liens avec la croissance et le développement des petits. Dans nos conditions, comme le montre la figure 11, les traitements ne modifient pas de manière significative le poids corporel des animaux au cours de la gestation et de la lactation, le gain du poids moyen étant identique quel que soit le lot.

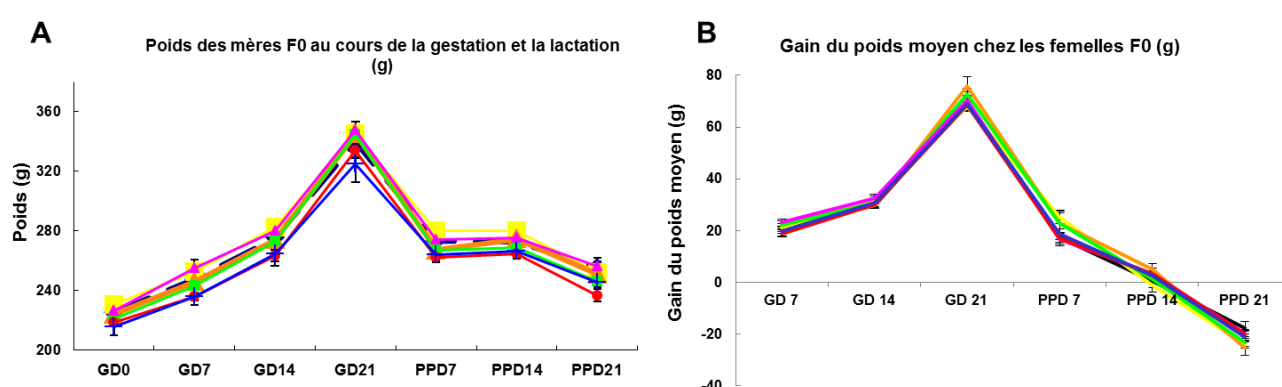


Figure 11 : Evolution de la prise de poids (A) et gain du poids moyen (B) au cours de la gestation et de la lactation des femelles F0. □Contrôle, ■TG V, ■GVf, ■GB, ■VB, ■GVB, ■BPA. Les résultats sont représentés par la moyenne \pm SEM.

Le suivi quotidien des mères (génération F0) permet d'évaluer les effets de nos traitements sur le développement et la croissance. La prise de nourriture et la prise de l'eau (exprimée en valeur cumulées) ne sont pas affectées par l'exposition durant la période de gestation et de lactation (Figure 12).

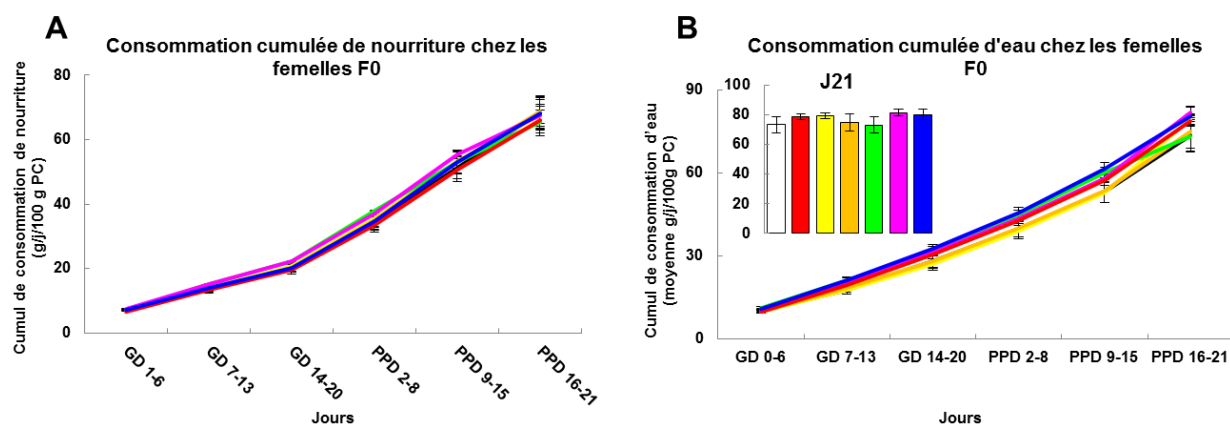


Figure 12 : Effets d'une exposition *in utero* aux perturbateurs endocriniens sur la consommation cumulée de nourriture (A) et de l'eau (B) durant la gestation et la lactation. Les résultats sont représentés par la moyenne \pm SEM □Contrôle, ■TG V, ■GVf, ■GB, ■VB, ■GVB, ■BPA.

Le tableau 1 montre les effets des perturbateurs endocriniens sur des paramètres de gestation et de lactation. La durée de gestation, le nombre de nouveaux nés par portée, le nombre d'implantation, la perte post implantatoire, le sex- ratio, ne semblent pas affectés par nos traitements. Ce qui suggère le peu d'effet des mélanges durant l'embryogénèse dans nos conditions expérimentales.

De même, aucun mélange ne semble affecter le poids corporel à la naissance. Chez les mâles, la perte de poids corporel au sevrage identifiée dans le lot BPA par rapport au lot témoin ($p < 0,05$) ainsi que par rapport au mélange GVf ($p < 0,05$) n'est pas retrouvée dans les autres lots, y compris ceux qui contenaient du BPA (Tableau 1). Aucun effet n'a été enregistré chez les femelles.

Chez les mâles l'index de la distance ano-génitale diminue dans tous les lots mais les résultats sont significatifs uniquement chez les mâles des lots GVf, GVB, BPA ($p < 0,05$). Chez les femelles, la distance ano-génitale enregistrée dans le lot GVf ($p < 0,05$), est également différente de celles enregistrées dans les autres lots (GB, VB, TGV, BPA) et par rapport au lot témoin. Ces effets indiquent une perturbation de type androgénique durant le développement utérin (Tableau 1).

La date d'apparition de la puberté, utilisée comme un marqueur d'effet de type œstrogénique n'est pas affectée dans nos conditions expérimentales, mais on note quand même un léger retard chez les femelles exposées au mélange VB ($30,5 \pm 0,7$). Le même traitement semble avoir le même effet chez les mâles où la séparation du prépuce semble arriver en retard par rapport au lot témoin (T vs VB : $44,1 \pm 0,7 / 42,9 \pm 0,3$ respectivement). La durée du cycle œstrien, qui est de 96h chez le rat, n'est pas affectée par nos traitements, cependant dans tous les lots à l'exception du TGV une femelle voire deux pour le lot BPA présente un cycle irrégulier d'une durée supérieure à 5 jours (Tableau 1).

Tableau 1 : Effets des traitements sur les paramètres de gestation et de développement de la F1

	Témoin	TGV	GVf	GB	VB	GVB	BPA
Nombre de portées	16	15	16	16	17	17	15
Durée de la gestation (jours)	22,0±0,1	21,9±0,1	22,0±0,1	22,0±0,1	21,9±0,1	21,9±0,1	22,1±0,1
Nombre de nouveau nés/portée	12,4±0,7	11,6±0,4	12,4±0,7	12,4±0,9	13,0±0,5	12,0±0,6	11,6±0,9
Nombre d'implantation	13,4±0,5	12,6±0,5	13,4±0,6	13,7±1,0	14,4±0,4	12,4±0,6	12,7±0,6
Perte post implantatoire + cannibalisme (%)	8,3±2,7	5,2±2,5	8,0±2,3	8,0±2,4	9,4±3,1	6,8±2,1	10,3±4,4
Malformation	0	0,57	1,01	1,50	0,90	0	4,02
Sexe ratio (% mâles)	46,2	53,1	52,3	50	51,6	44,9	47,7
Poids corporel à la naissance (g)							
Mâles	5,9±0,1	5,8±0,1	5,7±0,1	5,9±0,1	5,8±0,1	5,7±0,1	5,8±0,1
Femelles	5,5±0,1	5,5±0,1	5,4±0,1	5,6±0,1	5,3±0,1	5,5±0,1	5,5±0,1
Poids corporel au sevrage (g)							
Mâles	46,3±0,7 a	44,6±0,9 ab	46,9±0,7 a	45,3±1,0 ab	45,8±0,6 ab	46,0±1,1 ab	44,3±0,7 b
Femelles	45,2±0,7	44,1±0,9	46,0±1,0	45,3±1,0	44,7±0,6	45,0±1,1	43,7±0,6
DAG (mm)							
Mâles au sevrage	16,89±0,29 a	16,26±0,22 a	16,46±0,17 a	16,33±0,19 a	16,55±0,15 a	16,38±0,23 a	16,09±0,15 b
Femelles au sevrage	11,38±0,15 a	11,30±0,20 a	11,83±0,13 b	11,31±0,12 a	11,18±0,13 a	11,67±0,13 ab	11,27±0,16 a
DAG/poids corporel ^{1/3}							
Mâles au sevrage	4,69±0,08 a	4,57±0,05 ab	4,55±0,04 b	4,57±0,06 ab	4,62±0,05 ab	4,56±0,05 b	4,55±0,05 b
Femelles au sevrage	3,20±0,03 a	3,20±0,04 a	3,30±0,04 b	3,18±0,03 ac	3,16±0,03 ac	3,29±0,04 ab	3,19±0,04 a
Séparation du prépuce (jours)	44,1±0,7	44,1±0,4	43,0±0,6	43,8±0,2	42,9±0,3	43,2±0,4	43,4±0,4
Ouverture vaginale (jours)	32,7±0,8	32,8±1,0	31,3±0,6	32,6±0,7	30,5±0,7	31,8±0,8	31,7±0,6
Cycles œstrien (jours)	4,03±0,06	4,00±0,00	4,15±0,11	4,12±0,11	4,09±0,09	4,00±0,04	3,90±0,12
Nombre de femelles avec cycle irrégulier (>5jours)	0	0	1	1	1	1	2

Les résultats sont représentés par la moyenne ± SEM, a, b : des lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$)

3.1.2. Développement post-natal et malformations

Dans nos conditions expérimentales, nos traitements n'ont pas affecté le poids corporel des mâles et des femelles F1 (Figure 13), ni la prise de nourriture (Figure 13). Concernant la consommation de l'eau, elle est diminuée avec l'âge dans les lots traités, ce qui confirme les observations faites lors des tests gustatifs à l'âge adulte. Cette diminution est significative dans les lots exposés aux mélanges binaires : TGV et VB chez les femelles. Chez les mâles le mélange TGV a le même effet cependant les résultats ne sont pas significatifs (Figure 13). Les consommations des témoins sont systématiquement supérieures à celles de tous les lots.

Au cours du suivi quotidien des animaux, nous avons détecté plusieurs types de malformations qui sont apparues après le sevrage et qui persistent jusqu'à l'âge adulte. Ces malformations varient en fonction du traitement, puisqu'elles sont surtout rencontrées dans les lots exposés au (BPA). D'autres anomalies sont observées lors des sacrifices des rats surtout au niveau de l'appareil de reproduction.

Dans cette première génération des malformations semblables à celle observés avec l'exposition au BPA (*chapitre précédent*) au niveau de l'appareil oculaire, mais aussi au niveau des queues et des dents, apparaissent et persistent jusqu'à l'âge adulte, cependant le BPA semble le plus actif (4,02% de malformations).

Chez les animaux qui présentent des malformations au niveau oculaire, on a mesuré la pression intraoculaire (à l'aide d'un tonomètre), et elle est plus élevée chez les rats traités que chez les rats du groupe contrôle (données non montrées).

A noter également que le pourcentage des malformations présenté sur le tableau inclus les malformations au niveau oculaire, au niveau des queues et au niveau des dents tordues, ce qui exclue les autres malformations [taches blanches au niveau des dents (Figure 14 C1 C2), et les anomalies enregistrées au sacrifice (Figure 14 D1-2-3)].

Dans le cas des dents tordues (Figure 14 C3), nous avons été obligés de les couper à chaque fois pour que les rats puissent manger. Un amaigrissement des rats nous oblige à enlever le rat de la manip des préférences gustatives.

Aussi ces malformations sont plus présentes chez les femelles que les mâles (2 fois plus chez les femelles). Les malformations de la dent (dents tordues) sont présentes dans les lots VB et BPA tandis

que les malformations osseuses (les queues) sont présentes dans les lots GVf, GB, TGV, BPA, alors que les malformations au niveau oculaire sont plutôt rencontrées dans les lots VB et BPA.

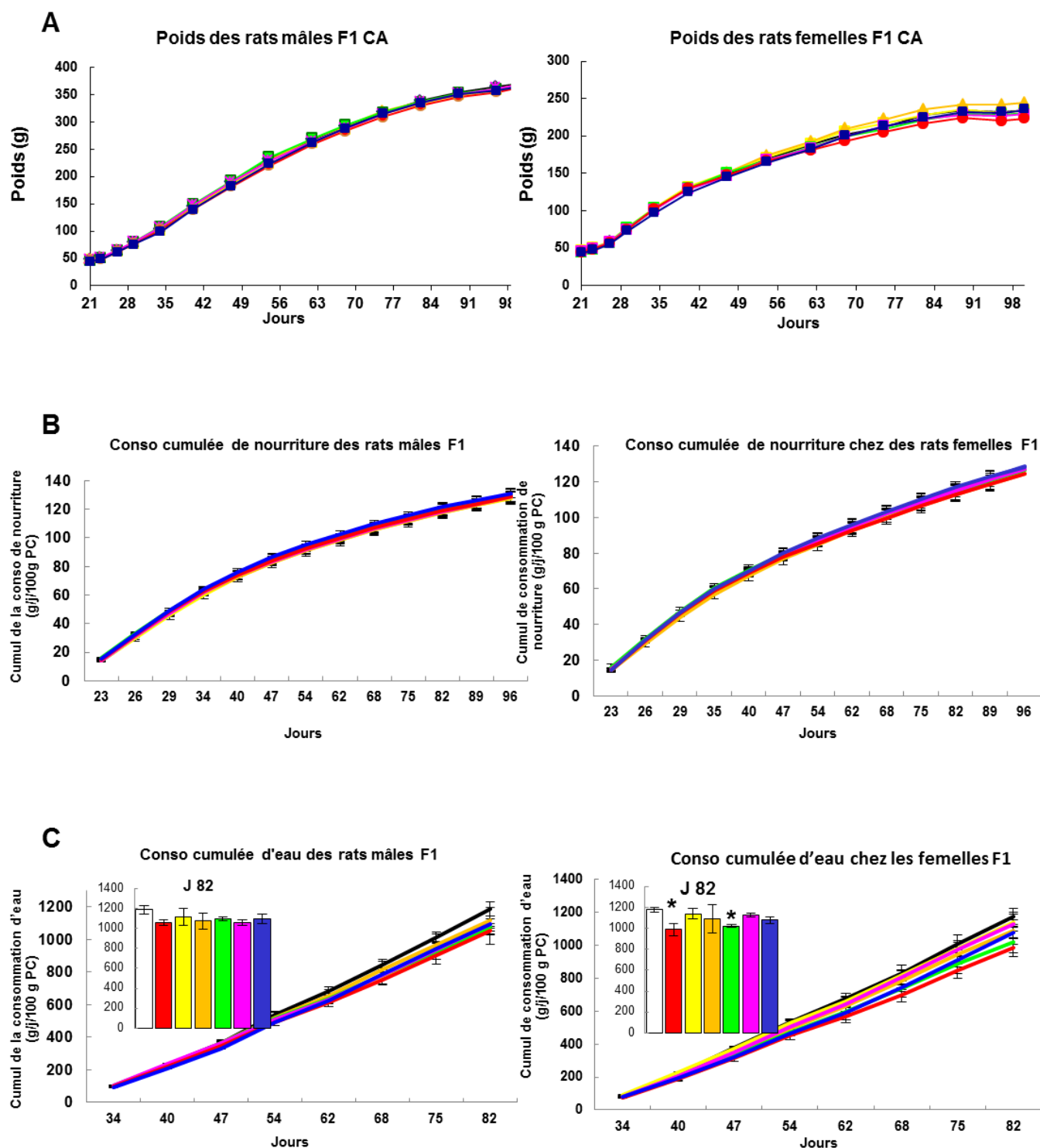


Figure 13 : Effets d'une exposition continue (de la conception à l'âge adulte) aux perturbateurs endocriniens sur : l'évolution du poids corporel (A), la consommation cumulée de nourriture (B), la consommation cumulée d'eau (C) chez les rats mâles et femelles de la F1. Les résultats sont représentés par la moyenne \pm SEM. * représente une différence significative par rapport au lot témoin (Anova un facteur, suivie d'un Dunnett, $p < 0,05$). □ Contrôle, ■ TGV, ■ GVf, ■ GB, ■ VB, ■ GVB, ■ BPA.

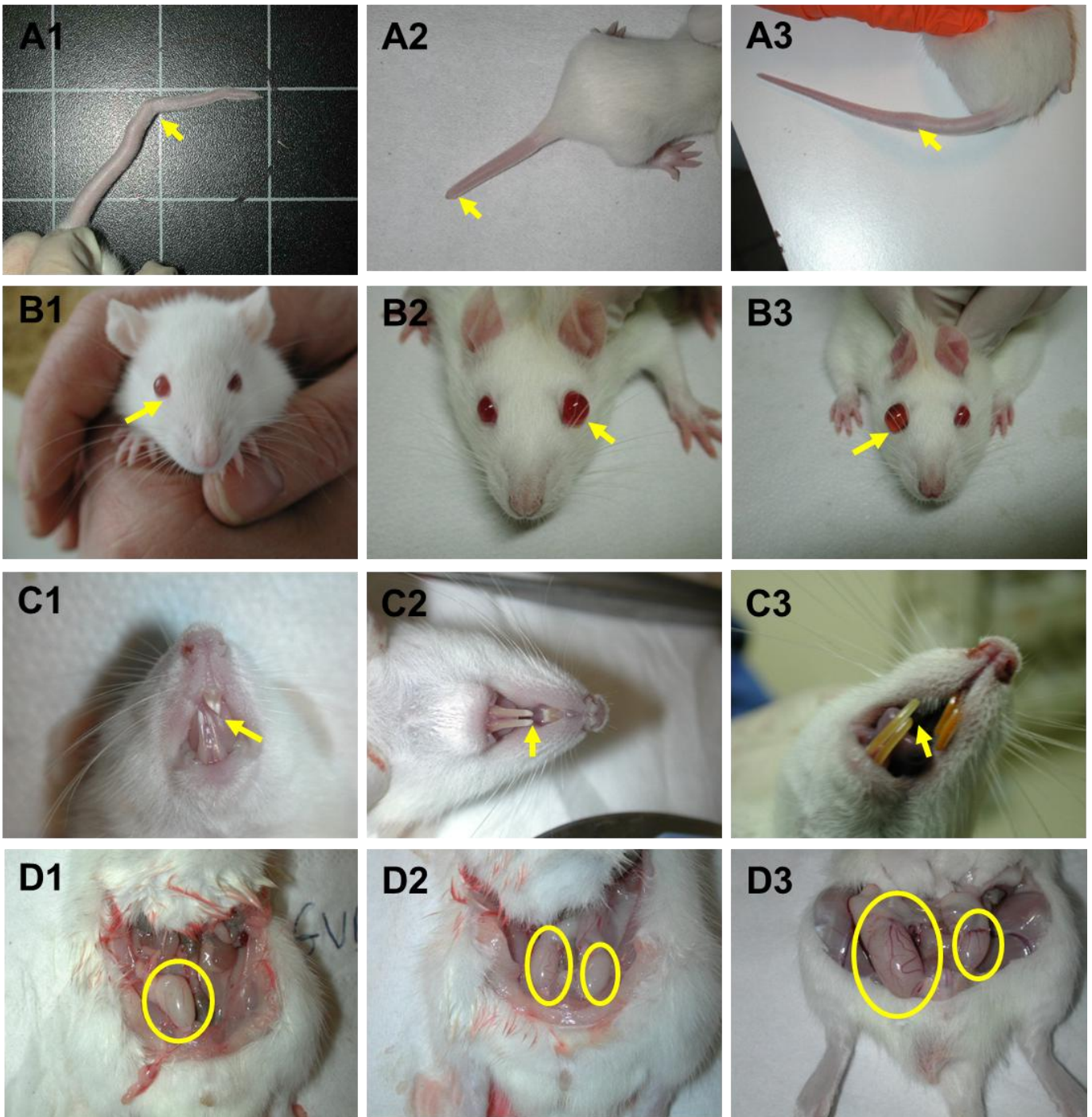


Figure 14 : photos des malformations : au niveau de la dent (A), au niveau de la queue (B), au niveau du globe oculaire (C), au niveau de l'appareil génital (ici testicule) (D) chez les animaux de la F1

3.1.3. Perturbations métaboliques (dosages sériques)

- Test de tolérance au glucose :

Afin de vérifier si nos traitements peuvent provoquer des troubles métaboliques, nous avons réalisé un test de tolérance au glucose à l'âge du sacrifice adulte. Ce test a été réalisé uniquement chez les mâles adultes surnuméraires (5 rats/lot).

Le test de tolérance au glucose consiste à provoquer une hyperglycémie par une injection péritonéale de glucose, puis à mesurer la glycémie après 30 min, 60 min et deux heures. Comme le montre la figure 15, deux lots se dégagent des autres lots, le VB et le TGV mais seulement le VB présente une différence significative de glycémie par rapport au lot témoin ($p < 0,05$), et les rats ont du mal à rétablir leur glycémie (Figure 15), cela signifie un dysfonctionnement dans la sécrétion d'insuline en réponse au glucose par les cellules β pancréatiques, ou un défaut d'action de l'insuline dans le foie et les organes périphériques.

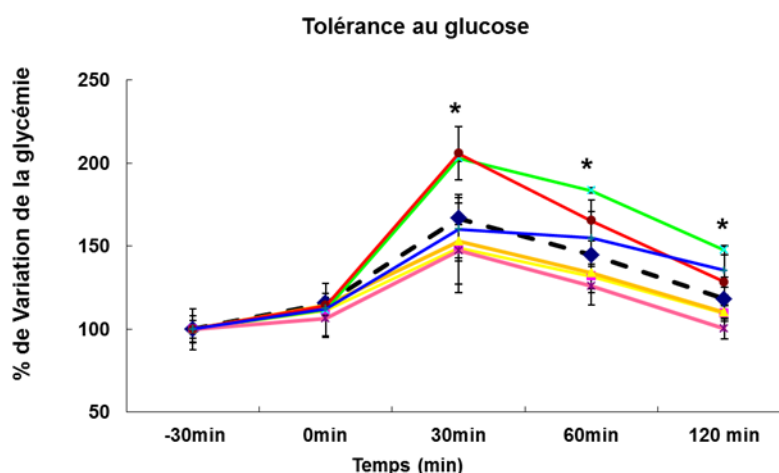


Figure 15 : Effets d'une exposition continue à des mélanges de perturbateurs endocriniens sur la tolérance au glucose à l'âge adulte. Les résultats sont représentés par la moyenne \pm SEM (n = 5 rats/groupe). * représente une différence significative entre les moyennes par rapport au groupe témoin avec $p < 0,05$ (Anova suivie d'un Dunnett; $p < 0,05$). * pour le lot VB. □ Contrôle, ■ TGV, ■ GVf, ■ GB, ■ VB, ■ GVB, ■ BPA.

- bilan lipidique chez les rats F1 :

Un bilan lipidique est réalisé sur les rats de la première génération. Il consiste au dosage sérique du cholestérol, CHO-HDL (high-density lipoprotein), CHO-LDL (low-density lipoprotein), Glu PAP

qui sont mesurés dont le but de mettre en évidence une possible perturbation métabolique générale par nos traitements.

Chez les mâles, les concentrations du cholestérol ainsi que l'CHO-HDL ne sont pas affectées par nos traitements, cependant les concentrations de CHO-LDL ont tendance à baisser dans tous les lots à l'exception du lot GVf (Figure 16). L'analyse des différences inter groupes montre que le mélange GVf a un effet amplificateur par rapport aux différents lots, et ce résultat est significatif par rapport au lot VB ($p < 0,05$).

La concentration des TG circulants est affectée dans le lot VB, où une baisse significative est enregistrée ($p < 0,05$), les autres traitements n'ont pas modifié les concentrations sériques des TG. Enfin aucun traitement ne semble avoir d'effets sur la concentration sérique du glucose (Figure 16).

Chez les femelles, comme chez les mâles les concentrations sériques en cholestérol, CHO-HDL et TG ne sont pas affectées par l'exposition continue à nos traitements. Tout comme chez les mâles, les concentrations sériques en CHO-LDL ont tendance à baisser dans les lots TGV et GVB mais l'analyse statistique n'est pas significative (Figure 16).

Une hypoglycémie est enregistrée chez les femelles exposées au TGV ($p < 0,05$), cependant nos autres traitements ne semblent pas avoir d'effet sur la concentration sérique en glucose. L'analyse des différences inter groupes montre aussi une différence significative entre les lots traités au mélange TGV et celui traité par le mélange GVf ($p < 0,05$), mais aussi avec le mélange ternaire GVB (Figure 16).

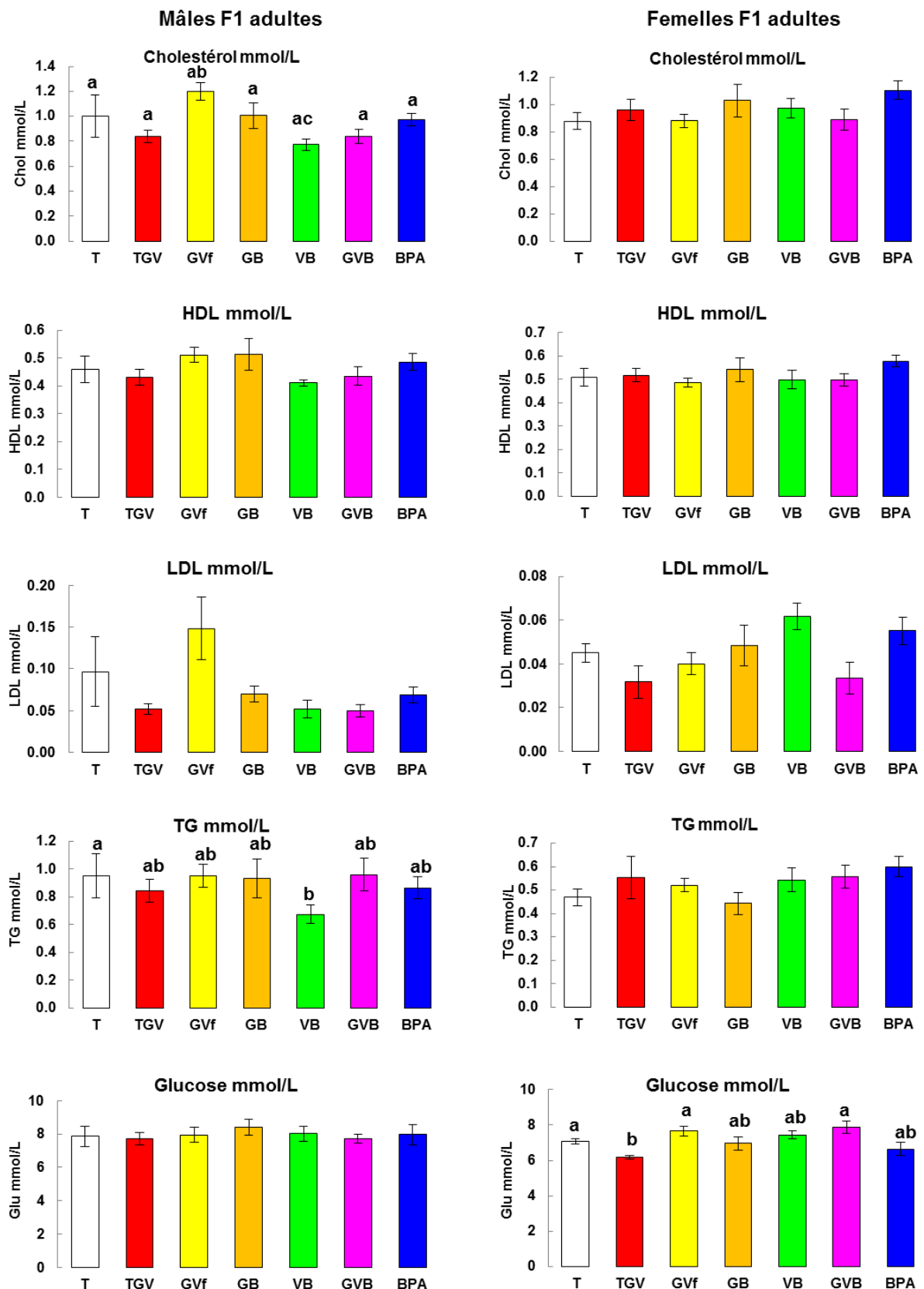


Figure 16 : Effets d'une exposition continue à des mélanges de perturbateurs endocriniens sur le bilan métabolique chez les mâles et femelles à l'âge adulte. Les résultats sont représentés par la moyenne \pm SEM (n = 6 rats/groupe). a, b, c : des lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes (Anova suivi d'un Newman-keuls, $p < 0,05$).

3.2. Répercussions sur la progéniture non exposée (F2)

Puisque il est admis que les perturbateurs endocriniens ont des effets multi-générationnels, les mêmes end-points du développement sont explorés dans cette seconde génération non exposée.

3.2.1. Croissance et développement

Chez les mères (génération F1), comme dans la première génération, on n'a pas enregistré de différence de poids corporel durant la période de gestation et la lactation, le gain moyen quotidien étant constant quel que soit le lot (Figure 17). La prise de nourriture exprimée en valeurs cumulées n'est pas affectée par une exposition continue des deux parents (Figure 18). Cependant l'analyse statistique de la consommation cumulée d'eau montrent que les femelles exposées au mélange binaire GB boivent moins d'eau que les mères du lot témoin, et cette différence est significative ($p < 0,05$, Anova mesures répétées) (Figure 18). L'analyse statistique des différences de consommation d'eau cumulée à J21 avec une Anova a un facteur montre qu'en plus du lot GB, le lot TGV aussi entraîne une baisse significative dans la consommation cumulée d'eau ($p < 0,05$) (Figure 18. *diagramme*).

Le tableau 2, montre les effets de nos traitements sur des paramètres de développement. Tout comme en F1, aucun effet n'a été observé sur la durée de la gestation et sur la taille des portées (nombre et poids). Dans le même sens aucun effet de nos traitements sur le nombre de nouveau nés par portée, le nombre d'implantation, et les pertes post implantatoire ainsi que le cannibalisme.

Le poids corporel à la naissance n'est pas affecté par nos traitements, et contrairement à la F1 la différence de poids au sevrage chez les rats exposés au BPA est disparue. Par contre le sex-ratio semble être affecté par nos traitements : on note une tendance à l'augmentation pour les lots GVB et une diminution dans les lots TGV et BPA. Tout comme la distance ano-génitale où une tendance de baisse est enregistrée dans tous les lots, mais les résultats sont significatives uniquement chez les mâles du lot BPA ($p < 0,05$), ce qui signifie que la perturbation de type androgénique observée dans la première génération persiste encore. Chez les femelles l'apparition de la puberté est dans les alentours de 43 jours, et chez les mâles elle est de 31 jours, et comme montre le tableau 2, aucun effet n'a été enregistré chez les deux sexes (Tableau 2). Ces résultats suggèrent le peu d'effet des mélanges durant le développement utérin dans notre modèle expérimentale.

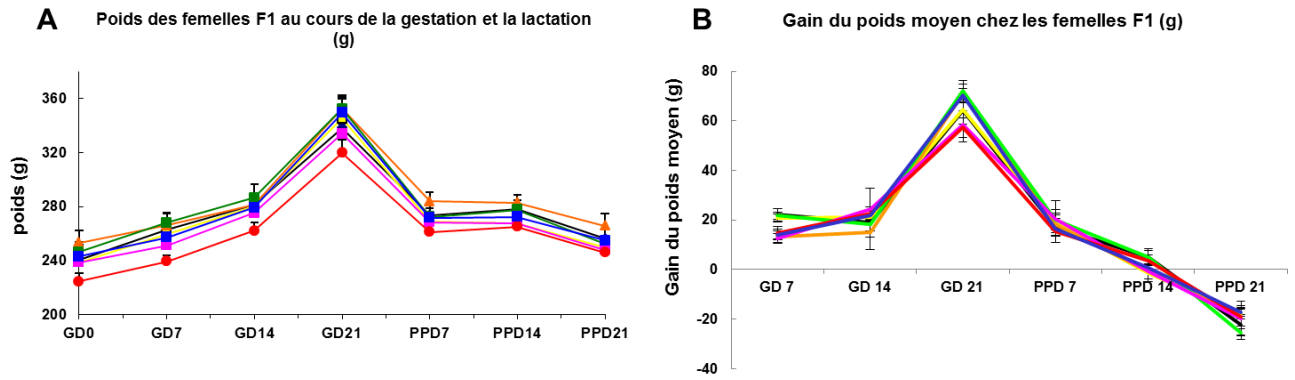


Figure 17 : Evolution de la prise de poids (A) et gain du poids moyen (B) au cours de la gestation et de la lactation des femelles F1. □Contrôle, ■TG V, ■GVf, ■GB, ■VB, ■GVB, ■BPA. Les résultats sont représentés par la moyenne \pm SEM.

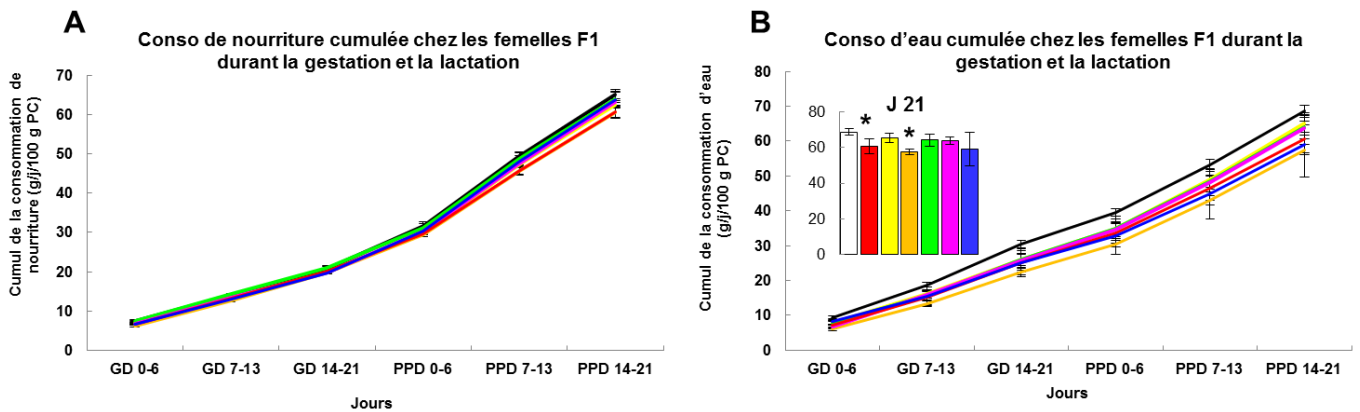


Figure 18 : Effets des perturbateurs endocriniens sur la consommation de nourriture (A) et d'eau (B) durant la gestation et la lactation chez les rats F1 après une exposition continue (de la conception à l'âge adulte). Les résultats sont représentés par la moyenne \pm SEM. * indique une différence significative par rapport au lot témoin Anova mesures répétées, bonferroni en post-hoc ($p < 0,05$) (Pour le lot GB). Sur le diagramme, * représente une différence significative par rapport au lot témoin (Anova un facteur, suivi d'un Dunnett en post-hoc avec $p < 0,05$) □Contrôle, ■TG V, ■GVf, ■GB, ■VB, ■GVB, ■BPA.

Tableau 2 : Effets des traitements sur les paramètres de gestation et de développement de la F2

	Témoin	TGV	GVf	GB	VB	GVB	BPA
Nombre de portées	7	7	8	7	8	8	8
Durée de la gestation	22,30±0,2	22,50±0,29	22,06±0,06	22,57±0,13	22,06±0,06	22,31±0,09	22,3±0,1
Nombre de nouveau nés/portée	11,9±1,4	9,71±1,80	12,75±0,75	11,28±1,60	12,13±1,32	11,25±1,03	12,4±1,1
Nombre d'implantation	12,9±1,4	11,86±1,41	14,75±0,80	13,43±1,63	14,00±0,68	13,13±1,37	15,1±0,8
Perte post implantatoire + cannibalisme (%)	8,7±3,0	22,00±7,60	13,09±3,87	19,03±6,53	14,53±8,73	11,96±5,29	12,9±3,7
Malformation	0	4.41	0.98	2.53	1.03	2.22	4.04
Sexe ratio (% mâles)	48,2	42,64	48,07	53,75	52,04	52,74	39,4
Poids corporel à la naissance							
Mâles	5,6±0,20	6,05±0,11	5,61±0,21	6,02±0,22	5,60±0,14	5,69±0,11	5,8±0,2
Femelles	5,5±0,20	5,51±0,15	5,47±0,19	5,61±0,12	5,46±0,14	5,55±0,13	5,5±0,2
Poids corporel au sevrage							
Mâles	41,9±1,0	43,00±0,87	41,30±1,09	43,78±1,35	41,78±1,00	41,56±0,72	41,4±1,4
Femelles	40,8±1,2	41,59±0,82	40,51±0,95	42,29±1,32	41,47±0,97	40,90±1,05	40,5±1,3
DAG (mm)							
Mâles au sevrage	17,52±0,33	17,14±0,24	17,16±0,27	17,36±0,29	16,95±0,26	17,34±0,25	16,77±0,28
Femelles au sevrage	11,56±0,17	11,74±0,18	12,75±0,75	11,66±0,24	11,48±0,19	11,81±0,15	11,37±0,30
DAG/poids corporel ^{1/3}							
Mâles au sevrage	5,06±0,06	4,90±0,08	4,95±0,05	4,94±0,07	4,89±0,09	5,01±0,05	4,86±0,04**
Femelles au sevrage	3,47±0,04	3,37±0,04	3,37±0,05	3,35±0,06	3,31±0,04	3,42±0,06	3,33±0,07
Séparation du prépuce	43,8±0,4	44,25±0,38	43,25±0,54	44,42±0,70	44,08±0,57	44,25±0,38	43,50±0,4
Ouverture vaginale	31,8±0,9	31,75±0,76	31,33±0,49	33,43±0,90	32,00±1,00	31,93±0,99	32,50±0,9

Les résultats sont représentés par la moyenne ± SEM, * représente une différence significative par rapport au groupe témoin avec p<0,05 (Test de Mann whitney)

3.2.2. Développement post-natal et malformations

Dans nos conditions expérimentales, nos traitements ont un effet sur le poids corporel chez les deux sexes. Une tendance à augmenter le poids corporel est présente dans les lots mais les résultats sont significatifs uniquement chez les rats dont les deux parents étaient exposés au BPA et au GVB pour les femelles et seulement au BPA pour les mâles (Figure 19.A).

Curieusement cette augmentation de poids corporel n'est pas corrélée avec une augmentation de prise alimentaire (Figure 19.B). Concernant la prise d'eau, chez les mâles, tous les mélanges entraînent une baisse, par contre l'analyse statistique n'est pas significative. Chez les femelles on retrouve le même profil d'action des molécules, où tous les mélanges à l'exception du GVB entraînent une baisse, mais qui n'est pas significatives là aussi.

Chez les rats de la deuxième génération, les malformations sont également observées après le sevrage, et persistent jusqu'à l'âge adulte. Tout comme en F1, elles sont plus fréquentes chez les femelles, et dans les lots BPA (4,04%), mais aussi dans le lot dont les deux parents ont été exposés au mélange binaire TGV (4,41%). Elles touchent également les globes oculaires, les queues, les dents. D'autres malformations observées au moment du sacrifice portent sur l'appareil génital mâle ou femelle, mais ces malformations ne sont pas incluses dans le calcul du pourcentage présenté sur le tableau 3 (Figure 14). A noter également qu'on ne retrouve plus les dents avec les taches blanches dents (déméralisées), mais uniquement les dents tordues (Figure 20). Chez les rats qui présentent cette anomalie, nous étions obligés de leur couper les dents afin qu'ils puissent manger dans le but d'éviter l'amaigrissement de ces rats.

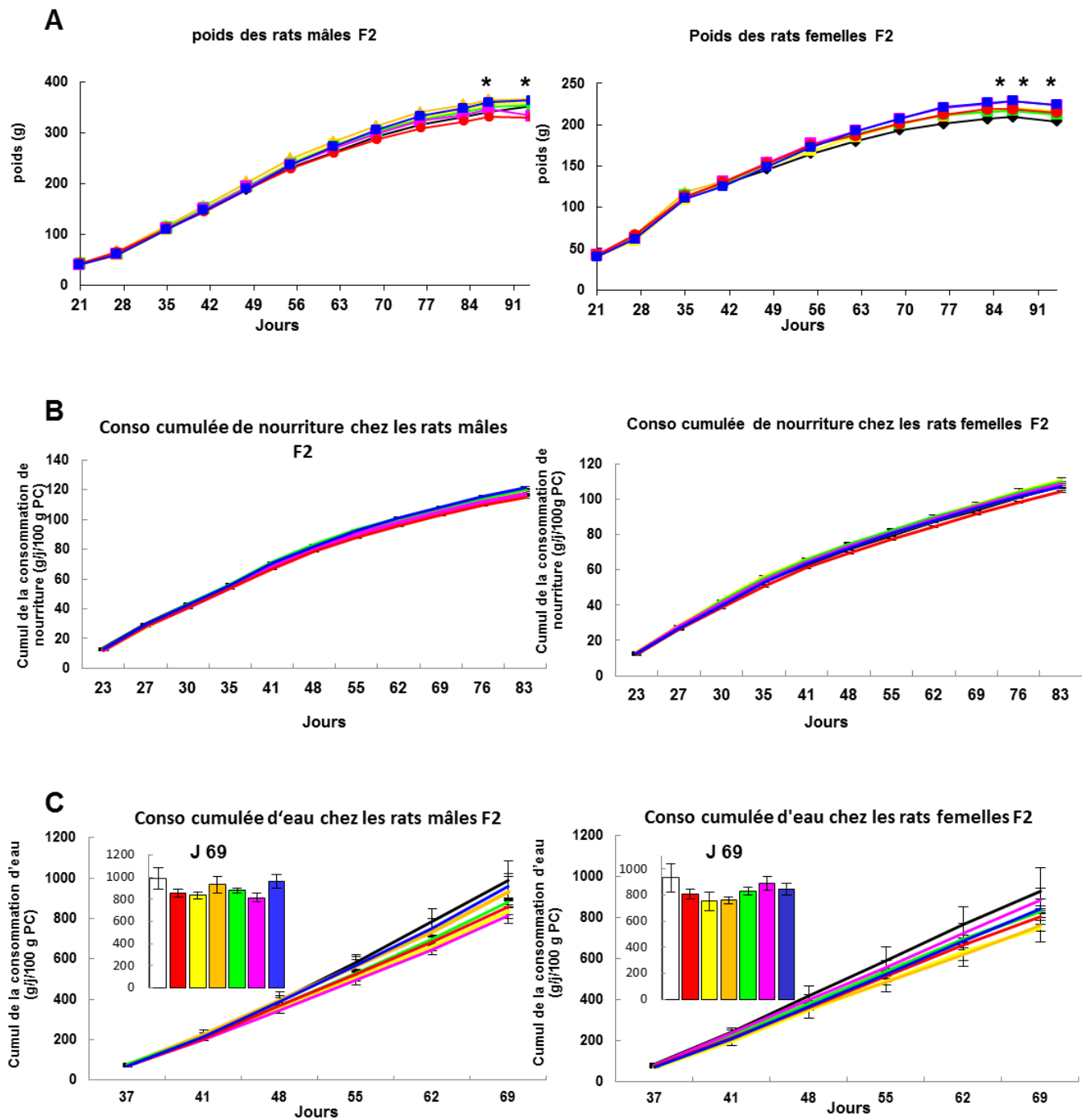


Figure 19 : Evolution de poids corporel (A), la consommation cumulée de nourriture (B), la consommation cumulée d'eau (C) chez les rats mâles et femelles de la F2 dont les deux parents ont été exposés aux perturbateurs endocriniens. Les résultats sont représentés par la moyenne \pm SEM. * représente une différence significative par rapport au lot témoin (Anova mesures répétées, $p < 0,05$). □ Contrôle, ■ TGV, ■ GVf, ■ GB, ■ VB, ■ GVB, ■ BPA.



Figure 20 : Photo de malformation au niveau des dents (F2)

3.2.3. Perturbations métaboliques (dosages sériques)

Le même bilan métabolique réalisé chez les rats de la première génération est effectué chez les rats de la F2. La leptine est également dosée en plus des autres dosages (cholestérol, CHO-HDL (high-density lipoprotein), CHO-LDL (low-density lipoprotein), Glu PAP), afin de voir s'il y a un lien avec le poids corporel car les rats dans cette deuxième génération présentent une augmentation du poids corporel.

Comme dans la F1, nos traitements n'affectent pas les concentrations sériques du cholestérol, des CHO-HDL, ni celle des TG chez les mâles F2. Cependant une baisse de la concentration sérique des CHO-LDL est enregistrée dans les lots TGV et VB ($p < 0,05$). Les concentrations sériques en glucose semblent légèrement augmenter dans les lots TGV et VB mais les résultats ne sont pas significatifs, ainsi que pour la leptine, pour qui aucun effet significatif n'est détecté à l'exception d'une légère augmentation chez les rats du lot BPA (Figure 21). Dans le même sens aucune différence inter groupe n'a été enregistrée.

Chez les femelles, les mélanges semblent avoir plus d'effet que le BPA seul ou que le mélange GV faible dose ; les concentrations sériques en cholestérol diminuent dans trois lots de traitements TGV ($p < 0,05$), VB et GVB ($p < 0,06$) (Figure 21). Cette baisse concorde avec une baisse significative de l'CHO-HDL chez ces mêmes femelles TGV et GVB ($p < 0,05$), VB ($p < 0,06$) (Figure 21).

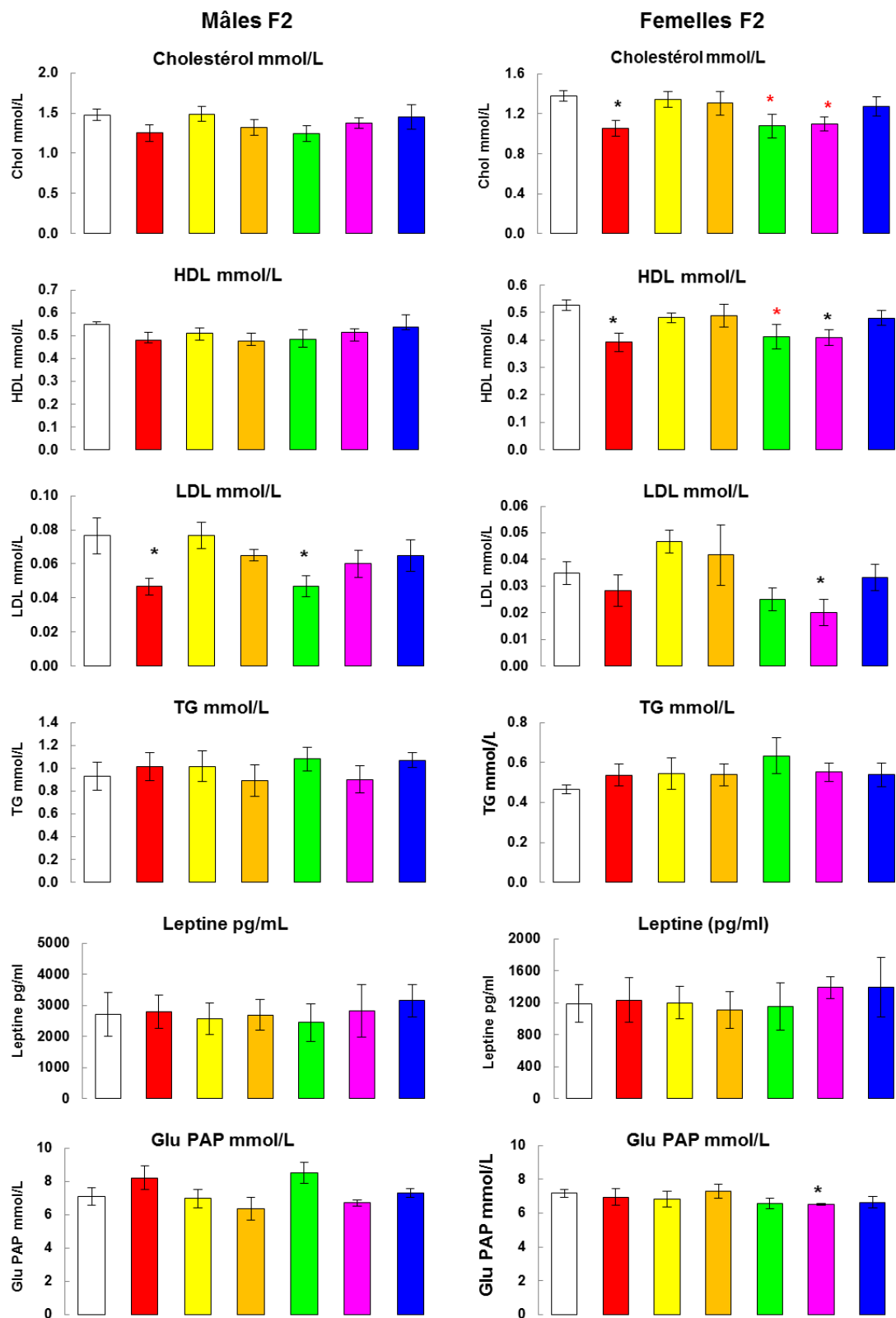


Figure 21 : Bilan métabolique chez les rats mâles et femelles à l'âge adulte de la F2 dont les deux parents ont été exposés aux perturbateurs endocriniens seules ou en mélanges. Les résultats sont représentés par la moyenne \pm SEM (n = 6 rats/groupe). * représente une différence significative entre les moyennes par rapport au groupe témoin avec $p < 0,05$ (Anova suivie d'un Dunnett). * représente une différence significative entre les moyennes par rapport au groupe témoin avec $p < 0,06$ (Anova suivie d'un Dunnett). □ Contrôle, ■ TGV, ■ GVf, ■ GB, ■ VB, ■ GVB, ■ BPA.

Les concentrations des TG circulants sont légèrement augmentées, en particulier dans le lot VB, mais les effets ne sont pas significatifs (Figure 21). De même chez les mâles, nos traitements entraînent une baisse des concentrations sériques en CHO-LDL à l'exception du lot GVf et GB, mais ces effets sont significatifs uniquement chez les rats recevant du mélange ternaire GVB ($p < 0,05$). Le mélange ternaire est le plus réactif car il entraîne aussi une hypoglycémie chez ces mêmes femelles ($p < 0,05$) (Figure 21). Enfin une légère tendance à augmenter les concentrations sériques de la leptine est enregistrée chez les femelles du lot BPA et GVB, mais les résultats ne sont pas significatifs (Figure 21). Cependant aucune différence inter groupe n'a été enregistrée.

Dans cette étude, les traitements affectent plus légèrement le développement dans les lots traités par les mélanges que dans les lots recevant le BPA seul. Cette remarque est vraie pour les animaux issus de la génération F1 comme de la F2 (génération non exposée). De plus, les dosages sériques montrent que les traitements perturbent également l'homéostasie énergétique. Ces effets sont multi-générationnels car ils apparaissent également dans la génération non-exposée (F2). En conclusion, les effets enregistrés varient en fonction du sexe puisque les femelles apparaissent plus sensibles que les mâles, mais également en fonction du traitement : par exemple, le mélange ternaire GVB et le BPA ont plus d'effet notamment sur le développement du poids corporel chez les rats de la F2.

4. Conclusion générale et discussion

En conclusion, une exposition à des mélanges de perturbateurs endocriniens, peut provoquer des altérations sur : i) le comportement maternel et les préférences gustatives, ii) le développement (apparition des malformations), iii) l'homéostasie énergétique, et iv) la descendance non exposée (effets multi-générationnels). Cependant ces effets varient selon le sexe (mâle ou femelle), le stade (immature ou adulte), et le moment de l'exposition (in utero, continue ou via les parents), à l'image de ce qui est décrit pour les molécules seules.

D'une manière globale, les effets observés ne relèvent pas d'effet dominant de type œstrogénique ou anti-androgénique propre à une des molécules du mélange, ni des effets interactifs prévisibles au regard des propriétés hormonales singulières à chaque molécule. Au contraire, cette étude intégrative souligne le potentiel multi-site et multi-organe des mélanges.

Ce type d'étude a précédemment été développé dans le but d'évaluer les effets multi-générationnel en fonction de la période d'exposition (néonatale, adulte ou continue) à des faibles

doses de génisteine et de vinclozoline seules ou en mélanges. Il a permis de montrer les effets majorés du mélange sur le développement et sur le comportement, en l'occurrence le comportement alimentaire (prise et préférences), et des effets repro-toxiques chez les deux sexes. Ces effets sont surtout marqués lorsque les expositions incluent la période foétale, ce qui concorde avec les données de la littérature lors des expositions précoce et à des doses plus fortes ([Vom Saal et al 2012](#)). Il n'est pas exclu que la mise en place de ces effets multiples puisse reposer sur des processus de régulation complexes et/ou communs, intégrant plusieurs voies de signalisations susceptibles d'intervenir séquentiellement ou simultanément, mais dont le dimorphisme sexuel met en avant le rôle sous-jacent des œstrogènes et des androgènes.

Concernant le comportement maternel, les mélanges semblent avoir plus d'effet que le BPA seul, ces effets peuvent provenir d'une action des perturbateurs endocriniens au niveau central, en particulier sur l'hypothalamus, une aire cérébrale très importante dans la régulation du comportement maternel ([Sheehan & Numan 2002](#)). Mann and Babb, montrent que l'administration de l'acide N-methyl-D- aspartic (agoniste du glutamate) au niveau hypothalamique provoque des lésions neuronales et inhibe le comportement maternel ([Mann & Babb 2004](#)). D'autres neurotransmetteurs peuvent être ciblés par nos traitements, et ceci à plusieurs niveaux : synthèse, transport, action ou élimination. Parmi ces neurotransmetteurs, on trouve l'ocytocine, la vasopressine et la dopamine, qui sont eux aussi impliqués dans la régulation du comportement maternel ([Mann & Babb 2004](#)) ([Bosch & Neumann 2012](#)).

Dans les deux générations (F0 et F1), et même en connaissant la nature ainsi que les propriétés hormonales de nos molécules, il est difficile de décrypter les étapes et les mécanismes de cette perturbation, comme il est tout aussi difficile de déterminer le groupe parmi les 5 mélanges qui a le plus d'effet par rapport aux autres. Par contre, dans les deux générations, l'activité de « construction du nid » est diminuée dans tous les lots : cela signifie une hypoactivité des mères, ce qui est en accord avec l'étude de Flynn, lors d'une exposition à la vinclozoline ([Flynn et al 2001](#)).

Chez les mères de la F1 pour qui le traitement est arrêté à partir de la gestation, on peut penser que les 3 semaines de gestation n'ont pas été suffisantes pour atténuer les effets sur le comportement maternel ; toutefois compte tenu des très faibles doses d'exposition employées, il est plus probable que cela soit dû à des modifications subies in utero, ce qui est en accord avec la littérature, où une exposition in utero engendre des effets sur le comportement à l'âge adulte ([Nakamura et al 2012](#)) ([Palanza et al 2002b](#)) ([Skinner et al 2008](#)).

Dans notre étude, on a élargi l'étude comportementale en explorant également les effets sur les préférences gustatives (sucré, salé et gras). Dans la littérature, les effets des perturbateurs endocriniens sur les préférences sont peu ou pas étudiés. Ferguson et al, montrent que la génisteine et le nonyl-phénol (40 mg/kg PC/j, 60 mg/kg PC/j respectivement) altèrent le dimorphisme pour la préférence au salé ([Ferguson et al 2009](#)). Drewnowski et al, décrit un dimorphisme dans les préférences au sucré et au salé, et montre l'implication des œstrogènes dans les mécanismes de régulation des préférences ([Drewnowski 1997](#)), des effets confirmés par Curtis et al, qui étudie le rôle des œstrogènes dans la préférence au sucré ([Curtis et al 2005](#)). Mais dans notre étude ce n'est pas une altération du dimorphisme qu'on a enregistré, mais plutôt une apparition d'un dimorphisme pour la préférence au salé chez les animaux immatures, alors que normalement le dimorphisme est absent jusqu'à l'âge adulte (Figure 22). En réalité, comme l'illustre la figure 22, la fréquence de ces effets au stade immature est plus forte en deuxième génération, ce qui illustre des effets multi-générationnels.

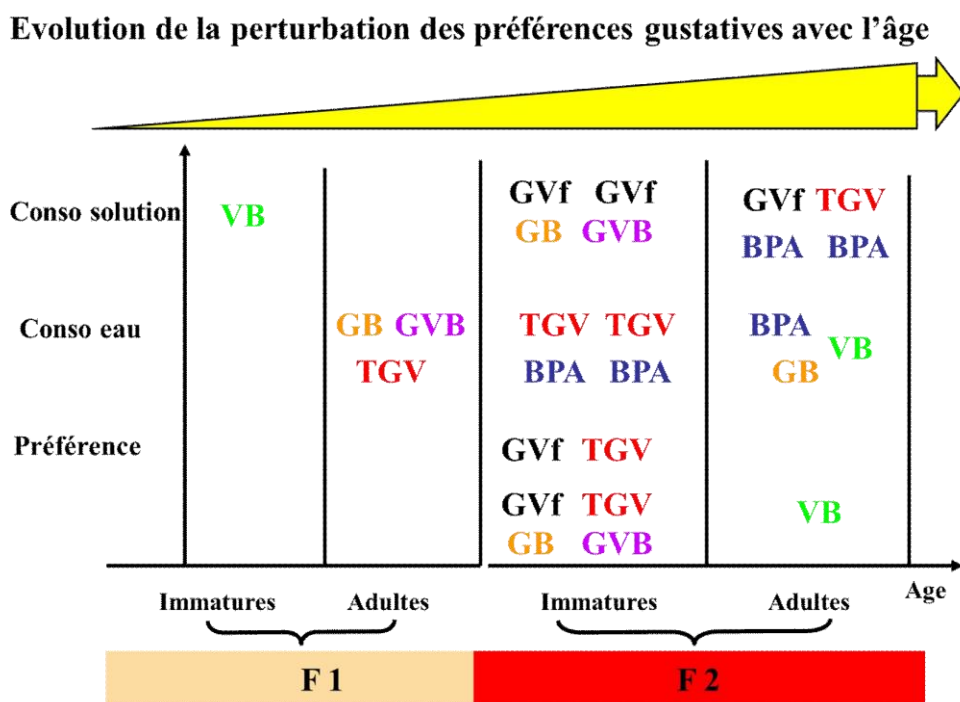


Figure 22 : Effets des traitements sur les préférences gustatives (n = 12 rats/groupe pour la F1 et la F2). Chaque lot signalé présente une variation significative par rapport au lot témoin (Anova mesures répétées, $p < 0,05$).

Notre étude montre que les expositions à des mélanges peuvent engendrer des effets distincts sur le développement. Parmi ceux qui sont enregistrés dans la première génération (F1) : la distance anogénitale semble être le paramètre le plus affecté, avec un effet plus prononcé chez les mâles (GVf, GVB, BPA) que chez les femelles (GVf), et qui est classiquement interprété comme un effet intra-

utérin de type anti-androgénique. A l'inverse, l'apparition de la puberté dont l'avancement chez la femelle et le retardement chez le mâle traduisent un effet de type œstrogénique, n'est pas affectée, tout comme la durée des cycles œstraux. Cependant, dans les lots traités on a enregistré des femelles avec un cycle irrégulier (>5jours), effets plus prononcé chez les femelles exposées au BPA (deux femelles avec un cycle anormal), ce qui est en accord avec la littérature ([Rubin et al 2001](#)). Les effets sur le développement dans la deuxième génération sont moins prononcés, mais, curieusement, l'effet du BPA sur la distance ano-génitale persiste.

Dans l'exposition continue présentée ici, et qui est spécifiquement dédiée à l'étude des mélanges, nous retrouvons l'apparition des malformations, mais au vu de nos données, il est vraiment difficile d'établir un lien direct entre ces malformations et les propriétés hormonales qui distinguent nos molécules. Cependant, il est connu que la génistéine (œstrogénique) peut cibler les cellules synoviales (cellules totipotentes qui ont la capacité de se différencier en chondrocytes) et les transformer en cellules adipocytaires ([Relic et al 2009](#)). Cet effet adipogénique peut expliquer l'apparition des malformations au niveau osseux (malformations des queues). La physiopathologie de ces problèmes osseux est très mal connue, cependant une des hypothèses les plus discutées dans la littérature est la mauvaise fermeture du tube neural durant l'embryogenèse, qui est l'origine d'une maladie congénitale 'spina bifida'. On peut donc imaginer qu'une mauvaise fermeture du tube neural soit à l'origine des malformations osseuses chez nos rats. Dans la littérature, et à notre connaissance, aucune étude ne traite la question des perturbateurs endocriniens et la mauvaise fermeture du tube neural, cependant il a été montré qu'une exposition in utero à des hormones sexuelles provoquent des problèmes de fermeture de tubes neuraux chez des embryons de poulet ([Pamir et al 2006](#)).

Pour les malformations de système dentaire un travail est en cours sur ces mêmes animaux (Collaboration : Paris 5), il va nous permettre de mieux comprendre les liens entre nos traitement et l'apparition de ces malformations, cependant dans la littérature et à notre connaissance aucune publication ne traite ce sujet.

De même, à notre connaissance, aucune étude ne traite la question de la perturbation endocrinienne en lien avec l'apparition des malformations au niveau oculaire. L'augmentation de la tension oculaire trouvée chez les animaux qui présentent ces malformations nous laisse supposer qu'il s'agit des glaucomes. Dans la littérature, il est connu que l'apparition des glaucomes est associée à une hypertonie qui peut être influencée par des facteurs nutritionnels ([Desmettre & Rouland 2005](#)). Parmi ces facteurs nutritionnels, on trouve les acides gras essentiels, précurseurs

métaboliques des séries oméga-6 et oméga-3. Ils sont impliqués dans les cascades enzymatiques qui conduisent à la formation des eicosanoïdes (prostaglandines, leucotriènes, prostacyclines et thromboxanes). A leur tour, ces eicosanoïdes ont des effets sur des paramètres vasculaires, l'agrégation plaquettaire, les processus inflammatoires ([Desmettre & Rouland 2005](#)).

Selon ces données, une des hypothèses les plus plausibles est celle d'un dysfonctionnement dans le métabolisme lipidique, sous l'influence des perturbateurs endocriniens, car le métabolisme lipidique est modulé par les hormones sexuelles ([Extier et al 2009](#)). Ce défaut dans le métabolisme lipidique engendre un déséquilibre dans le ratio oméga 3/oméga 6 qui pourrait favoriser l'augmentation de la pression intraoculaire par défaut de synthèse de prostaglandines de la famille 2 (PG-F2) ([Desmettre & Rouland 2005](#)).

L'augmentation significative du poids corporel observée dans certains lots de cette deuxième génération non exposée (F2) confirme ces effets multi-générationnels observés sur les préférences gustatives. Dans le même sens, le bilan métabolique est plus affecté dans la seconde génération, et les effets sont plus prononcés chez les femelles que chez les mâles. Tout ceci est en accord avec plusieurs études portant sur le développement de l'obésité suite à des expositions aux perturbateurs endocriniens ([Newbold 2010](#)).

Plusieurs études montrent une relation étroite entre le métabolisme énergétique, et l'expression des récepteurs aux œstrogènes ERs : chez les souris knock-out pour l'ER β , les mâles ainsi que les femelles, présentent une altération du métabolisme glucidique après des tests de tolérance au glucose et développent une résistance à l'insuline sans modification de la prise alimentaire, mais les mécanismes restent encore inconnus ([Heine et al 2000](#)). Dans notre étude, on fait le même constat avec nos rats mâles exposés au mélange binaire VB (œstrogénique et anti-androgénique), où une altération du métabolisme glucidique est enregistrée sans modification de prise de nourriture.

Chez le rat le cholestérol est transporté par deux lipoprotéines (CHO-HDL et CHO-LDL), avec une prédominance de l'CHO-HDL, et une suppression des deux lipoprotéines (CHO-HDL et CHO-LDL) provoque une diminution des concentrations sériques du cholestérol. Les effets des perturbateurs endocriniens sur le profil lipidique plasmatique sont peut documentés. Cependant le métabolisme lipidique est connu pour être modulé par les œstrogènes ([Wang et al 2011](#)) et ces effets varient en fonction de la concentration : à des doses physiologiques ($\leq 0,04$ mg/kg PC/j), les

concentrations du cholestérol et des CHO-HDL augmentent, alors qu'à des doses pharmacologiques ($\geq 0,2$ mg/kg PC/j) les concentrations du cholestérol et des CHO-HDL baissent ([Parini et al 2000](#)).

Tableau 3 : Comparaison des effets des perturbateurs endocriniens sur le bilan métabolique chez le rat mâle et femelle dans les deux générations F1 et F2

		Mâles						Femelles					
Génération	Traitement	TGV	GVf	GB	VB	GVB	BPA	TGV	GVf	GB	VB	GVB	BPA
	F1	Cholestérol	↓↓	—	—	↓↓	↓↓	—	—	—	↑↑	—	—
CHO-HDL		—	—	—	↓↓	—	—	—	—	—	—	—	—
CHO-LDL		↓↓	↑↑	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	—	—	↑↑	↓↓	—
TG		—	—	—	↓	—	—	↑↑	—	—	↑↑	↑↑	↑↑
Glucose		—	—	—	—	—	—	↓	↑↑	—	—	↑↑	↓↓
F2	Cholestérol	↓↓	—	↓↓	↓↓	—	—	↓	—	—	↓	↓	↓↓
	CHO-HDL	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	—	↓	↓↓	↓↓	↓	↓	↓↓
	CHO-LDL	↓	—	↓↓	↓	↓↓	↓↓	↓↓	↑↑	↑↑	↓↓	↓	—
	TG	—	—	—	↑↑	—	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
	Glucose	↑↑	—	↓↓	↑↑	—	—	—	—	—	—	↓	—
	Leptine	—	—	—	—	—	↑↑	—	—	—	—	↑↑	↑↑

Les flèches en couleur rouge indiquent les effets significativement différents ($p < 0,05$)

Le tableau 3 résume les effets des perturbateurs endocriniens, à des faibles doses seuls ou en mélanges, sur le bilan métabolique des rats mâles et femelles exposés d'une manière continue (de la conception à l'âge adulte : F1) ou pas exposés (F2).

Dans la F1, chez les mâles F1 à l'âge adulte le mélange VB entraîne une tendance à baisser le CHO-LDL, et le CHO-HDL qui se traduit par une baisse du cholestérol, mais également une baisse des TG sériques, des effets semblables à ceux décrits lors d'un traitement avec de l'œstradiol chez des rats mâles castrés ([Ginci et al 1997](#)). Chez les femelles, il est très difficile de faire un lien entre les propriétés hormonales de nos molécules et les résultats obtenus, mais dans l'ensemble, sauf pour les lots GB et GVf, les traitements ont une tendance à augmenter les TG, un effet comparable à celui retrouvé chez des souris exposées à 100 µg/kg PC/j de Bisphénol A durant leurs gestation ([Alonso-Magdalena et al 2010](#)). La diminution des concentrations de CHO-LDL, observée dans les lots TGV et GVB et l'augmentation dans le lot VB ne sont pas corrélées à une variation des concentrations sériques du cholestérol. Cependant l'hypoglycémie enregistrée dans le lot TGV est peut être due à une action de type oestrogénique au niveau périphérique (pancréas), semblable à celle du BPA ([Batista et al 2012](#)).

Dans la F2, chez les mâles une baisse des concentrations sériques des lipoprotéines (CHO-LDL et CHO-HDL) qui se traduit par une baisse du cholestérol, surtout dans les lots GB, VB et TGV,

indique des effets de type œstrogénique comme dans la F1. Cependant l'augmentation des TG dans les lots VB et BPA montre que même lorsqu'on est exposé à un mélange associant un composé anti-androgénique à un composé œstrogénique, on se retrouve plutôt dans un schéma phénotypique de type œstrogénique qui va vers une prédisposition d'obésité. Ceci est confirmé par une légère augmentation de la leptinémie dans le lot BPA ([Miyawaki et al 2007](#)). Une augmentation du glucose dans les deux lots TGV et VB signifie peut être une résistance à l'insuline au niveau périphérique ([Alonso-Magdalenal et al 2010](#)).

Les femelles semblent plus sensibles aux effets des perturbateurs endocriniens que les mâles, ce qui est en accord avec la littérature lors d'une exposition au BPA ([Miyawaki et al 2007](#)). Mis à part dans les lots GVf et GB, une diminution d'CHO-HDL et CHO-LDL entraîne une diminution du cholestérol, ces effets sont de type œstrogénique comme dans la première génération. Comme spécifiquement observé dans les lots GVB et BPA, l'augmentation des TG prédispose également nos animaux au développement de l'obésité et cette augmentation est corrélée avec une augmentation des concentrations sériques de leptine ([Sun et al 2012](#)). L'hypoglycémie enregistrée dans ce même lot peut être due à une action directe ou indirecte sur le pancréas, car dans la littérature le BPA peut affecter la sécrétion d'insuline et entraîner une hypoglycémie ([Batista et al 2012](#)).

Par conséquent, cette étude intégrative et pluri-générationnelle a donc permis d'identifier différentes cibles biologiques sensibles aux perturbateurs endocriniens. Elle montre qu'il est difficile de prédire l'activité des mélanges, lesquels agissent différemment selon la cible. Toutefois, elle nous informe sur des effets propres à la période d'exposition et illustre clairement l'impact de la période néonatale dans la sévérité et la multiplicité des effets biologiques et leur délai d'apparition. Elle illustre également la mise en place d'effets multi-générationnels sur la génération non exposée.

Dans la poursuite de ce travail, nous avons concentré notre analyse sur deux cibles biologiques susceptibles de nous donner des informations sur les effets multi-générationnels associés au développement et au comportement :

- Le tissu adipeux, en raison des effets obésogènes obtenus dans les lots BPA et GVB, et pour lesquels nous définirons les caractéristiques métaboliques et nous explorerons les mécanismes *epi-génétiques* pouvant être impliqués dans les processus obésogènes (chapitre III).

- Les glandes salivaires, car elles sont impliquées dans les processus gustatifs et les perceptions sensorielles associées au comportement, mais elles participent également au développement et à l'homéostasie générale (chapitre IV).

CHAPITRE 3: PERTURBATEURS ENDOCRINIENS ET MODULATION DE L'ADIPOGENESE

Dans notre étude *in vivo* une augmentation de poids corporel a été enregistrée dans la deuxième génération dont les deux parents ont été exposés au BPA seul ou en mélange avec du G+V. Dans cette étude *in vivo*, l'effet sur l'évolution du poids corporel est plus prononcé chez les femelles que les mâles. Cependant dans notre étude l'augmentation de la masse grasse ne résulte pas d'une augmentation de prise de nourriture ou de consommation d'eau. Bien qu'on ne puisse exclure l'hypothèse d'une action des perturbateurs endocriniens sur le système nerveux central pour perturber l'homéostasie énergétique via une action sur les neurones orexigènes et anorexigènes, ces résultats renforcent aussi l'hypothèse d'une action périphérique, ou les perturbateurs endocriniens agiraient sur l'unité constituante du tissu adipeux : l'adipocyte.

En effet, une première étude menée au laboratoire sur la lignée pré-adipocytaire 3T3-L1 a montré que le BPA et la Génistéine modifient différemment les processus initiaux de différenciation adipocytaire conduisant à des fonctions adipocytaires opposées. Le BPA stimule la synthèse de leptine et de triglycérides tandis que la génistéine produit l'effet inverse, ce qui illustre l'effet pro-adipogénique potentiel du BPA ([Phrakonkham et al 2008](#)).

Une deuxième étude réalisée par l'équipe Toxalim (INRA-Toulouse) sur un modèle de pré-adipocytes murins (3T3-F442A) plus proche du tissu adipeux car sa différenciation est naturellement spontanée, donc asynchrone, et seulement accélérée par l'insuline, a montré que les effets de la génistéine sur la synthèse des TG ne répondent pas à une loi mono-tonique (C Héliès, communication personnelle). Cette voie est insensible aux très faibles doses de génistéine (0,1 et 1 μM) mais est induite aux doses intermédiaires jusqu'à 50 μM , dose au-delà de laquelle elle est cytotoxique. Sur ce modèle, le BPA exerce un effet adipo-génique dès des concentrations très faibles (10^{-15} M) tandis que la vinclozoline administrée seule n'a pas d'effet sur le stockage des TG. Dans cette étude *in vitro*, le mélange GVB (10 μM / 0,1 μM / 10^{-9} M) induit une augmentation du taux de TG équivalente à celle des molécules seules (G, B), mais inhibe la synthèse de leptine à l'image de la génistéine seule.

Ceci nous amène à penser que ces altérations à un stade critique du programme de maturation cellulaire pourraient affecter de manière persistante certaines des fonctions endocriniennes et/ou métaboliques, du moins lipidiques, du tissu adipeux.

D'autre part, la littérature mentionne que les effets trans-générationnels de perturbateurs endocriniens sont sous la dépendance de mécanisme épigénétique ([Anway et al 2005](#)) ([Dolinoy et al 2007](#)). Ceux-ci incluent principalement des modifications de la méthylation de l'ADN ou certaines modifications des histones telle leur acétylation. Ces modifications influencent l'architecture de la chromatine ([Ogryzko et al 1996](#)), entraînant des difficultés de lecture qui modifient l'expression génique ([Cederroth et al 2007](#)).

Dans la continuité de ces travaux, et compte tenu de ces données, nous avons porté une attention particulière au tissu adipeux afin de préciser les effets de xéno-hormones sur l'adipogenèse, seules ou en mélange. Ce chapitre approfondit l'étude des mécanismes d'action des mélanges de xéno-hormones sur l'adipogenèse par une double approche : une première approche *in vitro* sur les 3T3-L1, qui a pour objectif d'identifier les effets de cocktails en génistéine et vinclozoline sur des marqueurs de l'adipogenèse, et une deuxième approche *in vivo* qui analyse de manière plus approfondie nos données d'expositions aux mélanges en pointant l'implication des mécanismes épigénétiques sur la génération F2 non exposée.

1. Caractérisation d'un effet cocktail de génistéine-vinclozoline sur la différenciation de cellules pré-adipocytaires 3T3-L1

Dans cette étude, nous avons regardé l'effet d'une exposition précoce aux mélanges sur les fonctions adipocytaires, en l'occurrence la synthèse de leptine et de triglycérides. Pour cela, les molécules ont été administrées lors des premières 48 heures de la différenciation adipocytaire induite par le cocktail de différenciation (Cf. chapitre Matériel et Méthodes). Cette étude implique de s'assurer au préalable de la non toxicité des mélanges. Pour cela, une étude effet dose nous a permis de cribler les doses non cytotoxiques sur la base d'un test de viabilité cellulaire (test du rouge neutre) et d'un suivi de la croissance cellulaire (test du DABA).

1.1. Détermination des conditions expérimentales

1.1.1. Toxicité des xéno-hormones (Test du rouge neutre)

Les doses de Génisteine et de Vinclozoline testées ont été choisies sur la base de nos études précédentes ([Phrakonkham et al 2008](#)) et de l'étude faite dans un laboratoire collaborateur à ce projet (C. Héliès, UMR Toxalim, Toulouse). A noter que la vinclozoline est insoluble dans le DMSO au-delà de 10 μM . Le test du Rouge Neutre est réalisé deux jours après l'administration du cocktail de différenciation et l'absence de toxicité est validée si le taux de viabilité des cellules dans les puits traités n'est pas 75% inférieur à celui des puits non traités. La figure 1 représente l'effet de différentes concentrations de la G et/ou de la V à différentes concentrations sur la viabilité des cellules.

Dans nos conditions expérimentales, la génistéine s'avère cytotoxique pour des doses supérieures à 80 μM tandis que la vinclozoline n'a absolument pas d'effet toxique quelle que soit la concentration employée. De fait, nous avons exploré les effets des mélanges en employant deux doses de vinclozoline : la plus forte dose (10 μM) et la dose intermédiaire de 1 μM . Dans ces conditions, seule l'addition de 10 μM de vinclozoline augmente la toxicité de la génistéine, tandis qu'un mélange contenant seulement 1 μM de vinclozoline entraîne un profil de toxicité identique à celui de la génistéine administrée seule (Figure 1).

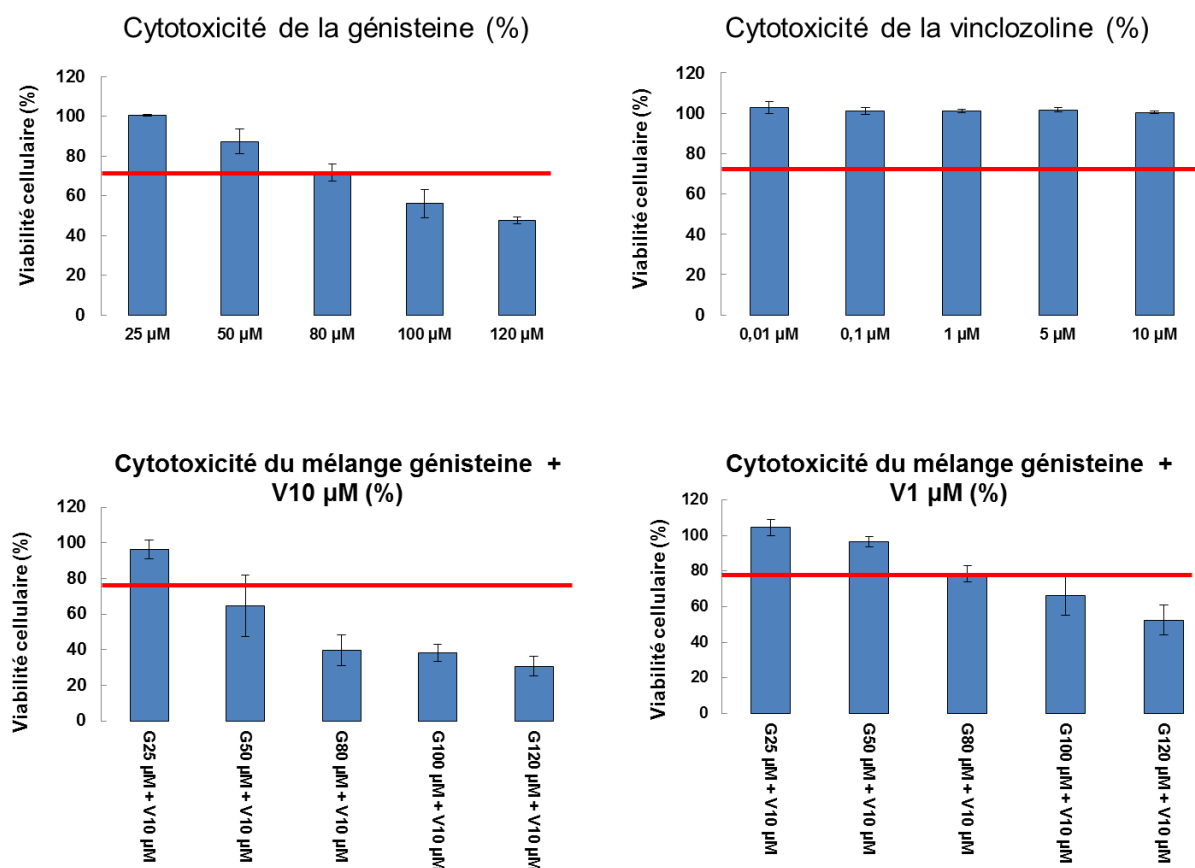


Figure 1 : Cytotoxicité de la G et/ou de la V administrés lors de la phase d'induction de la différenciation adipocytaire des 3T3-L1 (test du rouge neutre). Les résultats sont exprimés en moyennes \pm SEM des %, (v/v) de colorant relargué des cellules traitées par rapport au témoin DMSO 0,2% (v/v). Ils proviennent de 3 expériences indépendantes, mesurées en triplet (Taux d'ensemencement 25000 cellules/puit).

1.1.2. Effets des xéno-hormones sur la croissance des cellules 3T3-L1 (Test du DABA)

La quantification de l'ADN ($\mu\text{g/puits}$) a été réalisée pour estimer le taux de cellules dans les puits à plusieurs stades de croissance : au moment de l'ensemencement (J0), deux jours après le traitement (J2) et à l'arrivée de la phase stationnaire de croissance, qui correspond aussi à la maturation adipocytaire (J8) et à la fin de l'expérimentation et donc à l'effet à terme. Les résultats, montrent qu'à J0 (Figure 2) la quantité d'ADN, et par voie de conséquence la quantité de cellules, est la même dans tous les puits malgré une légère variabilité qui semble due à l'ensemencement. Deux jours après, nous pouvons voir que les traitements par les molécules seules n'affectent pas la quantité d'ADN par rapport au témoin DMSO (0,2%), alors que les traitements par leurs mélanges entraînent une légère baisse, mais qui est validée par l'analyse statistique ($p < 0,05$). Cet effet, qui est retrouvé à J8, ne suit cependant pas une fonction exponentielle de croissance puisqu'il n'est pas amplifié à J8 (Figure 2).

On peut remarquer aussi que l'effet des mélanges n'est pas proportionnel à la concentration de V ($p < 0,05$).

De fait, même si le test de DABA traduit une certaine toxicité des mélanges, nous avons poursuivi notre étude en retenant la dose de $25\mu\text{M}$ pour la génistéine et 3 doses de vinclozoline : $0,1\mu\text{M}$; $1\mu\text{M}$ et $10\mu\text{M}$. L'œstradiol a été également introduit comme témoin œstrogénique à une concentration (10^{-10} M) déjà identifiée comme dose non cytotoxique sur ces mêmes conditions expérimentales ([Phrakonkham et al 2008](#)).

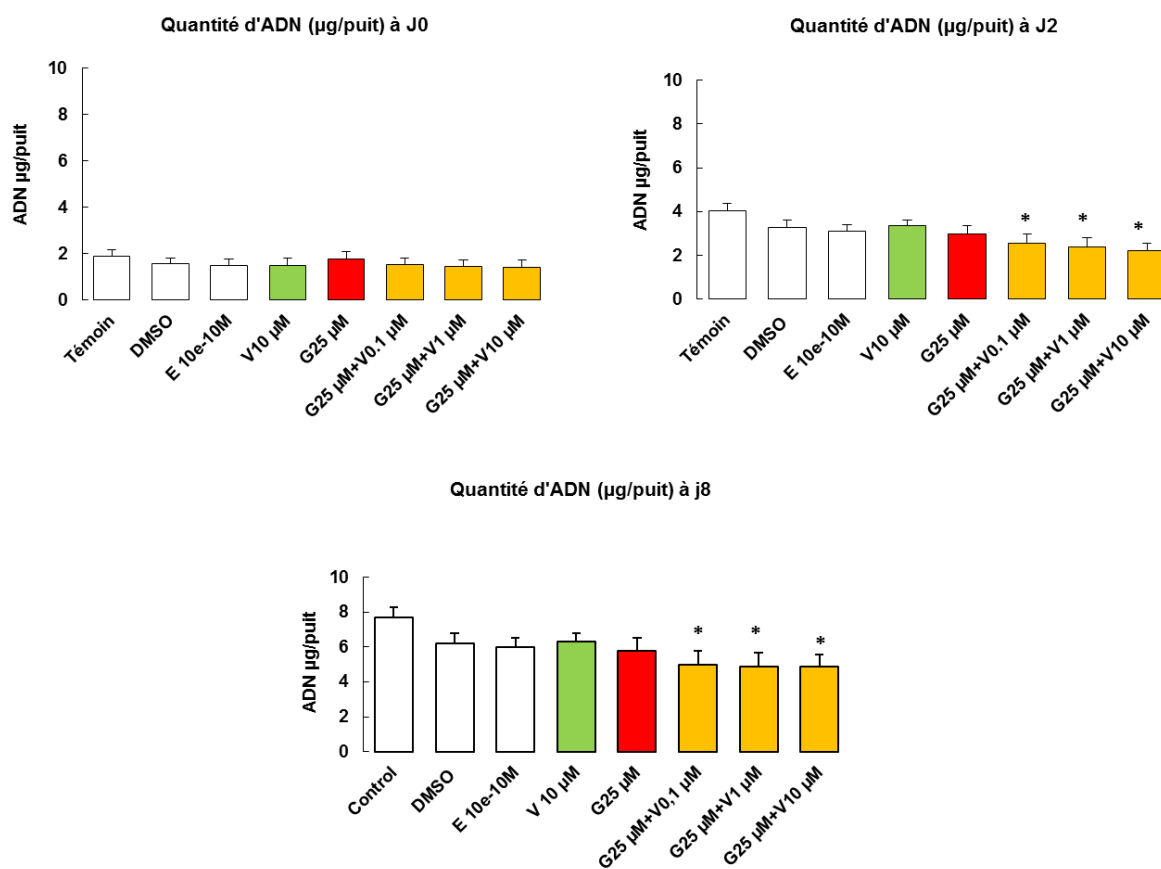


Figure 2 : Quantification de l'ADN (µg/puit) dans des cellules 3T3L1 à J0 (A), J2 (B), J8 (C) suite à un traitement de 2 jours lors de la phase d'induction de la différenciation adipocytaire. Les résultats sont représentés sous forme de moyenne \pm SEM avec 3 expériences indépendantes, mesurées en triplet. *représente une différence significative entre les moyennes par rapport au groupe témoin DMSO 0,2% (v/v) avec $p < 0,05$ (test de Mann-Whitney).

1.1.3. Effets des xéno-hormones sur la différenciation adipocytaire

1.1.3.1. Evaluation de la synthèse globale de lipides (test ORO)

La transformation des pré-adipocytes en adipocytes s'accompagne d'une synthèse de lipides qui est visualisée par coloration à l'huile rouge (ou Red Oil). Comme l'illustrent les photos (Figure 3) quel que soit le traitement, les cellules n'ont pas perdu leurs capacités à se différencier en cellules matures, capables d'emprisonner des lipides dans leurs vacuoles, et de synthétiser des TG. On constate une différence de taille d'adipocyte selon le type de traitement. Dans le cas d'un traitement avec le DMSO seul (Figure 3.B), l'œstradiol (Figure 3.C) ou la V seule (Figure 3.D), les cellules ont un aspect comparable à celui des témoins. Par contre, en présence de la G seule (G25 μ M, figure 3.E) ou de mélange GV (Figure 3.F, 3.G et 3.H) les cellules colorées à l'huile rouge ont un aspect moins volumineux et semblent moins nombreuses, un effet qui est plus accentué dans le cas des cellules traitées avec le mélange (Figure : 3.F, 3.G et 3.H). Ces observations suggèrent que la G exerce un effet anti-adipogénique et s'oppose à l'action de la V, et ceci indépendamment de la concentration de cette dernière.

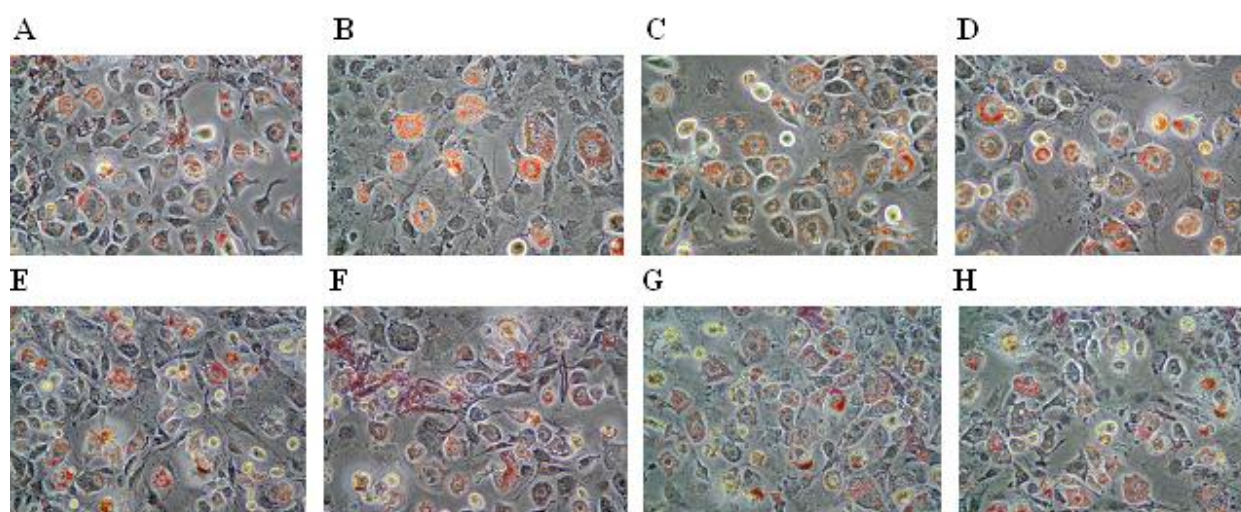


Figure 3 : Visualisation des lipides dans des cellules 3T3L1, Témoin (A), et traitées au DMSO 0,2% (v/v) (B), à l'œstradiol 10^{-10} M (C), la V10 μ M (D), la G25 μ M (E), les mélanges G25 μ M/ V0,1 μ M (F), G25 μ M/ V1 μ M (G), G25 μ M/ V10 μ M (H) à J8 (x200).

Pour valider ces résultats, une quantification des lipides totaux par une extraction de l'huile rouge avec de l'isopropanol a été réalisée à J0, J2 et J8 après l'induction de la différenciation adipocytaire (Figure 4).

A J0, toutes les cellules présentent bien quasiment la même quantité de lipides, mais deux jours après les traitements, les traitements avec la V 10 μM et l'Œstradiol 10^{-10} M augmentent la quantité des lipides intracellulaires (effet adipogénique), contrairement à la G 25 μM et aux mélanges qui ont tendance à diminuer la quantité des lipides intracellulaires, un effet anti-adipogénique qui persiste à J8.

Bien que l'analyse statistique ne valide pas ces résultats, nous devons noter que le profil d'action obtenu à J2 est retrouvé à J8, ce qui nous amène à considérer ces résultats, mais nous invite à compléter l'étude en considérant d'autres marqueurs de la fonction adipocytaire.

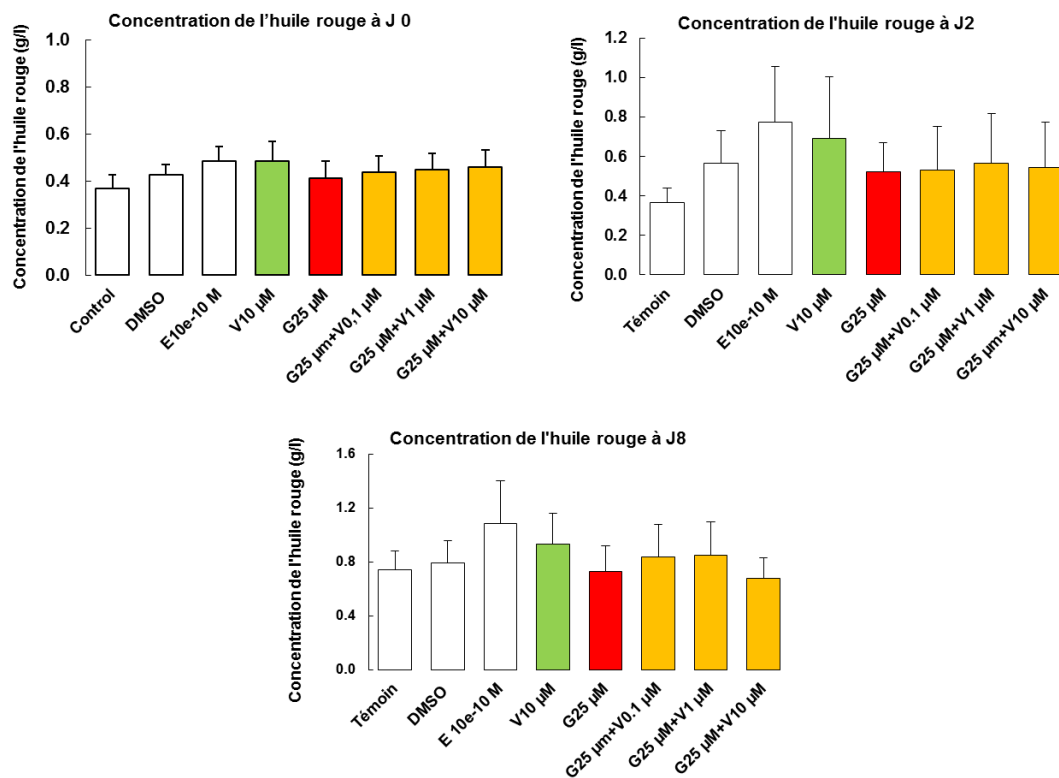


Figure 4 : Quantification des lipides (g/L) dans des cellules 3T3 L1 à : J0 (A), J2 (B), J8(C) suite à un traitement de 2 jours lors de la phase d'induction de la différenciation adipocytaire. Les résultats sont représentés sous forme de moyenne \pm SEM avec 3 expériences indépendantes mesurées en triplet.

1.1.3.2. Effets des xéno-hormones sur la synthèse des triglycérides adipocytaires

La quantité des TG accumulés dans les vacuoles est associée à l'état de différenciation adipocytaire. Considérée comme un indicateur tardif de maturité adipocytaire, la présence de TG dans les vacuoles doit être faible en début d'expérimentation (à J0, J2) et maximale en fin de culture c'est-à-dire à J8 (Figure 5).

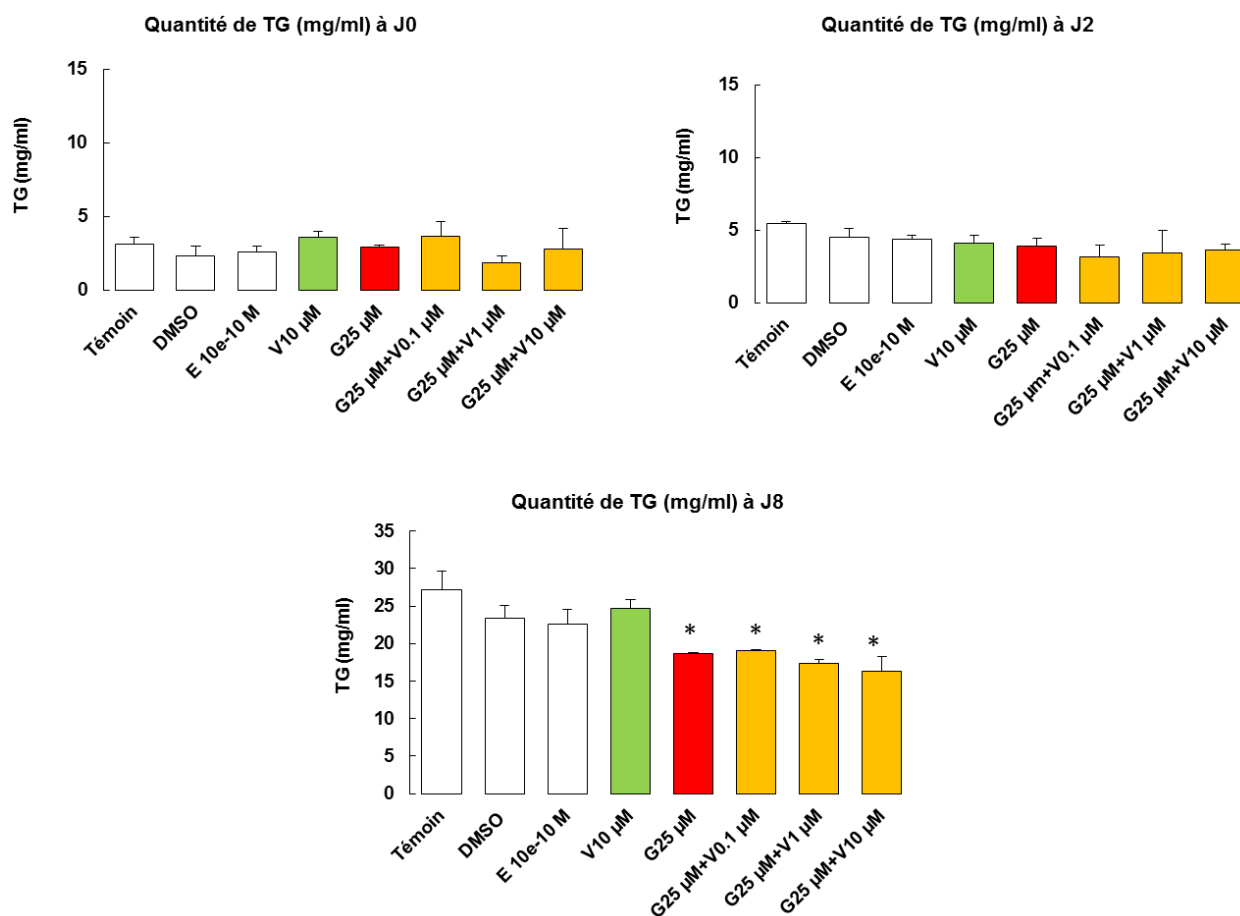


Figure 5 : Accumulation des TG (mg/L) dans les vacuoles des cellules 3T3L1 à : J0 (A), J2 (B), J8 (C) suite à un traitement de 2 jours lors de la phase d'induction de la différenciation adipocytaire. Les résultats sont représentés sous forme de moyenne \pm SEM avec 3 expériences indépendantes, mesurées en triplet. *représente une différence significative entre les moyennes par rapport au groupe témoin DMSO 0,2% (v/v) avec $p < 0,05$ (test de Mann-Whitney).

Conformément à ce qui était attendu, la quantité des TG à J0 et J2, c'est-à-dire au tout début de la différenciation adipocytaire, est minime. Par contre à J8, stade où les 3T3L1 ont théoriquement acquis tous les facteurs de leur maturité, ce taux de triglycéride est plus élevé (témoin J8). Les cellules qui ont été traitées pendant l'induction de la différenciation adipocytaire avec la V 10 µM et

l'œstradiol 10^{-10} M présentent le même niveau de synthèse que le témoin DMSO. Par contre, les cultures ayant reçu de la G 25 μ M ont une quantité de TG plus faible, une baisse qui s'accroît avec les mélanges, proportionnellement à la concentration de V ($p < 0,05$).

1.1.3.3. Effets des xéno-hormones sur la synthèse de leptine adipocytaire

La leptine est un autre marqueur tardif de la différenciation adipocytaire. Sa quantification dans les milieux de cultures cellulaires à J8 (Figure 6) montre que l'œstradiol 10^{-10} M, augmente la synthèse de leptine contrairement à ce qui est observé avec la G25 μ M (molécule oestrogénique) et à la V10 μ M (anti-androgénique) qui n'ont pas d'effet. Curieusement, les traitements associant la G à de très faibles doses de V (V 0,1 μ M, V 1 μ M) diminuent la synthèse de leptine alors que le mélange G 25 μ M/ V 10 μ M augmente la synthèse de leptine par un facteur 1,6 ($p < 0,05$).

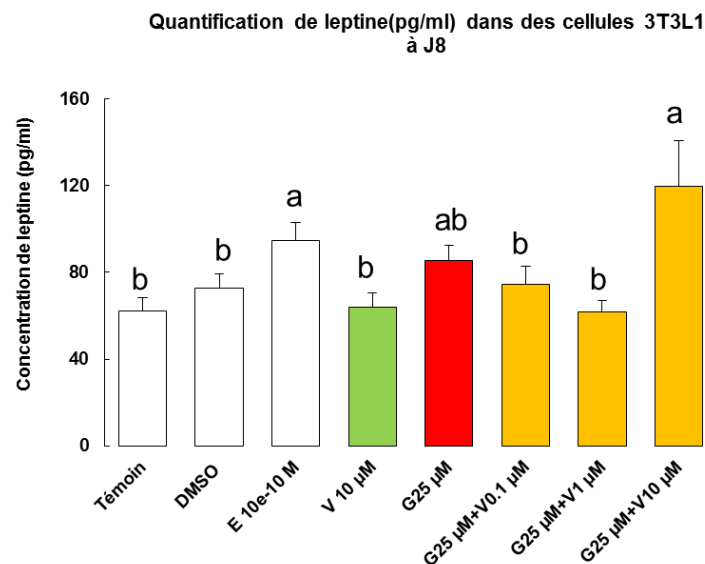


Figure 6 : Quantification de la leptine (pg/mL) dans les surnageant des cellules 3T3L1 à J8 suite à un traitement de 2 jours lors de la phase d'induction de la différenciation adipocytaire. Les résultats sont représentés sous forme de Moyenne \pm SEM avec 3 expériences indépendantes, mesurés en triplé. a, b : des lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes (Anova suivi d'un Newman-Keuls, $p < 0,05$).

Cette étude *in vitro* nous a donc permis de discriminer les effets de la génistéine et de la vinclozoline sur la cellule adipocytaire. Elle met en évidence le caractère estrogénique de l'œstradiol sur la synthèse de leptine, l'œstradiol n'ayant pas d'effet sur la synthèse de lipides. Concernant l'action des xéno-hormones, la vinclozoline seule est sans effet sur le tissu adipeux, même à la plus forte dose utilisées. A l'inverse, la génistéine exerce un léger effet œstrogénique sur la synthèse de leptine par comparaison au lot témoin et au lot traité par l'œstradiol. L'ajout simultané de

vinclozoline n'affecte pas la synthèse des triglycérides, mais modifie sélectivement la synthèse de leptine en fonction de la dose de vinclozoline dans le mélange. Alors que de faibles doses s'opposent à l'action de la génisteine, la plus forte dose potentialise l'effet de cette dernière.

Ces résultats suggèrent donc que les xéno-hormones puissent avoir des actions ciblées sur le tissu adipeux portant soit sur la synthèse de triglycéride (fonction de stockage), soit sur la synthèse d'adipokine comme la leptine, c'est-à-dire ciblée sur les fonctions endocrines, la leptine jouant un rôle dans le comportement alimentaire et dans la préférence au sucré ([Kawai et al 2000](#)). Ceci nous a conduit à analyser de manière plus attentive le tissu adipeux des animaux traités par les différents mélanges en considérant les fonctions adipocytaires pour la génération F1 et F2 et leurs mécanismes de régulations.

2. Effets multi-générationnels du BPA, seul ou combiné au mélange génisteine-vinclozoline, sur l'adipogenèse (F1 ; F2)

2.1. Effet sur la masse adipeuse des animaux exposés depuis la conception

Dans notre étude *in vivo*, nous avons évalué le pourcentage de la masse adipeuse par rapport au poids total du corps au moyen d'un impédance-mètre sur les animaux adultes au moment du sacrifice. Chez la génération F le poids corporel ne change pas (*Cf. Chapitre précédent*), et l'examen de la masse grasse par impédance-métrie n'a révélé aucun effet significatif de nos molécules seules ou en mélange chez ces rats à l'âge adulte, que ce soit chez le mâle ou chez la femelle (Figure 7). Toutefois, dans le lot BPA, nous observons une tendance à un excès de poids, et ceci indépendamment du sexe, alors que nous observons une tendance à avoir des effets opposés entre mâles et femelles dans les autres lots.

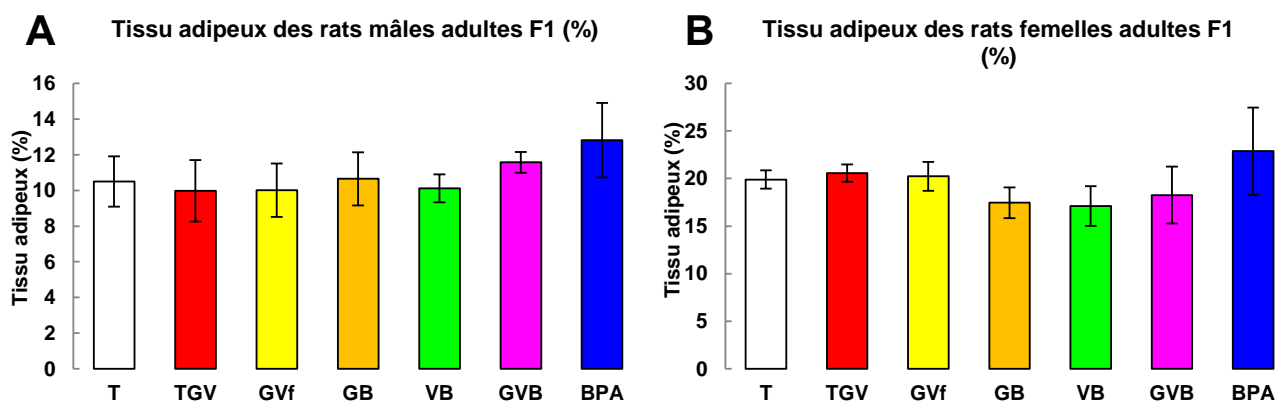


Figure 7 : Effets d'une exposition continue à des mélanges de xéno-hormones sur la masse grasse à l'âge adulte chez les mâles (A), et les femelles (B). Les résultats sont représentés par la moyenne \pm SEM (n = 12 rats/groupe).

Parallèlement à cette évaluation, nous avons prélevé le tissu adipeux péri-gonadique et viscéral en vue d'une analyse biochimique et moléculaire (Cf. annexes).

2.2. Effet sur la masse adipeuse de la descendance non exposée

De la même manière, nous avons évalué la masse adipeuse sur les animaux de la génération F2. Cette analyse était d'autant plus justifiée, car on avait enregistré une augmentation de poids corporel à l'âge adulte qui semblait varier selon le sexe et le traitement. Comme l'illustre la figure 8, ces variations de poids corporel concernent surtout les lots exposés au BPA et pour lesquels l'effet pondéral est significativement plus marqué chez les femelles que chez les mâles ($p < 0.05$). De plus, on note également une tendance à la baisse du poids corporel chez les mâles recevant le mélange TGV tandis que le mélange ternaire GVB entraîne une hausse pondérale significative seulement chez les femelles (Figure 8).

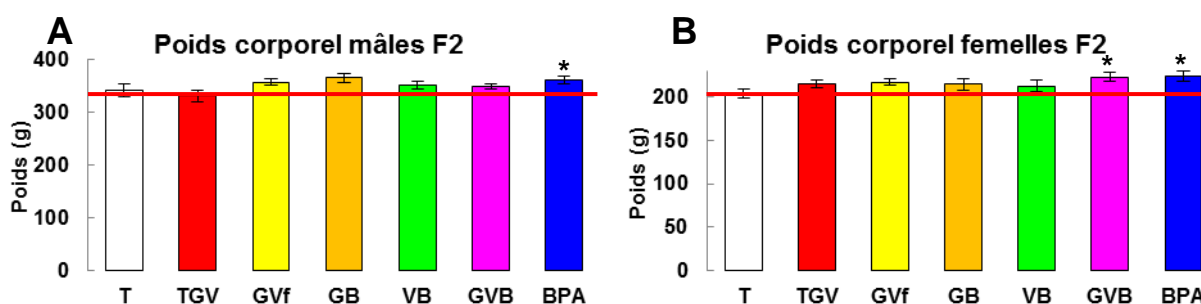


Figure 8 : Effets sur l'évolution du poids du corps chez des rats F2 dont les deux parents ont été exposés à des mélanges de xéno-hormones : les mâles (A), les femelles (B). Les résultats sont représentés par la moyenne \pm SEM (n = 12 rats/groupe). * représente une différence significative entre les moyennes par rapport au groupe témoin avec $p < 0.05$ (Anova suivie d'un Dunnett; $p < 0,05$).

L'évaluation de la masse adipeuse par impédance-métrie conduit à confirmer la baisse de la masse grasse totale ainsi que son pourcentage par rapport au poids corporel chez les mâles de la génération F2 dans les deux lots le TGV et le mélange ternaire GVB, mais elle ressort significative uniquement dans le lot GVB ($p < 0,05$) (Figure 9). Chez les femelles, l'évaluation par impédance-métrie confirme également l'augmentation du pourcentage de la masse grasse par rapport au poids corporel dans les deux lots traités au mélange ternaire GVB et au BPA ($p < 0,05$) (Figure 10).

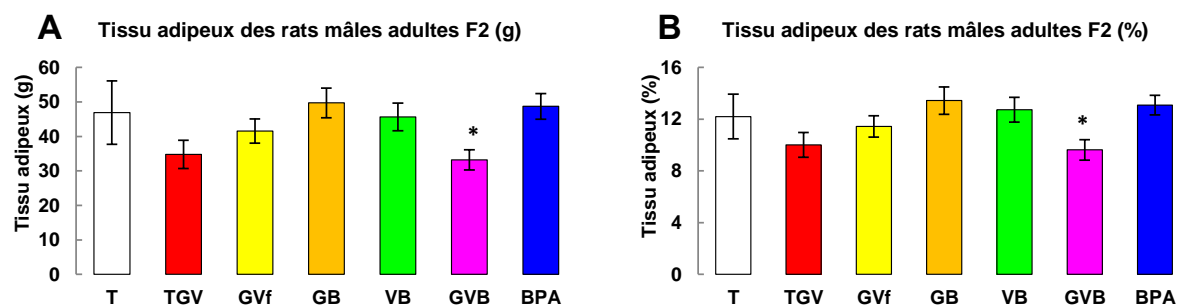


Figure 9 : Effets sur le développement de la masse du tissu adipeux (A) et son pourcentage par rapport au poids corporel (B) chez des mâles F2 à l'âge adulte dont les deux parents ont été exposés à des mélanges de xéno-hormones. Les résultats sont représentés par la moyenne \pm SEM ($n = 12$ rats/groupe). * représente une différence significative entre les moyennes par rapport au groupe témoin avec $p < 0,05$ (Anova suivie d'un Dunnett; $p < 0,05$).

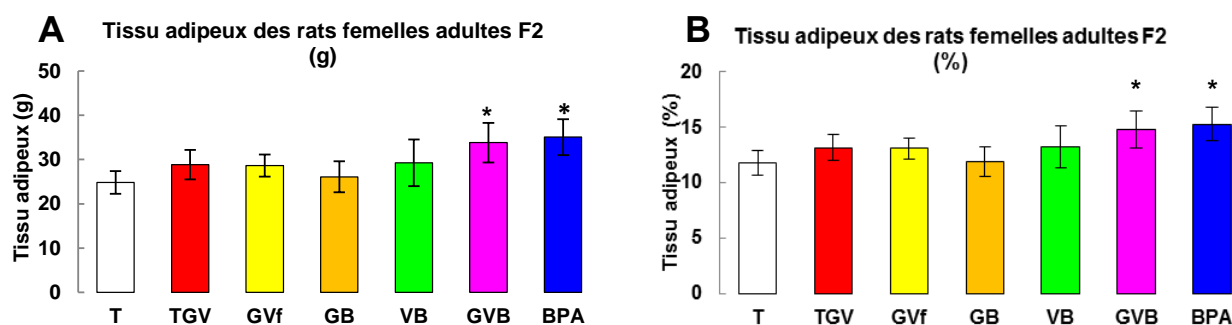


Figure 10 : Effets sur le développement de la masse du tissu adipeux (A) et son pourcentage par rapport au poids corporel (B) chez des femelles F2 à l'âge adulte dont les deux parents ont été exposés à des mélanges de xéno-hormones. Les résultats sont représentés par la moyenne \pm SEM ($n = 12$ rats/groupe). * représente une différence significative entre les moyennes par rapport au groupe témoin avec $p < 0,05$ (Anova suivie d'un Dunnett; $p < 0,05$).

2.3. Analyse morphométrique du tissu adipeux en F2

Afin de vérifier les effets sur le tissu adipeux, nous avons réalisé une étude histologique du tissu adipeux blanc péri-gonadique prélevé lors du sacrifice.

Les résultats montrent que l'augmentation de poids corporel et de masse adipeuse s'accompagne d'une augmentation de la taille des adipocytes (Figure 11). Cette hypertrophie de l'adipocyte a été enregistrée de manière significative dans les deux lots BPA et GVB ($p < 0,05$). Réciproquement, cette hypertrophie adipocytaire n'est pas retrouvée dans les lots chez lesquels on n'observe pas de modification dans la taille des adipocytes.

La détermination de l'aire de l'adipocyte est calculée à partir des photos de coupes histologiques prises sous microscope. Chez les témoins, cette aire est de l'ordre de $5000 \mu\text{m}^2$, quel que soit le sexe. Cette aire n'est pas affectée dans le tissu adipeux de rats issus des lots TGV, GVf, GB et VB (96 à 115% du témoin). Ce n'est pas le cas avec le BPA seul ou en mélange ternaire GVB, qui entraînent une augmentation significative de l'aire de l'adipocyte de 178% et 154% respectivement chez les femelles ($p < 0,05$). Les mâles sont également affectés, mais à un degré moindre dans le lot GVB (127%) et du même ordre de grandeur que chez les femelles dans le lot BPA (+ 173%, $p < 0,05$) (Figure 11).

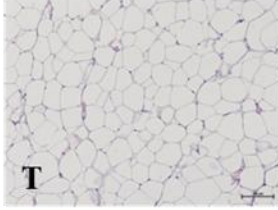
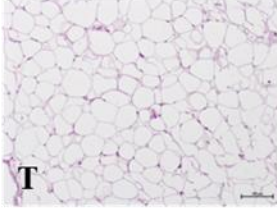
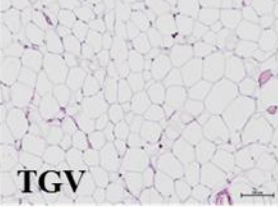
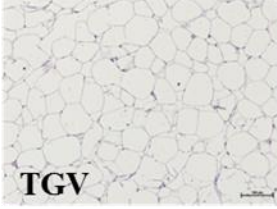
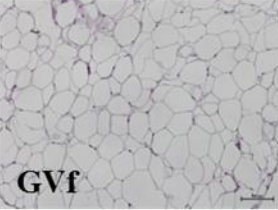
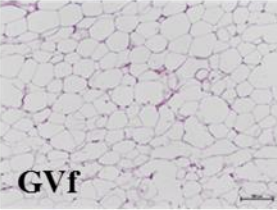
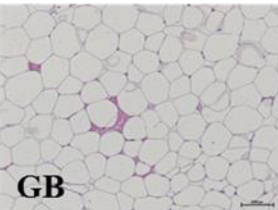
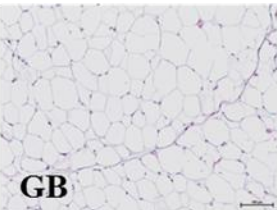


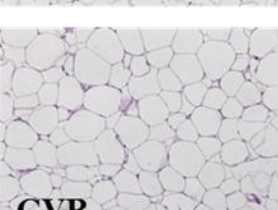
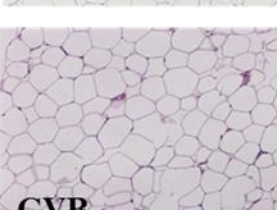


		Aire des adipocytes (μm^2)	
		Mâles	Femelles
		5095,01±403,89 100%	5008,24±267,94 100%
		5608,88±121,45 110,09% ± 2,38	4828,84±93,02 96,42% ± 1,85%
		5408,19±289,15 106,15% ± 5,67	4955,50±143,44 98,95% ± 2,86%
		5895,16±98,58 115,70% ± 1,93	5082,37±274,70 101,48% ± 5,48%
		5867,50±145,57 115,16% ± 2,86	4871,93±54,19 97,28% ± 1,08
		6499,18±343,35 127,56% ± 6,74	7716,76±557,91 * 154,08% ± 11,4
		8839,88±254,52 * 173,50% ± 5,00	8915,91±578,30 * 178,2% ± 11,55

Figure 11 : Effets sur la morphométrie du tissu adipeux péri-gonadique chez les mâles (gauche), et les femelles (droite) de la F2 à l'âge adulte dont les deux parents ont été exposés à des mélanges de xéno-hormones. Les coupes histologiques de tissu adipeux péri-gonadique sont colorées à l'Hemalun/Eosine (grossissement x 20) (n = 6 rats/groupe). Les valeurs correspondent à l'aire des adipocytes, en μm^2 et les pourcentages correspondent à la variation de l'aire par rapport au témoin du même sexe. * Représente une différence significative entre les moyennes par rapport au groupe témoin avec $p < 0,05$ (Anova suivie d'un Dunnett; $p < 0,05$).

Le volume de l'adipocyte, calculé à partir de la formule $\frac{4}{3}\pi r^3$ (Penza et al 2006), illustre la capacité à stocker les triglycérides. La figure 12 montre que ce volume n'est pas affecté par les mélanges TGV, GVf, GB et VB, chez le mâle comme chez la femelle. Par contre, le mélange GVB et le BPA entraînent une augmentation significative de volume de l'adipocyte dans le tissu adipeux des deux sexes ($p < 0,05$), mais comme précédemment, cet effet est plus prononcé chez les femelles, le BPA présentant le plus fort potentiel (environ 250% du témoin).

La densité des adipocytes est évaluée selon le nombre des cellules par mm^2 , et l'hypertrophie des cellules s'accompagne généralement par une diminution de la densité adipocytaire (Figure 13). Comme attendu, la densité des adipocytes est inversement proportionnelle au volume adipocytaire : elle est comparable à celle des témoins pour les lots qui ne présentent pas d'hypertrophie adipocytaire, *i.e.* les lots TGV, GVf, GB et VB (Figure 13). A l'inverse, elle diminue dans les lots traités par le mélange ternaire GVB, et par le BPA, et ceci indépendamment du sexe.

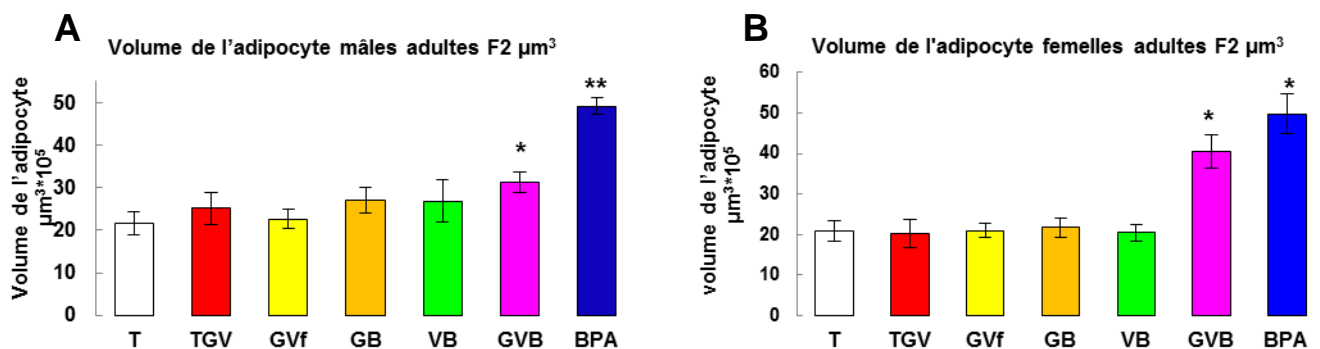


Figure 12 : Effets sur le volume de l'adipocyte chez des rats F2 dont les deux parents ont été exposés à des mélanges de xéno-hormones : les mâles (A), les femelles (B). Les résultats sont représentés par la moyenne \pm SEM ($n = 6$ rats/groupe).*, ** représente une différence significative entre les moyennes par rapport au groupe témoin avec $p < 0,05$; $p < 0,01$ successivement (Anova suivie d'un Dunnett).

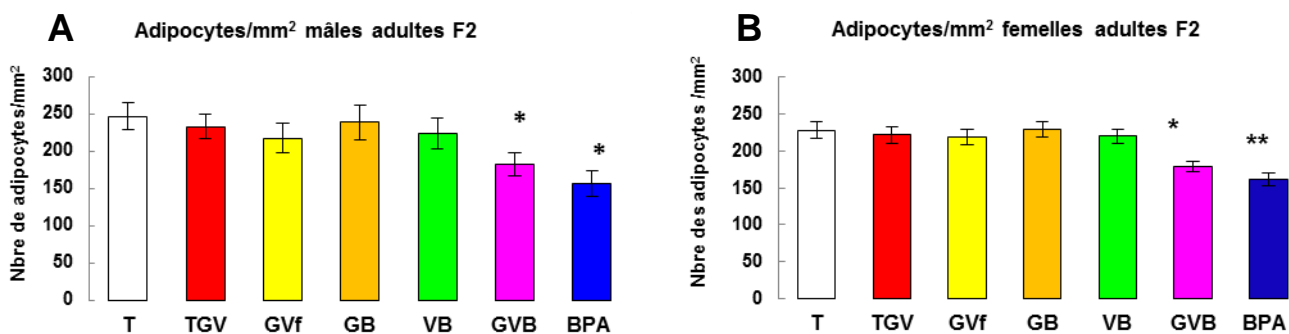


Figure 13 : Effets sur la densité des adipocytes chez des rats F2 dont les deux parents ont été exposés à des mélanges de xéno-hormones : les mâles (A), les femelles (B). Les résultats sont représentés par la moyenne \pm SEM (n = 6 rats/groupe). *, ** représente une différence significative entre les moyennes par rapport au groupe témoin avec $p < 0,05$; $p < 0,01$ successivement (Anova suivie d'un Dunnett).

Ces données laissent entrevoir de plus grandes capacités fonctionnelles dans les tissus adipeux des lots GVB et BPA susceptibles d'entraîner une augmentation des taux circulants de triglycérides et /ou de leptine.

Prise dans son ensemble, cette analyse morpho-métrique montre une nouvelle fois la complexité de prédire les effets de mélange puisque les effets du BPA sont annulés lorsqu'il est mis en présence avec un composé œstrogénique de type génistéine, ou en présence d'un composé anti-androgénique comme la vinclozoline, et seulement minorés lorsqu'il est mis en présence du complexe GV.

2.4. Recherches de marqueurs d'effets épigénétiques en F2

Dans le but d'expliquer l'origine de l'augmentation du poids chez les femelles non exposées F2, mais dont les mères ont été traitées par le BPA ou par le mélange GVB, une analyse complémentaire par western blot a permis une évaluation semi-quantitative des taux d'expression d'une histone H4 acétylée (Lys 8) au niveau du tissu adipeux péri-gonadique. Une modification de l'expression de cette protéine traduit une modification épigénétique de l'ADN par acétylation. L'hyper-acétylation des histones est reconnu comme un mécanisme d'activation des gènes de maturation cellulaire. L'histone H4K8 s'exprime fortement et sélectivement dans des adipocytes (mais pas dans les pré-adipocytes) ([Hartman et al 2002](#)). Elle a été retenue dans cette étude car son expression dans la zone promotrice du gène PS2, un marqueur d'exposition œstrogénique, est inhibée par le tamoxifène, un anti-œstrogène de référence dans des cellules MCF7 ([Liu & Bagchi 2004](#)). Nous avons donc voulu savoir si l'expression de cette histone pouvait être corrélée au développement de la masse adipeuse chez les animaux traités. Si tel est le cas, une surexpression par exemple traduira soit une diminution

de l'activité des histone-acétylases (ou HDACs), soit une augmentation de l'activité des acétyltransférases (ou HATs).

Les diagrammes de la figure 14 représentent une semi quantification de l'expression de la protéine par rapport au gène de référence RPS9.

A noter cependant que ces données sont issues d'une première analyse et sont à prendre avec précaution en raison de la qualité des gels (répétition en cours). Toutefois, il apparaît clairement que l'histone H4 acétylée n'est généralement pas exprimée chez les rats témoins : seulement 2 rats parmi les 7 expriment de manière visible la protéine (puits N° 5 et 6 sur les gels de bonne qualité) tandis que cette protéine s'exprime dans certains lots traités. Ainsi, dans les lots recevant le mélange GV, seulement deux rats dans chaque lot présentent une nette surexpression de la protéine acétylée, et les effets sont similaires dans le groupe TGV comme dans le groupe GVf. Par contre, l'expression de l'histone H4 acétylée est observée chez tous les rats appartenant aux lots traités avec des mélanges qui contiennent le BPA, et malgré la qualité médiocre du gel, elle ressort significative dans le cas de mélange ternaire GVB ($p < 0,05$). Dans le cas des mélanges binaires GB et VB, une surexpression est aussi enregistrée mais tous ces résultats sont à confirmer, et à compléter par l'étude de l'expression d'autres protéines histones acétylées ou diméthyles dans le tissu adipeux. Toutefois cette première analyse informe de la mise en place de mécanismes épigénétiques en lien avec un traitement des parents pas les xéno-hormones (Figure 14).

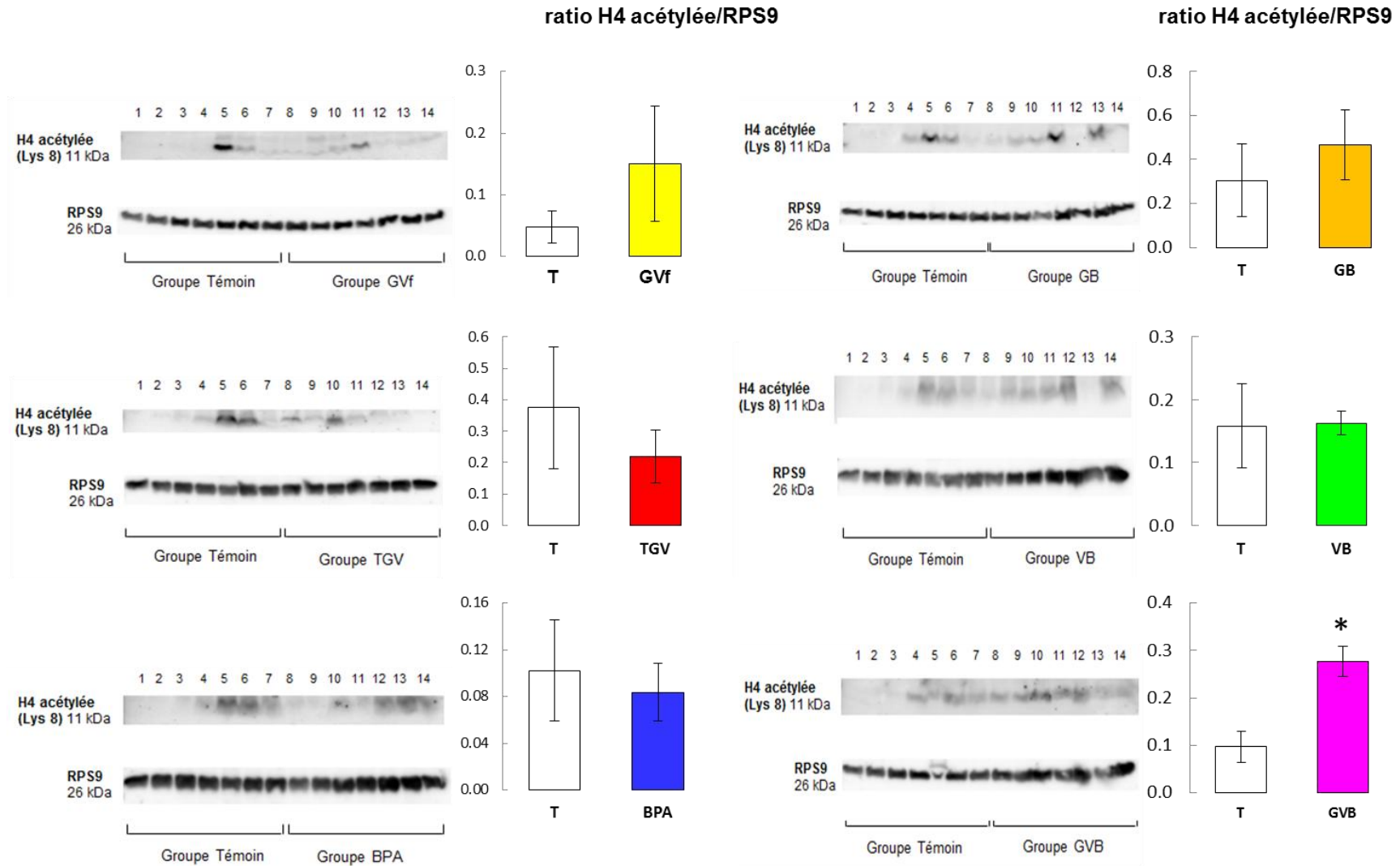


Figure 14 : Expression de l’Histone H4 acétylée (Lys 8) chez des femelles F2 dont les deux parents ont été exposés à des mélanges de xéno-hormones. Les résultats sont représentés par la moyenne \pm SEM (n = 6-7 rats/groupe).*, représente une différence significative entre les moyennes par rapport au groupe témoin avec $p < 0,05$ (Test t de student). Dépôt de 50 μ g de protéine sur gel: séparation sur gel d’agarose et transfert sur membrane (PVDF).

3. Conclusion et discussion

Notre étude *in vitro*, couplée à l'étude *in vivo*, montre que le tissu adipeux est une cible privilégiée des perturbateurs endocriniens allant des processus de différenciation adipocytaire à des mécanismes plus complexes impliquant des effets épigénétiques probablement à l'origine d'effets multi-générationnels.

Notre étude *in vitro* met en évidence les effets de la G et de la V sur la différenciation et l'activité endocrine des 3T3-L1 et souligne l'action plus prononcée des molécules lorsqu'elles sont administrées en mélange. Nos résultats montrent que les molécules affectent de manière indépendante leur capacité à mettre en réserve les TG (lipogénèse/lipolyse) et leur activité endocrine (synthèse de leptine). Dans nos conditions expérimentales, les xéno-hormones sont uniquement apportées pendant la phase d'induction de la différenciation adipocytaire. Malgré cette durée d'exposition brève, les changements provoqués durant ces premières 48 h du processus sont suffisants pour engendrer des effets persistants dans l'adipocyte mature, c'est-à-dire à J8.

En ce qui concerne les effets de la G sur la différenciation adipocytaire, nos résultats concordent avec ceux de la littérature où la G à 100 μM inhibe la prolifération des pré-adipocytes, bloque la différenciation, et active la lipolyse quand elle est administrée au début de la différenciation adipocytaire, c'est-à-dire durant les premières 72 h après l'induction de la différenciation ([Harmon & Harp 2001](#)). Notre étude, en accord avec celle de ([Rayalam et al 2007](#)) montre que ces effets anti-adipogéniques peuvent s'exprimer dès de faibles concentrations puisque la Génistéine (25 μM) administrée seule diminue significativement la synthèse des TG par les 3T3-L1. Selon Park et al, cet effet sur la lipogénèse est associé à une inhibition de l'activité de la Glycérol-3-phosphate déshydrogénase, et à la régulation transcriptionnelle de l'acide gras-synthase, de la lipoprotéine-lipase et de la leptine ([Park et al 2008](#)). Pourtant, dans nos conditions expérimentales, la G25 μM n'a pas d'effet sur la synthèse de leptine dans les 3T3-L1. Nos résultats vont dans le sens de ceux obtenus par Phrakonkham P. avec une dose de 100 μM . Ils peuvent s'expliquer par le fait que nous travaillons dans un modèle cellulaire où le milieu de culture contient un sérum déstéroïdé, à l'image de ce qui est fait lors des tests de E-screen pour s'affranchir de toute interaction avec des xéno-œstrogènes ([Phrakonkham et al 2008](#)).

La V administrée seule lors de la phase d'induction de différenciation n'a pas affecté la différenciation cellulaire des 3T3-L1 ni les capacités de l'adipocyte à synthétiser des TG ou de la

leptine, suggérant l'absence de régulation par des androgènes dans cette voie. En revanche, le mélange G+V produit un effet anti-adipogénique dès les premières 48h, et qui s'accroît avec le temps. Ce pouvoir anti-adipogénique dépend aussi des concentrations de la V. Cet effet est le même lors d'un traitement avec la G seule à plus forte dose (100 µM) obtenu dans les mêmes conditions de culture ([Phrakonkham et al 2008](#)) et pourrait être relié aux effets hormonaux des métabolites de la V. En effet, Bursztyka et al, montrent que la V chez le rat est métabolisée en six métabolites : M1, M2, M3, M4, M5 et M6, avec des propriétés anti-androgéniques décrites pour le M1 et M2 ([Bursztyka et al 2008](#)). Molina-Molina et al, confirment le caractère anti-androgénique de ces deux métabolites, mais montrent aussi que les deux métabolites M1 et le M2 sont des agonistes des récepteurs ER, avec une légère affinité au ERβ. Ceci pourrait expliquer l'amplification de l'effet anti-adipogénique de la G dans notre étude ([Molina-Molina et al 2006](#)).

L'effet de la génistéine est amplifié par l'addition de V lors des stades précoces de la différenciation adipocytaire, même à des concentrations très faibles (0,1 µM). De tels effets de mélanges sont décrits avec les flavonoïdes. Park et al, montrent qu'à des faibles doses en G, Quercétine (Q), et Resvératrol (R), il n'y a pas d'effet sur la différenciation ni sur l'activité endocrine des 3T3-L1, mais que la combinaison de ces molécules montre un effet anti-proliférateur et donc anti-adipogénique. ([Park et al 2008](#)). Dans nos conditions, l'activité endocrine de l'adipocyte n'est pas affectée par les molécules toutes seules à l'exception de l'œstradiol qui agit à un degré comparable à celui du mélange GV ayant la plus forte concentration en V. Ces effets résultent probablement d'une action de type stéroïdienne, Kristensen et al, ayant montré l'action stimulatrice de l'œstradiol et de la dexaméthasone sur la synthèse de leptine ([Kristensen et al 1999](#)).

En ce qui concerne l'augmentation de la synthèse de leptine dans les cellules exposées à l'œstradiol et au mélange G/V, il paraît improbable, compte tenu de la très courte demi-vie *in vitro* de l'ARNm de la leptine (2h) ([Leroy et al 1996](#)), que les effets notés à J8 résultent d'une activation transcriptionnelle directe par les traitements limitée aux deux premiers jours de différenciation. Ceci nous amène à penser que ces altérations s'opèrent à un stade critique du programme de maturation cellulaire et pourraient affecter de manière persistante certaines des fonctions endocriniennes, et par voie de conséquence, du tissu adipeux.

Notre étude *in vivo* dédiée à l'étude des mélanges de xéno-hormones montre qu'une exposition continue peut stimuler le développement du tissu adipeux sur la descendance non exposée. Une légère tendance à augmenter les taux sériques de la leptine dans les lots GVB et BPA est également

observée, bien que les résultats ne soient pas significatifs. Cela peut expliquer l'augmentation du poids corporel, car l'exposition aux xéno-hormones peut altérer l'homéostasie glucidique, en agissant sur les taux sériques de leptine ([Alonso-Magdalena et al 2010](#)) ([Wei et al 2011](#)). Ces résultats sont également en accord avec des études épidémiologiques, où des corrélations entre les concentrations de BPA dans des fluides biologiques avec l'augmentation de poids corporel ont été enregistrées ([Carwile & Michels 2011](#)).

Néanmoins, le suivi de l'évolution de poids corporel et la détermination de la masse grasse permettent de vérifier l'hypothèse de «programmation fœtale»: qui suggère qu'une exposition périnatale puisse être à l'origine des problèmes de santé à l'âge adulte en lien avec l'influence périnatale des xéno-hormones sur la différenciation et le développement de la masse grasse ([Heindel 2003](#)). Toutefois, dans nos conditions expérimentales, l'exposition continue aux xéno-hormones à de faibles doses n'a pas stimulé l'adipogénèse dans la F1 : la masse grasse étant même diminuée chez les rats mâles traités avec le mélange ternaire GVB. Ceci rappelle d'autres études sur le développement pour lesquelles les effets induits par une exposition néonatale disparaissent ou évoluent lorsqu'on se place dans des conditions d'exposition continue ([Hilakivi-Clarke et al 2001](#)). En F2, l'augmentation significative du poids corporel est corrélée à une augmentation de la masse adipeuse qui est légère mais statistiquement significative. Ce qui est en accord avec plusieurs études portant sur le développement de l'obésité suite à des expositions aux xéno-hormones ([Lassiter & Brimjoin 2008](#)) ([Miyawaki et al 2007](#)) ([Newbold 1995](#)) ([Penza et al 2006](#)) ([Rubin et al 2001](#)) ([Somm et al 2009](#)). Newbold et al, montrent qu'une exposition *post natale* à 1 µg/kg PC/j au DES provoque une augmentation de masse corporelle à l'âge adulte sans modifier la prise alimentaire ni l'activité physique, ce qui est en accord avec nos résultats ([Newbold et al 2005](#)).

L'analyse morphométrique du tissu adipeux en F2 confirme la mise en place de ce processus adipogénique qui porte sur la mise en réserve des adipocytes (augmentation du volume), en particulier pour les animaux issus des lots GVB et BPA. Cependant, même si cet effet sur le développement de la masse adipeuse à J100 est plus accentué chez les femelles, il n'est pas suffisamment élevé par rapport au témoin pour entraîner des élévations de taux de triglycérides et de leptine circulants.

En revanche, les premiers résultats concernant l'approche des marqueurs d'effets épigénétiques identifient une surexpression de l'histone H4 chez les animaux dont le traitement contient du BPA, et celle-ci pourrait être à l'origine d'effets multi-générationnels portant sur l'adipogénèse. Dans la

littérature, l'acétylation des histones H4 (Lys 8) sous l'action de l'acétyl-transférase (HATs) est aussi associée à une augmentation de la transcription de gènes oestrogéno-régulés ([Liu & Bagchi 2004](#)). Dans le même sens, une hyper acétylation des histones au niveau adipocytaire résulte d'une diminution de l'activité enzymatique de l'HDAC (histone déacétylase) et une augmentation de l'activité de HAT (acétyl transférase) ([Yoo et al 2006](#)).

L'action des perturbateurs endocriniens sur l'*épigénome* est étudiée depuis quelques années, le BPA provoque une augmentation d'expression des histones durant la prolifération cellulaire induite par les œstrogènes ([Zhu et al 2009](#)). Pourtant, dans nos conditions expérimentales, le BPA administré seul, ne semble pas avoir d'effet marqué sur l'expression de la H4 acétylée, cependant lorsqu'il est administré en présence de la G et/ou la V, une surexpression est enregistrée. Toutefois, nos résultats demandent à être confirmés par des répétitions et complétés par l'étude de l'expression d'autres histones pour permettre de conclure. A ce stade d'analyse on n'est pas en mesure de fournir une explication pour ce pouvoir additif, et à notre connaissance aucune étude de mélange de perturbateurs endocriniens n'a abordée la question d'effets multi-générationnels via une modification de l'acétylation des histones.

En conclusion, notre étude *in vitro* montre que les effets d'exposition à des mélanges des PE à des faibles doses, peuvent affecter la différenciation et l'activité endocrine du tissu adipeux, notamment la synthèse des TG et de la leptine, ce qui amène la question des risques liés aux mélanges de résidus. Cela suggère que les xéno-hormones peuvent être impliquées dans les processus obésogènes, en particulier lorsque l'exposition débute lors des stades précoces du développement du tissu adipeux et d'une manière continue.

Nos résultats *in vivo* montrent qu'une exposition chronique à des mélanges de xéno-hormones aux faibles doses, entraîne des effets sur l'évolution du poids corporel et de la masse grasse dans la deuxième génération non exposée. Ces effets sont associés à une augmentation du taux des histones H4 acétylées. Cela peut être relié à une diminution des HDACs, et dans ce cas, expliquer les effets multi-générationnels sur la surcharge pondérale par une stimulation de la différenciation adipocytaire, conformément à l'hypothèse de Yoo et al qui soutient que de tels effets soient à l'origine d'une plus grande différenciation adipocytaire ([Yoo et al 2006](#)). Néanmoins, cette première analyse demande à être complétée par une analyse des autres histones (H2A, H2B, H3), ainsi que par des mesures de l'activité enzymatique du HAT et HDAC. Le degré de méthylation au niveau de l'ADN du tissu adipeux périgonadique sera également étudié chez les mâles.

CHAPITRE 4 : PERTURBATION ENDOCRINIENNE ET GLANDES SALIVAIRES : IDENTIFICATION D'EFFETS MULTI-GENERATIONNELS D'UNE EXPOSITION CONTINUE DE COCKTAILS DE PE SUR LES SUBMANDIBULAIRES DE RAT

Les glandes salivaires ont un rôle physiologique de nature endocrine rarement pris en compte dans l'étude du mode d'action des perturbateurs endocriniens. Cependant, leur implication dans les mécanismes de fertilité (*via* l'EGF), du développement osseux (*via* la parotite), ou encore sur les modifications des préférences gustatives avec l'âge, les sècheresses buccales associées à des troubles hormonaux comme le diabète ou l'hypothyroïdie et l'existence d'un dimorphisme sexuel suggèrent qu'elles puissent être le site d'action de perturbateurs endocriniens. Dans ce sens, d'anciennes études rapportent des effets secondaires des premières pilules contraceptives sur la sphère buccale comparables à ceux qui apparaissent au cours de la grossesse, et dont on sait qu'ils sont la conséquence d'une variation du statut hormonal. Suite à ce constat, et compte tenu de l'importance conjointe de ces glandes en sensorialité, notre laboratoire a inclus l'étude des glandes salivaires dans ses programmes de recherches visant à identifier les effets multi-organes des perturbateurs endocriniens à faible dose selon une approche intégrative et interdisciplinaire développée dans le cadre de projets nationaux et transversaux (PNR-PE).

Dans ce contexte, une étude menée sur des animaux traités durant la période néonatale avec la génistéine et la vinclozoline ont mis évidence un ralentissement du développement morphologique de la glande submandibulaire chez la femelle ([Kouidhi et al 2012b](#)). Chez le mâle, ces modifications structurales s'accompagnent de changements des préférences gustatives, mais aussi de l'expression de gènes relatifs aux fonctions endocrines et exocrines des submandibulaires, en particulier chez les animaux exposés au mélange génistéine/vinclozoline [[\(Kouidhi et al 2012a\)](#) *article accepté en révision*].

De plus, parallèlement à ce travail de thèse, une deuxième étude portant sur les effets de l'exposition au BPA à l'âge adulte que nous avons présentée au chapitre 1 (étude effet-dose sur les préférences gustatives) a exploré les effets sur les trois glandes salivaires majeures (M Folia ; thèse de doctorat). Elle montre également des modifications structurales, en particulier sur la surface des acini selon la dose de traitement et en corrélation avec l'action sur les préférence au salé [[\(Folia et al 2012\)](#), *article accepté*].

Compte tenu du fait que la période néonatale est une période d'exposition critique au cours de laquelle s'effectuent des altérations du développement, mais aussi des programmations fœtales dont les effets apparaissent à terme, il semblait logique de penser que des mélanges de ces trois perturbateurs endocriniens pourraient aussi agir sur les glandes salivaires. C'est pour ces raisons que nous avons complété notre étude en explorant les effets sur la glande submandibulaire. Compte tenu des effets épigénétiques décelés sur le tissu adipeux, nous avons aussi considéré la génération F2 dans cette étude.

1. Modulation des taux sériques du facteur de croissance EGF chez les mâles et les femelles (F1 et F2)

Comme l'EGF est un facteur de croissance synthétisé majoritairement par la glande submandibulaire, et est impliqué dans divers mécanismes de régulation, tant au niveau local (épithélium buccal, morphogenèse des bourgeons gustatifs), que systémique (gonades, glandes mammaires, épithéliums glandulaires), une perturbation dans les concentrations sériques peut être révélatrice d'une action des perturbateurs endocriniens au niveau de la glande submandibulaire.

C'est pourquoi, dans un premier temps, nous avons évalué les taux d'EGF sériques chez les mâles et les femelles pour les deux générations.

1.1. Génération exposée depuis la conception (F1) :

Les taux sériques ont été évalués sur des animaux sacrifiés au stade immature (J25) et au stade adulte (J100), comme l'illustre la figure 1, les concentrations sériques en EGF évaluées chez des rats mâles et femelles témoins sont approximativement du même ordre, aussi bien au stade immature qu'à l'âge adulte, ce qui montre qu'il n'y a pas de dimorphisme sexuel au niveau des taux circulants. Toutefois, les taux circulants à l'âge immature (15-20 ng/mL) sont environ 30% plus faibles que les concentrations évaluées à l'âge adulte (25-30 ng/mL), ce qui est à mettre en relation avec le stade de maturité des animaux, les sécrétions d'EGF étant une caractéristique de la glande salivaire mature.

Une exposition continue aux perturbateurs endocriniens n'affecte pas de manière significative les taux circulants d'EGF, probablement en raison du nombre réduit d'animaux (n=6/lots). En effet, que ce soit au stade adulte ou immature, on note le même profil d'action entre mâle et femelle. Par exemple, les animaux du lot GB, mâles comme femelles, présentent des taux circulants légèrement plus faibles que ceux des lots témoins au stade immature, mais plus à l'âge adulte. Dans le même

sens, les animaux du lot GVf ont un taux circulant plus faible que ceux des lots TGV. De même une légère tendance de baisse est enregistrée chez tous les animaux des lots traités au BPA.

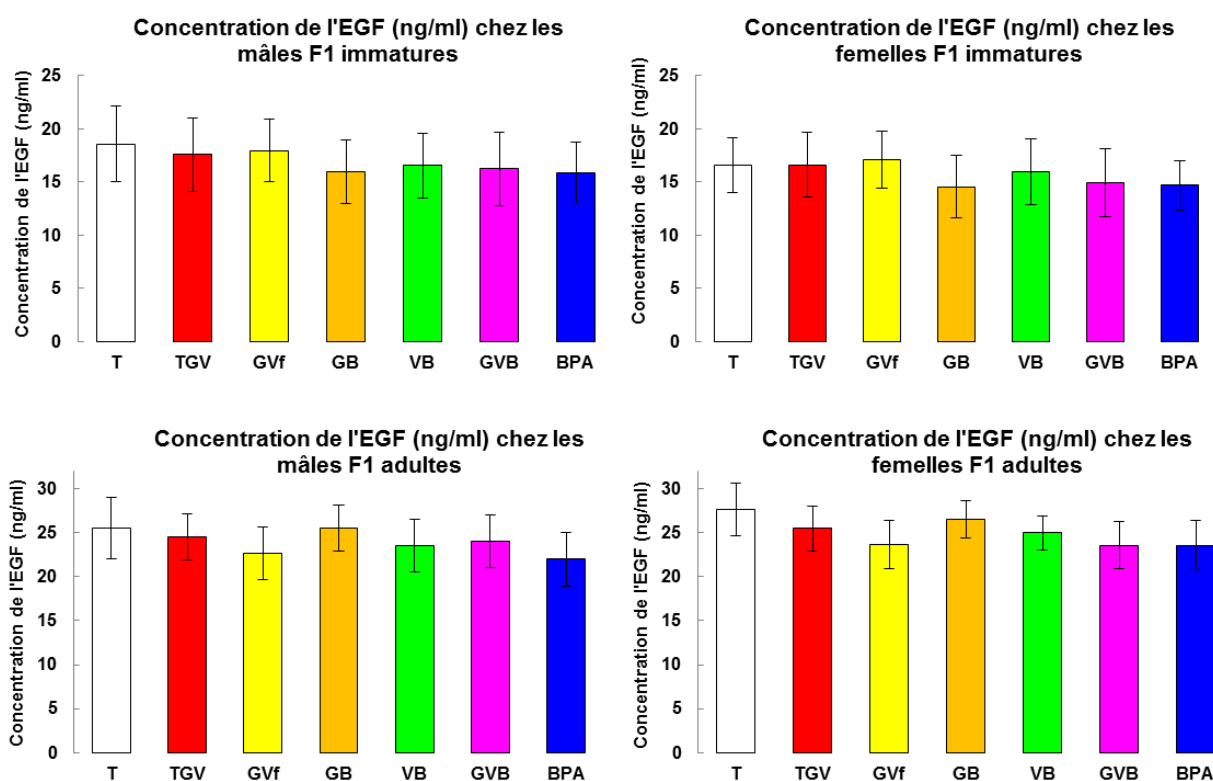


Figure 1 : Effets d'une exposition continue (*de la conception à l'âge adulte*) aux perturbateurs endocriniens seuls ou en mélanges sur les concentrations sériques de l'EGF chez les rats mâles et femelles F1 à l'âge immature et adulte. Les résultats sont représentés par la moyenne \pm SEM (n = 6 rats/groupe).

1.2. Génération non exposée (F2)

Dans le but de vérifier si notre exposition a engendré des effets multi-générationnels sur la glande salivaire submandibulaire, le dosage de l'EGF a été effectué, mais seulement sur les animaux adultes, aucun animal n'ayant été sacrifié au stade immature sur cette génération F2. Comme le montre la figure 2, aucune différence significative n'est révélée par l'analyse statistique des données. Cependant une tendance à baisser les concentrations de l'EGF est enregistrée dans les lots VB et BPA chez les mâles, tandis que chez les femelles, les taux sériques sont légèrement supérieurs dans tous les lots traités, sauf dans le lot TGV, pour lequel la dose de vinclozoline est plus élevée.

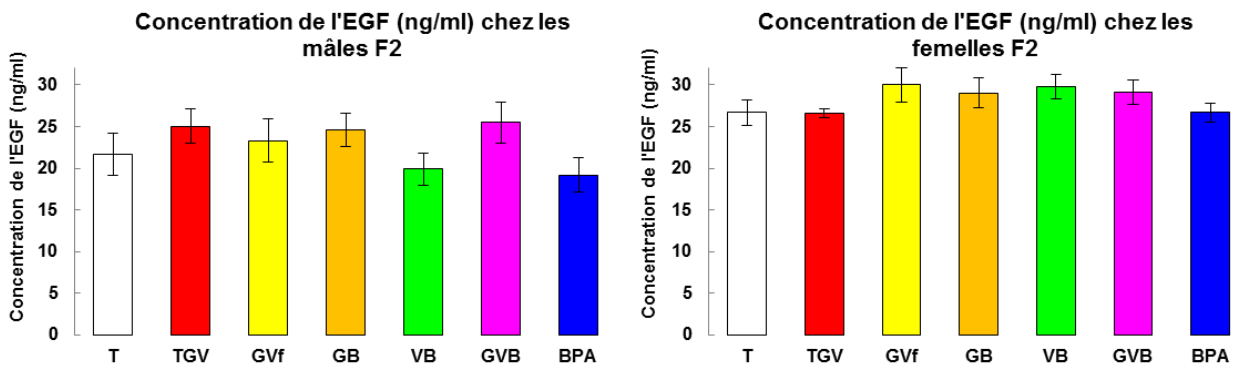


Figure 2 : Effets sur les concentrations sériques de l'EGF chez les rats mâles et femelles de la F2 à l'âge adulte dont les deux parents ont été exposés aux perturbateurs endocriniens seuls ou en mélanges. Les résultats sont représentés par la moyenne \pm SEM (n = 6 rats/groupe).

Même si l'analyse statistique ne valide pas ces résultats, ces données semblent sensées puisque cette série d'animaux présente des taux sériques comparables à ceux des adultes de la génération précédente (25-30 ng/mL), et ceci chez les mâles comme chez les femelles.

Par conséquent, nous avons poursuivi nos investigations en explorant en priorité l'étude des effets sur les glandes submandibulaires chez le mâle par une approche ciblée en PCR.

2. Modulation de l'expression des mRNA de gènes marqueurs des sécrétions salivaires et/ou hormono régulés chez le mâle exposé (F1)

L'étude de l'expression des gènes par PCR en temps réel a été choisie pour réaliser une approche ciblée des fonctions sécrétrices des glandes salivaires en lien avec l'expression des récepteurs aux hormones sexuelles. Pour cela, notre analyse moléculaire a porté sur trois types de sondes :

- Le facteur de croissance EGF, afin d'établir si les dosages sériques sont le reflet de l'activité des glandes submandibulaires.
- Des protéines gustatives choisies pour leur régulation par les hormones sexuelles.
- Les récepteurs aux estrogènes (ER α et β), aux androgènes (AR) et à la progestérone (PR), afin de préciser la nature des effets hormonaux.

2.1. Expression des mRNA du facteur EGF

2.1.1. Chez les rats immatures (J25)

Les mRNA du facteur de croissance EGF sont exprimés dans les glandes submandibulaires de rats immatures, avec un Ct moyen de 22. Les résultats ont été exprimés par rapport à l'expression du gène de référence RPS9, qui présente un niveau d'expression analogue (Ct = 21). La figure 3

représente le ratio d'expression « Gène d'intérêt/Gène de référence » dans les lots traités par rapport à celui obtenu dans le lot témoin. L'échelle étant en base Log, le niveau du témoin est 0 et correspond donc à la ligne de base et n'est donc pas affiché sur la figure.

Dans le cas présent, les traitements n'influencent pas l'expression des mRNA de l'EGF de manière significative pour un seuil de significativité de $p < 0,05$. Toutefois, selon l'analyse de variance après randomisation par le logiciel REST, l'inhibition observée dans le lot VB est proche du seuil de significativité ($p = 0,092$). L'incorporation du BPA dans le mélange ne potentialise pas cet effet, au contraire, puisque la diminution de l'expression dans le lot GVB n'est pas différente de celle du lot témoin.

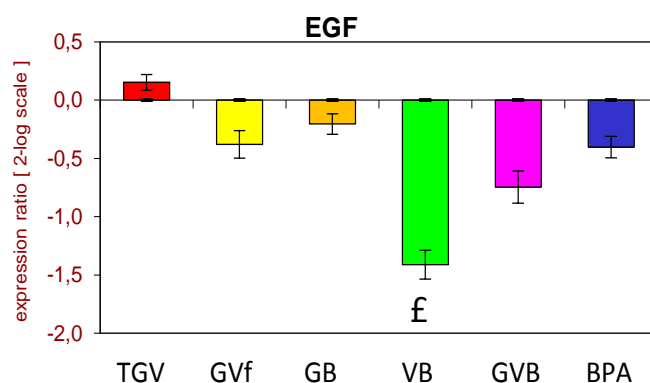


Figure 3: Expression du facteur EGF dans les glandes submandibulaires de rats mâles F1 immatures (J25) exposés depuis la conception via la mère à des PE. Les valeurs sont représentées par les moyennes \pm écart type des ratios d'expression de ct EGF/RPS9 dans chaque lot traité par rapport au ratio d'expression de Ct dans le lot témoin. Les données font l'objet d'une extrapolation à un grand nombre d'échantillons par randomisation. Une analyse de variance (Anova) suivie d'une comparaison des moyennes identifie les groupes différents du témoin (* : $p < 0,05$; £ : $p > 0,1$).

2.1.2. Chez les rats adultes (J100)

Chez les témoins, l'EGF s'exprime avec un Ct comparable à celui qui avait été relevé au stade immature. Cependant, l'exposition chronique en perturbateurs endocriniens semble affecter différemment l'expression de l'EGF selon la composition du mélange (Figure 4). En effet, l'induction de l'EGF par un traitement au mélange GV devient hautement significative lorsque la teneur en vinclozoline dans le mélange augmente (lot TGV ; $p < 0,01$) ; d'autre part, l'importante répression observée dans les autres lots au stade immature est levée au stade adulte. A ce stade, le BPA administré seul stimule fortement l'expression de l'EGF, à un degré équivalent à ce qui est observé dans le lot TGV ($p < 0,01$).

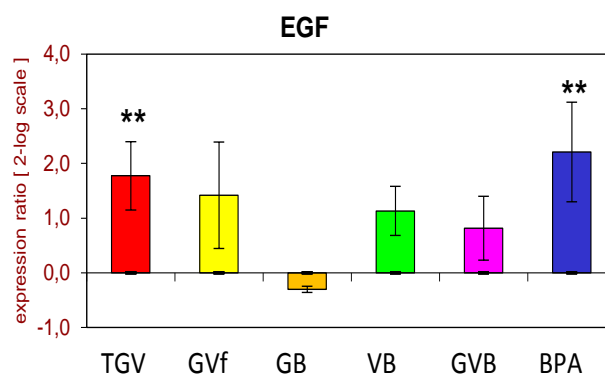


Figure 4: Expression du facteur EGF dans les glandes submandibulaires de rats mâles F1 adultes (J100) exposés depuis la conception à des PE. Les valeurs sont représentées par les moyennes \pm écart type des ratios d'expression de Ct EGF/RPS9 dans chaque lot traité par rapport aux ratios d'expression de Ct dans le lot témoin. Les données font l'objet d'une extrapolation à un grand nombre d'échantillons par randomisation. Une analyse de variance (Anova) suivi d'une comparaison des moyennes identifie les groupes différents du témoin (* : $p < 0,05$; ** $p > 0,01$).

2.2. Expression des mRNA des récepteurs hormonaux

L'expression des récepteurs hormonaux au niveau de la glande submandibulaire, est également étudiée chez l'adulte afin de préciser la nature de l'effet hormonal des mélanges.

Au stade adulte, nous n'avons pas pu détecter de mRNA pour les gènes des récepteurs aux estrogènes ER α et ER β (Ct >31), tandis que les récepteurs aux androgènes et à la progestérone sont bien exprimés (Ct <20) chez les témoins. Dans les lots traités, l'expression des récepteurs aux androgènes est surexprimée seulement chez les rats exposés au GVf tandis que l'expression des récepteurs à la progestérone est sélectivement augmentée chez les animaux exposés au BPA ($p < 0,05$) (Figure 5).

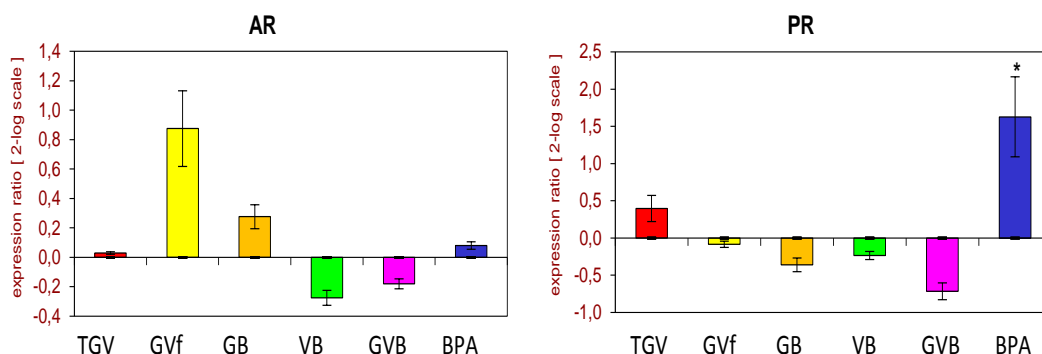


Figure 5: Expression des mRNA du récepteur aux androgènes (AR) et à la progestérone (PR) dans les glandes submandibulaires des rats mâles F1 adultes (J100) exposés depuis la conception à des PE. Les valeurs sont représentées par les moyennes \pm écart type des ratios d'expression de Ct AR ou PR /RPS9 dans chaque lot traité par rapport aux ratios d'expression de Ct dans le lot témoin. Les données font

l'objet d'une extrapolation à un grand nombre d'échantillon par randomisation. Une analyse de variance (Anova) suivi d'une comparaison des moyennes identifie les groupes différents du témoin (* : $p < 0,05$).

Au regard de ces données, l'expression de l'EGF n'apparaît pas corrélée à celle du récepteur AR, mais plutôt à celle du récepteur PR.

2.3. Expression mRNA des protéines gustatives

Parmi les protéines sélectionnées, certaines sont connues pour être régulées par les androgènes, comme les kallibréines et l'amylase, tandis que les autres ont été sélectionnées pour leurs sensibilités aux œstrogènes. La régulation hormonale de la gustine n'est encore pas très bien décrite.

2.3.1. Chez les rat immatures (J25)

Au stade immature, la gustine, encore appelée Anydrase Carbonique 6 (AC6) et la Mucine 10 (Muc 10) sont bien exprimées chez les témoins (Ct de 16 et 15 respectivement), au même titre que la kallibréine 1 (KLK1 ; Ct=17). En revanche, la Cystatine C (Cyst C), la superoxyde dimutase (SOD1) et la Glutathion peroxydase (Gpx1) sont moins bien exprimées, leurs Ct étant de l'ordre de 22, la kallibréine 3 (KLK3) étant la moins bien exprimée (Ct= 27) (données non montrées).

L'expression de l'amylase 1 (Amyl1) a aussi été étudiée. Cependant, les résultats ne sont pas présentés ici car ils sont inexploitable en raison d'une grande variabilité qui pourrait traduire un polymorphisme génétique pour cette enzyme. En effet, certains animaux présentaient un Ct élevé (> 25) et d'autres un Ct beaucoup plus faible, de l'ordre de 15. Elle a été mesurée systématiquement, mais les données nécessitent d'être consolidées par de nouvelles mesures et elles n'ont donc pas été prises en compte dans cette étude chez les F1.

La figure 6 rapporte les effets de cette même exposition précoce sur l'expression des mRNA correspondants aux protéines salivaires que nous avons appelé « gustatives » parce qu'elles interviennent plus ou moins directement dans les processus gustatifs.

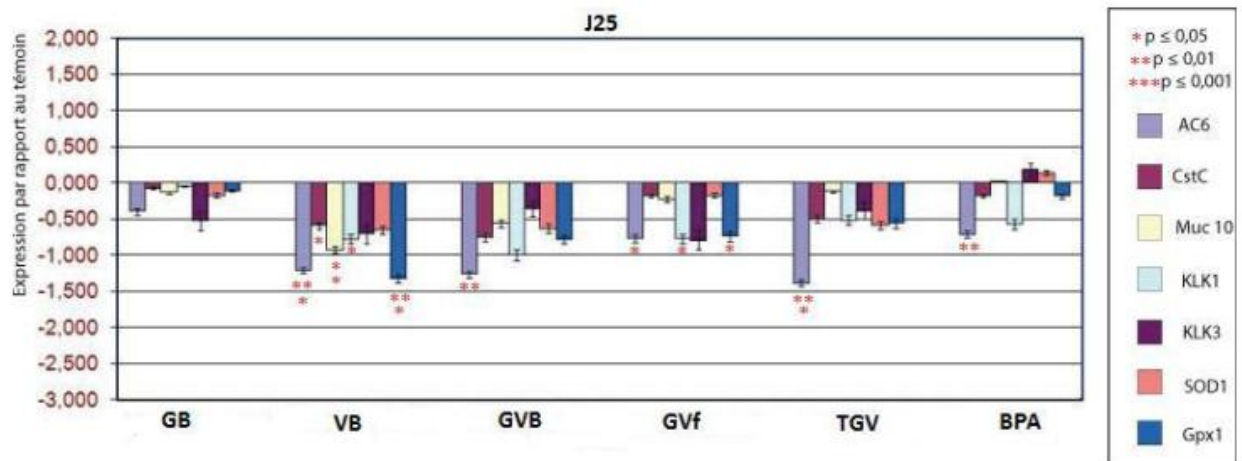


Figure 6 : Expression du facteur EGF dans les glandes submandibulaires de rats mâles F1 immatures (J25) exposés depuis la conception via la mère à des PE. Les valeurs sont représentées par les moyennes \pm écart type des ratios d'expression de Ct EGF/RPS9 dans chaque lot traité par rapport aux ratios d'expression de Ct dans le lot témoin (n=8). Les données font l'objet d'une extrapolation à un grand nombre d'échantillon par randomisation. Une analyse de variance (Anova) suivi d'une comparaison des moyennes par rapport aux témoins est réalisée par le logiciel REST® (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

D'une manière globale, à J 25, tous les gènes sont réprimés par les traitements, cependant on note des différences de réponse selon les protéines et selon les traitements.

En premier lieu, il apparaît clairement que la gustine (AC6) est significativement réprimée dans les lots : VB ($p < 0,001$), GVB ($p < 0,01$), GVf ($p < 0,05$), TGV ($p < 0,001$), BPA ($p < 0,01$) sauf dans le lot exposé au mélange binaire GB, tandis que la Superoxyde dismutase (SOD1) n'est jamais affectée.

L'expression des autres protéines varie selon la composition du mélange : alors que dans les lots traités par le BPA, seul ou en présence de génistéine (GB), les expressions des protéines testées sont peu ou pas affectées, la co-exposition du BPA avec la vinclozoline, (lot VB) entraîne la répression générale des protéines testées, et plus particulièrement de la gustine et de la glutathion peroxydase ($p < 0,001$), et à un degré moindre celle de la Mucine 10 ($P < 0,01$), de la Cystatine C et de la Kallitréine 1 ($p < 0,05$). Le fait d'ajouter la Génistéine au mélange (lot GVB) ne change pas le profil d'expression, mais diminue seulement le degré de significativité.

En ce qui concerne les deux lots traités par le mélange génistéine et vinclozoline, nous observons une inhibition hautement significative de la gustine dans le lot TGV ($p < 0,001$) par rapport au lot GVf. Cependant, ce lot GVf se distingue clairement puisque, en plus de la gustine, sont réprimées aussi les expressions de la KLK1 et de la KLK3 ($p < 0,01$).

A noter que l'expression des kallibréines 1 (KLK 1) et 3 (KLK3) et celle de la SOD 1 sont significativement diminuées seulement chez les rats exposés aux mélanges binaires contenant la faible dose de vinclozoline, *i.e.* les lots VB et GVf ($p < 0,05$). Il en est de même pour l'expression de Gpx 1 mais, l'effet est significativement plus marquée dans le lot VB ($p < 0,001$) que dans le lot GVf ($p < 0,05$).

Ces résultats suggèrent que la G puisse s'opposer à l'action du BPA. A l'inverse, presque tous les gènes sont diminués dans le lot VB, ce qui suggère une synergie entre V et BPA. Curieusement, les effets sont plus forts en présence de faible dose de V (GVf) qu'avec une forte dose (TGV).

2.3.2. Chez les rats adultes (J100)

A l'âge adulte, les niveaux d'expression des gènes d'intérêt chez les témoins sont identiques à ceux du stade immature sauf pour le gène de la KLK1 dont le Ct passe de 15 à 12 et celui de la KLK3 qui passe de 27 à 19, traduisant là l'influence du stade de maturation.

Contrairement à l'âge immature, nos traitements ont globalement moins d'effet sur l'expression de la plupart des gènes. Cependant, une répression dans l'expression de la gustine (AC6) est enregistrée dans tous les lots, mais elle est particulièrement importante et significative dans le lot BPA ($p < 0,001$). De même, pour la kallibréine 3 (KLK3) contrairement qu'à l'âge immature, nos traitements entraînent une stimulation dans l'expression mais les résultats ne sont pas significatifs.

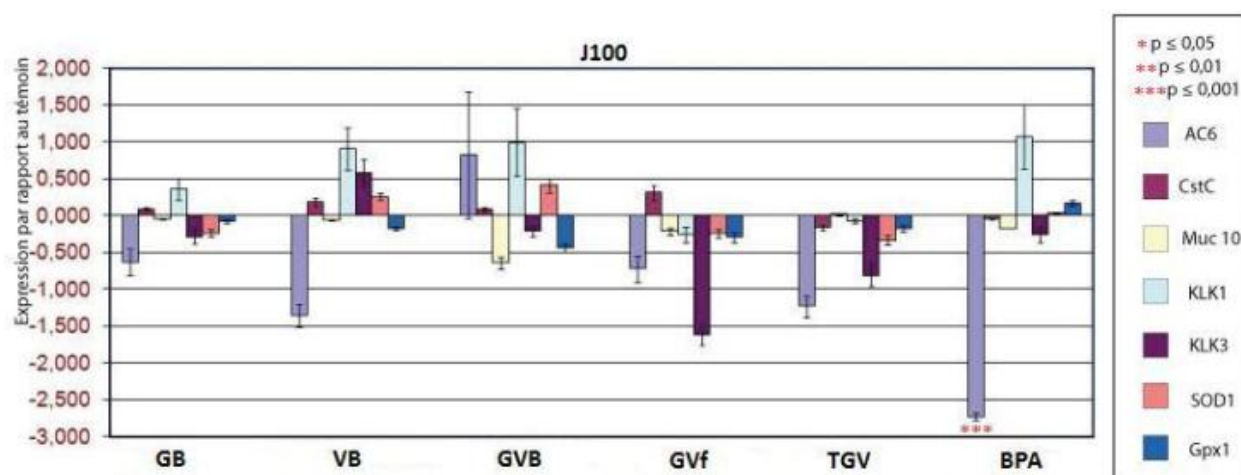


Figure 7 : Expression des gènes qui codent pour les protéines salivaires dans les glandes submandibulaires de rats mâles F1 adultes (J100) exposés depuis la conception à des PE. Les valeurs sont représentées par les moyennes \pm écart type des ratios d'expression de Ct EGF/RPS9 dans chaque lot traité par rapport aux ratios d'expression de Ct dans le lot témoin. Les données font l'objet d'une extrapolation à un grand nombre d'échantillon par randomisation. Une analyse de variance (Anova) suivi d'une comparaison des moyennes par rapport aux témoins est réalisée par le logiciel REST[®] (***) : $p < 0,001$.

3. Morphométrie des organes sécréteurs salivaire chez le mâle F1 adulte

Selon la littérature, une modification dans la morphométrie peut modifier ou pas la fonction sécrétrice de la glande salivaire, mais dans la mesure où la littérature rapporte que des modifications d'expression de facteurs de croissance ou d'autres protéines salivaires comme l'amylase, s'accompagnent souvent d'une modification des structures sécrétrices, et compte tenu de l'induction de l'EGF dans deux lots de traitement, nous avons complété cette étude chez le mâle adulte par une étude morphométrique des glandes submandibulaires.

Une analyse semi-quantitative, nous permet de comparer les structures des glandes submandibulaires à partir de coupes histologiques. Cette analyse consiste à mesurer la surface des canaux excréteurs, le nombre de GCT, la surface totale et moyenne des GCT, la surface totale et moyenne des acini ainsi que leur nombre.

La figure 8 présente l'aspect histologique des coupes de glandes salivaires après coloration au trichrome de Masson. On identifie clairement chez le témoin les structures classiques d'une submandibulaire de rat adulte, avec des GCT bien développés (blanc) insérés dans un tissu d'acini séreux (rosé). L'observation au microscope semble montrer des altérations structurales dans la plupart des lots, et seul le lot GVB présente des coupes comparables à celles du témoin. A l'inverse, les GCT notamment semblent déformés dans certains lots, en particulier dans le lot BPA. Cependant, il faudrait poursuivre par une approche en microscopie électronique pour visualiser des effets au niveau cellulaire.

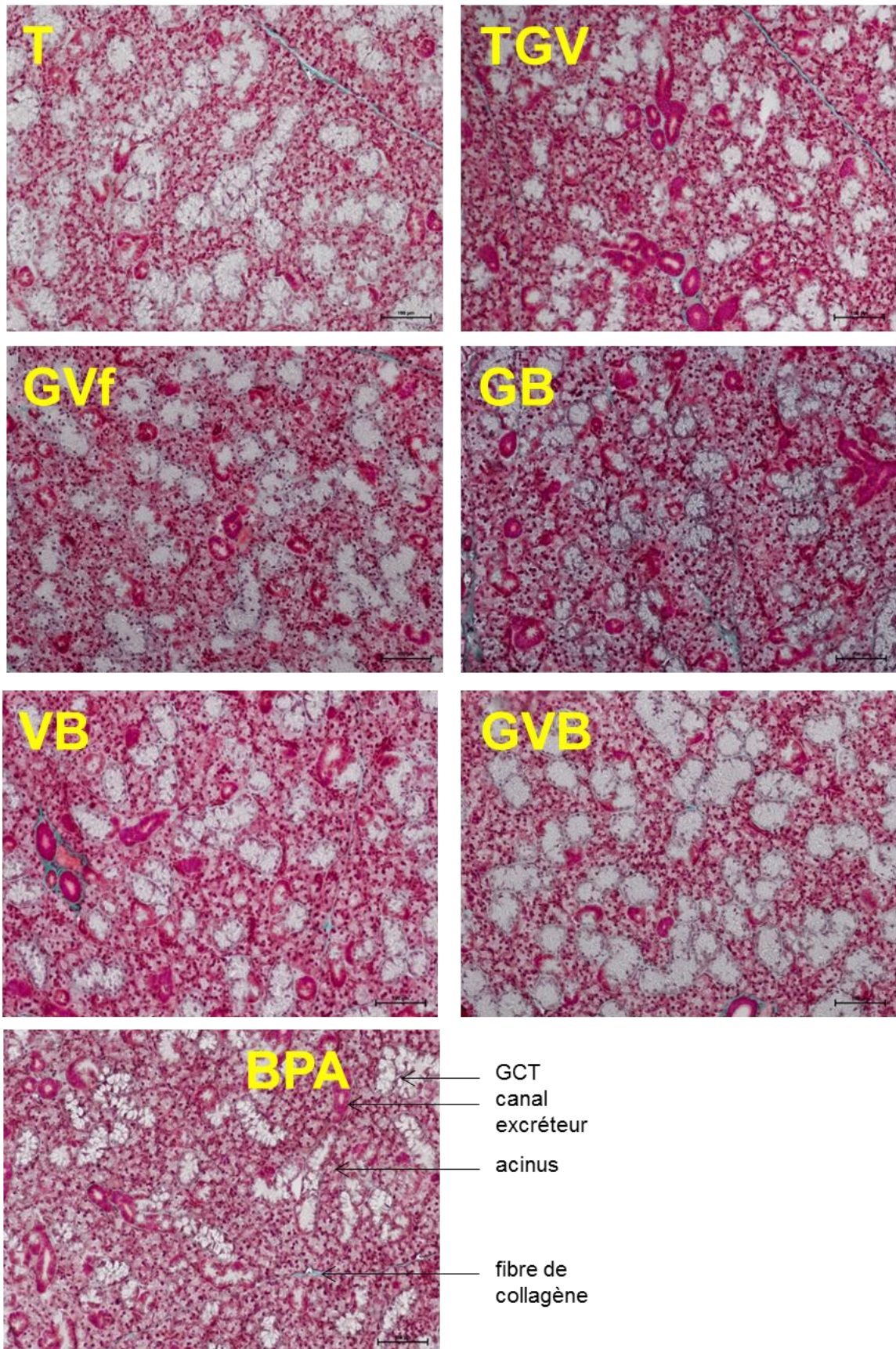


Figure 8 : Effets d'une exposition continue (*de la conception à l'âge adulte*) aux perturbateurs endocriniens sur les structures histologiques de la glande salivaire submandibulaire chez les rats mâles de la F1 à l'âge adulte (grossissement x10 Coloration Trichrome de Masson).

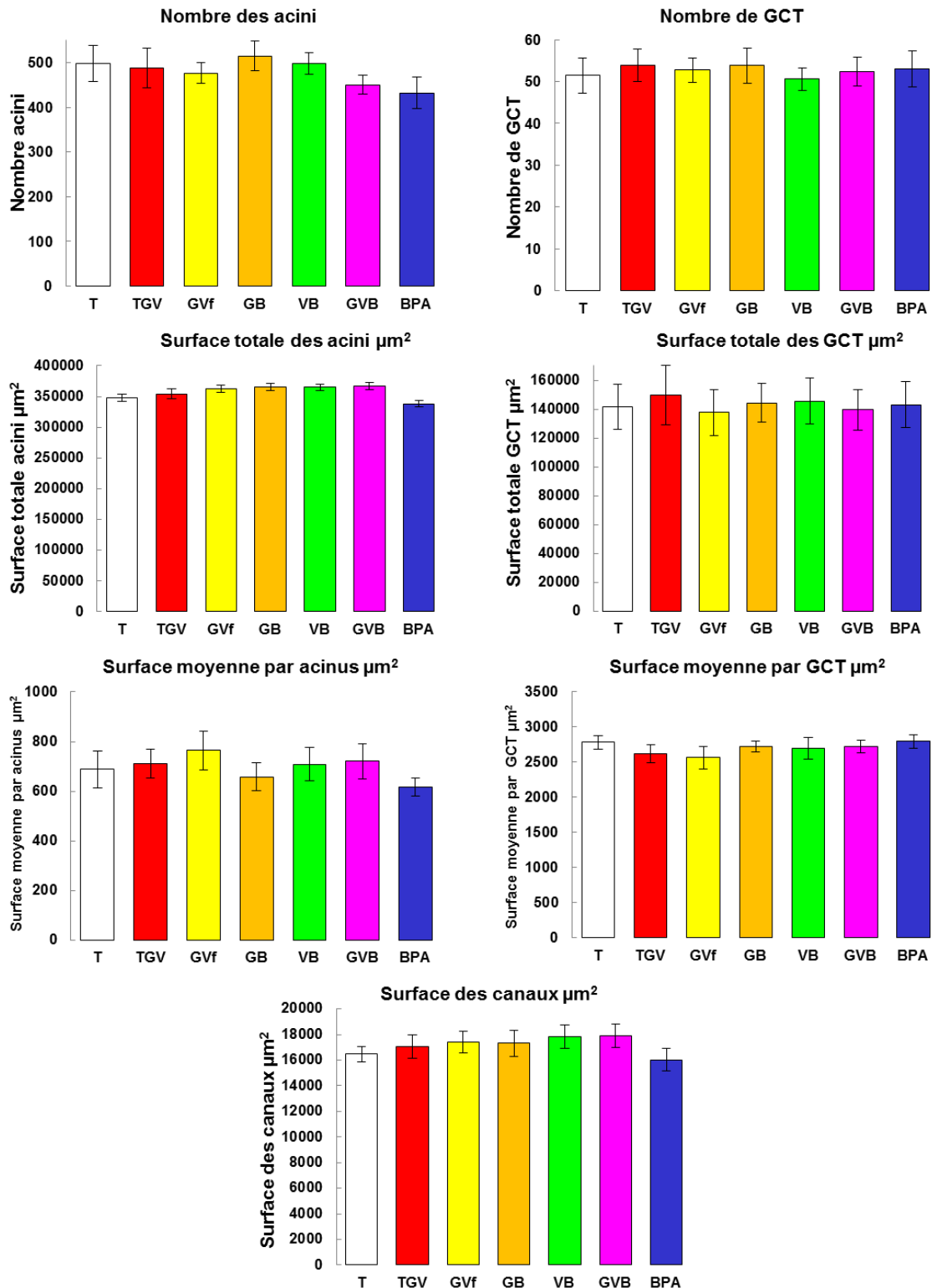


Figure 9: Effets d'une exposition continue (*de la conception à l'âge adulte*) aux perturbateurs endocriniens seuls ou en mélange sur la morphométrie de la glande salivaire submandibulaire chez les rats mâles adultes F1. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm SEM (n=6 rats/lot).

Lors de la quantification par analyse d'image, aucun effet significatif n'a été enregistré quel que soit le lot traité et quels que soient les paramètres mesurés. Cependant, on peut noter une légère tendance à la baisse dans la surface moyenne par acinus chez les animaux exposés au BPA et au GB,

qui est peut être dûe à une diminution dans le nombre des acini et qui est en accord avec les observations et l'impression données par les photos. Il en est de même pour le lot GVf, pour lequel la surface moyenne des acini tend à augmenter. L'analyse d'animaux supplémentaires est en cours pour affiner cette étude et confirmer ces résultats. Toutefois, contrairement à ce qu'on attendait, on n'observe pas d'hyperplasie ni d'hypertrophie très marquée au niveau des GCT qui pourrait être associée à la surexpression de l'EGF observée dans les glandes des lots TGV et BPA (Figure 9).

En résumé, l'analyse des glandes submandibulaires chez le rat mâle fait apparaître de légers effets sur l'aspect histologique à l'âge adulte qui nécessitent d'être consolidées par l'exploration des effets sur des rats surnuméraires. Cependant, l'approche moléculaire permet d'identifier des réponses différentes selon le stade de maturité et selon la nature des cibles qui invitent également à compléter cette étude par une exploration des effets sur l'aspect histologique des animaux immatures. Concernant une identification des effets propres à la composition du mélange, seule une étude complète permettra de confirmer les premiers résultats qui tendent à montrer des effets spécifiques en fonction des cibles biologiques. On peut cependant conclure que les effets du BPA seuls sont souvent le plus significatifs alors que le mélange ternaire est moins actif. Ces données vont dans le sens des résultats obtenus aux chapitres précédents.

Compte tenu des variabilités observées dans les taux sériques d'EGF, nous avons cependant poursuivi par une étude des effets sur la progéniture de ces animaux (F2).

4. Modulation de l'expression des mRNA de gènes marqueurs des sécrétions salivaires et/ou hormono régulés chez le mâle adulte non exposé (F2)

Afin de vérifier si notre exposition a des effets multi-générationnels, l'étude moléculaire a été entreprise sur les glandes submandibulaires des rats mâles de la génération F2. Cette approche est d'autant plus justifiée que les dosages sériques de l'EGF ont donné des profils d'induction avec des fluctuations entre les lots plus marqués chez les mâles (Cf. figure 2). Selon la même stratégie d'approche que pour la F1, une batterie de gènes qui ont un lien direct ou indirect avec les processus de la gustation et d'expression d'EGF sont évalués.

4.1. Expressions des mRNA du facteur EGF et des récepteurs hormonaux

Les mâles adultes témoins présentaient le même degré d'expression du facteur EGF que ceux de la génération F1 (données non montrées). Comme l'illustre la figure 10, l'expression des mRNA du

facteur de croissance EGF n'est pas significativement différente d'un lot à l'autre. Aucune corrélation ne peut être vraiment établie avec les taux d'EGF sériques relevés initialement. L'expression des récepteurs sexuels a été également évaluée (AR, ER α , ER β , et PR). Etant donné que l'expression de l'ER α , ER β , et PR est très tardive en PCR (>30 cycles), traduisant une très faible expression, seuls les résultats concernant l'expression des mRNA du récepteur AR (Ct<22) ont été retenus. Comme l'illustre la figure 10, les niveaux d'expression de l'AR ne sont pas significativement différents d'un lot à l'autre. Cependant, mis à part le lot GVf, nous pouvons constater une bonne similitude en entre les profils d'expression du facteur EGF et du récepteur AR.

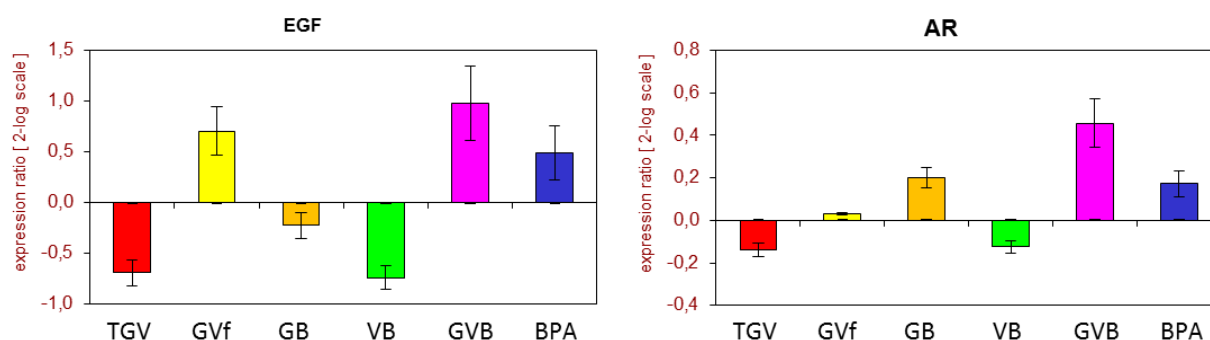


Figure 10 Expression du facteur EGF et du récepteur AR dans les glandes submandibulaires de rats mâles F2 adultes (J100) issus des parents F1 exposés. Les valeurs sont représentées par les moyennes \pm écart type des ratios d'expression de Ct EGF/RPS9 dans chaque lot traité par rapport aux ratios d'expression de Ct dans le lot témoin. Les données font l'objet d'une extrapolation à un grand nombre d'échantillon par randomisation. Une analyse de variance (Anova) suivi d'une comparaison des moyennes afin d'identifier les groupes différents du témoin ($p < 0,05$).

4.2. Expression des mRNA des protéines gustatives

La figure 11 illustre le comportement des protéines salivaires au sein des différents lots. L'expression de la gustine, l'amylase, la cystatine C, ne varie pas de manière significative entre les différents lots. Par contre, l'expression de la KLK3 et de la mucine 10 est significativement augmentée dans le lot GVf ($p < 0,05$) tandis que l'expression de la KLK1 est réprimée dans les lots ayant reçu du BPA, avec une tendance dans le lot VB, et à un degré significatif dans les lots BPA, GB et GVB.

Par ailleurs, nous pouvons aussi relever quelques cohérences dans les profils d'action obtenus : alors que la gustine et l'amylase ont chacune un profil singulier qui ne permet pas de soupçonner des mécanismes de régulations communs à celui des autres protéines, nous observons un même profil

d'expression entre les deux kallicroéines (androgénorégulées) et un même profil d'expression entre la Mucine 10 et la Cystatine C, qui sont plutôt œstrogène-sensibles. L'étude de l'expression de deux peroxydases (œstrogènes sensibles) est en cours.

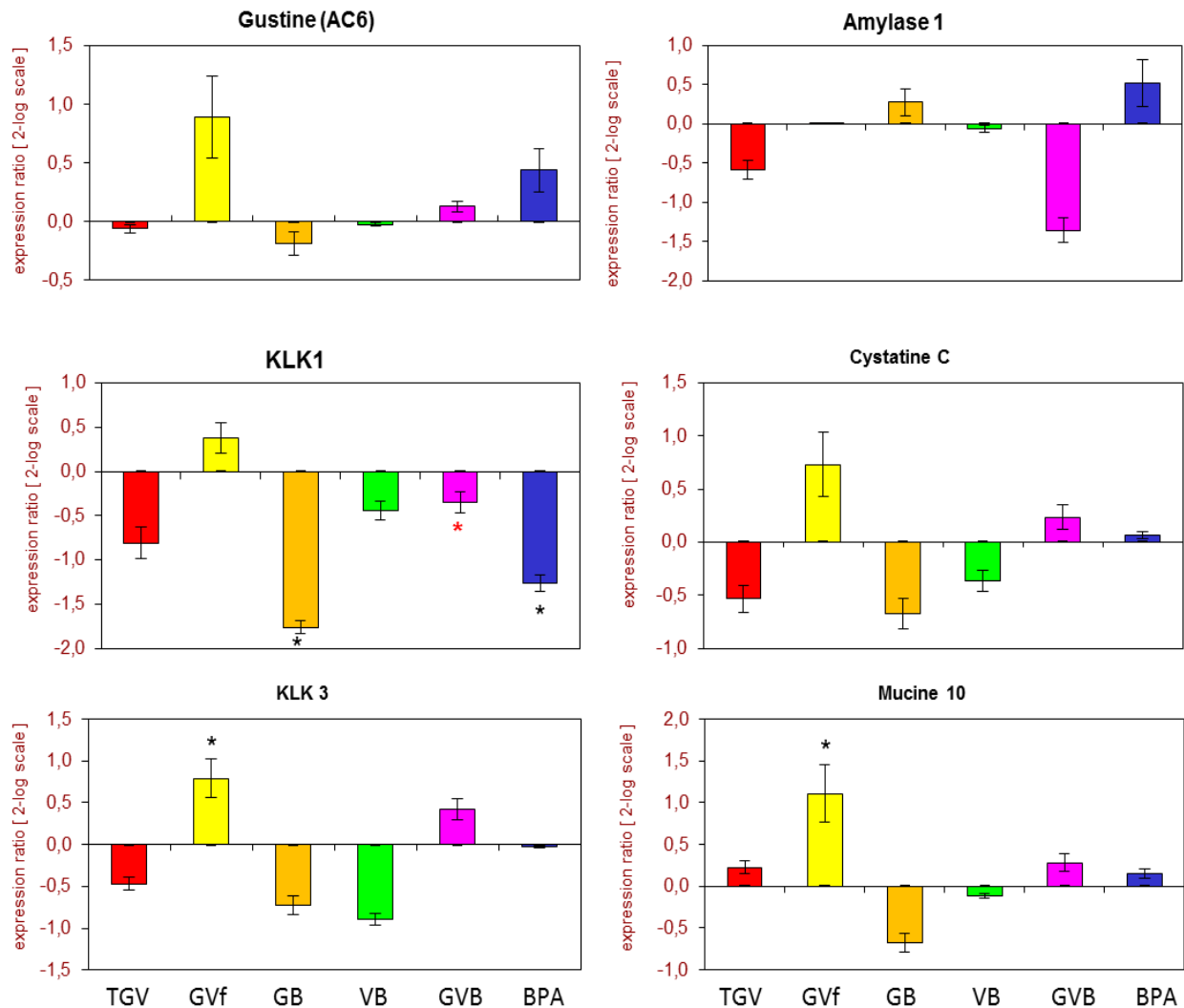


Figure 11 : Expression des gènes codant pour les protéines salivaires chez les mâles adultes de la F2 dont les deux parents ont été exposés aux perturbateurs endocriniens seuls ou en mélange. Les valeurs sont représentées par les moyennes \pm écart type des ratios d'expression de Ct EGF/RPS9 dans chaque lot traité par rapport aux ratios d'expression de Ct dans le lot témoin. Les données font l'objet d'une extrapolation à un grand nombre d'échantillon par randomisation. Une analyse de variance (Anova) suivi d'une comparaison des moyennes identifie les groupes différents du témoin (* : $p > 0,05$; ** : $p > 0,1$).

En résumé, les rats de la génération F2 issus de parents exposés toute leur vie jusqu'à l'âge adulte, mais eux même jamais exposés aux PE ne répondent pas systématiquement à l'image des rats témoins lorsqu'on considère l'expression de marqueurs moléculaires au niveau des sécrétions

endocrines et exocrines des glandes salivaires. Les effets observés sur l'expression des KLK s'avèrent plus marqués que ceux observés sur la génération F1, traduisant une nouvelle fois la possibilité de phénomènes épigénétiques. Cette étude est en cours et il faut attendre les résultats de l'analyse histologiques pour conclure.

5. Conclusion générale et discussion

Cette étude sur les glandes salivaires identifie des effets de perturbateurs endocriniens sur deux générations, l'une exposée depuis la conception, et sur la génération suivante qui est non exposée, traduisant ainsi des effets multi-générationnels.

Nos résultats viennent compléter les données obtenues au laboratoire quant à la sensibilité de la glande salivaire submandibulaire à des perturbateurs endocriniens (W Kouidhi, thèse de doctorat) : Les effets d'une exposition précoce (gestation/lactation), ([Kouidhi et al 2012b](#)) [([Kouidhi et al 2012a](#)) *article accepté*] mais aussi d'une exposition plus tardive (sevrage –adulte) à de faibles doses de génistéine et de vinclozoline, seules ou en mélange, avaient identifié des effets sur la morphogenèse, l'expression des récepteurs hormonaux, des facteurs de croissance et des protéines que nous appelons « gustatives ». Ces effets pourraient être opposés en fonction de l'âge (*immature vs adulte*), du sexe (*mâles ou femelles*), et de la fenêtre d'exposition (*in utero ou continue*).

Les effets étaient plus marqués lors de l'exposition au mélange GV. Ces conditions d'exposition ont été reprises dans notre étude au travers du mélange noté TGV, qui nous a servi de lot de référence. Notre étude permet de comparer les effets obtenus au cours de ces deux expositions avec une exposition continue et montrent encore des effets différents. Par exemple, l'expression du facteur EGF était induite au stade J25 et totalement réprimée à l'âge adulte chez des mâles exposés *in utero* et pendant la lactation au mélange TGV. Dans notre étude, les mâles F1 adultes tendent à surexprimer l'EGF dans le lot TGV, montrant ainsi qu'une exposition continue à ce mélange permet de maintenir l'effet inducteur.

D'une manière globale, nous notons aussi qu'une diminution de la teneur en vinclozoline dans le mélange ne se traduit pas toujours par une atténuation des effets. Quoiqu'il en soit, notre étude valide une nouvelle fois la glande salivaire comme une cible très sensible à de faibles doses de PE, et souligne les effets majeurs du BPA

Dans notre étude, une sous-expression des gènes : gustine (AC6), mucine 10 (Muc 10), kalllicréines (KLK 1, KLK3), superoxyde dismutase (SOD 1), peroxydase (Gpx 1) est enregistrée chez les mâles à l'âge immature. Cette sous-expression peut entraîner des modifications de perceptions gustatives, mais aussi, des pathologies au niveau de la cavité orale, car ces gènes codent pour des protéines qui ont des propriétés antiseptiques. Dans la littérature et chez les modèles animaux où l'hypofonction salivaire est provoquée par une exérèse des trois glandes salivaires, on observe des modifications pathologiques sur les muqueuses qui résultent d'une hyperkératose de l'épithélium lingual et d'une altération des papilles gustatives ou d'une contamination bactérienne de la partie apicale des cellules gustatives de rats ([Morris-Wiman et al 2000](#)). Malgré que les gènes étudiés aient aussi un rôle dans les processus gustatifs, tels que l'hydrolyse d'aliment, le maintien de l'intégrité des bourgeons du goût ([Devoize & Dallel 2010](#)), aucune modification significative des préférences gustatives n'a été enregistrée. Dans le même sens, aucun effet significatif n'a été enregistré sur les concentrations sériques de l'EGF, alors que dans certains lots, sa synthèse au niveau de la glande submandibulaire est significativement affectée (F1, J100, lots TGV et BPA). Ceci est surprenant car il a été montré qu'une ablation de la submandibulaire entraîne une chute dans les concentrations sérique de l'EGF ([Noguchi et al 1991](#)). Cela signifie que les taux d'EGF sériques ne proviennent pas uniquement des sécrétions salivaires.

Cette surexpression de l'EGF à l'âge adulte, chez les mâles des lots TGV et BPA, bien qu'elle soit en désaccord avec les concentrations sériques de l'EGF suggère aussi l'action locale de l'EGF sur les structures glandulaires et buccales car ce facteur de croissance, à côté d'autres facteurs tels que NGF (*Nerve Growth Factor*) est connu pour ses actions : *i*) au niveau de la cavité buccale sur le développement et la conservation de l'intégrité fonctionnelle des voies sympathiques et des neurones sensoriels, *ii*) au niveau du développement et de la mise en place des structures faciales et buccodentaires, *iii*) au niveau de la réparation tissulaire ([Devoize & Dallel 2010](#)). Cela est confirmé par l'étude de la morphométrie, où les glandes salivaires semblent avoir des structures sécrétrices intactes. Cependant les effets sur l'expression de la KLK1 ne semblent pas avoir d'impact, pourtant dans la littérature il est connu que les Kalllicréines jouent un rôle dans la régulation du débit vasculaire dans la glande salivaire (médiateur de la vasodilatation) lors des périodes sécrétoires, et une modification dans l'irrigation peut avoir des conséquences sur la morphogénèse ([Devoize & Dallel 2010](#)).

Cette étude mériterait d'être confirmée par une étude effet/dose de composés ayant des propriétés hormonales plus puissantes. Ces résultats sont cependant en accord avec ceux précédemment trouvés au laboratoire ([Kouidhi et al 2012b](#)).

En conclusion, la glande salivaire submandibulaire chez le rat mâle est sans aucun doute une cible des perturbateurs endocriniens. Ceux-ci peuvent affecter l'expression de certains gènes tels que la gustine (AC6), la mucine 10 (Muc 10) et les kallicréines (KLK 1, KLK3). Ces effets sont transmissibles à la génération suivante dans le cas d'une exposition au mélange de faibles doses (œstrogénique/anti-androgénique). Cependant, la connaissance des propriétés hormonales des perturbateurs endocriniens (œstrogénique, anti-androgénique) ne nous aide pas à prédire les effets des expositions.

DISCUSSION GENERALE

Notre approche expérimentale pour étudier les effets de perturbateurs endocriniens à faibles doses est basée sur l'utilisation d'un modèle d'exposition spécifiquement adapté à ce type d'étude : conditions environnementales et alimentaires contrôlées pour s'affranchir de toute contamination par d'autres perturbateurs endocriniens, exposition continue pour couvrir l'ensemble des périodes à risques et pour explorer différents stades de développement, et enfin extension de l'étude à la deuxième génération pour identifier des effets multi-générationnels.

Dans ces conditions expérimentales, nous avons pu identifier et comparer des effets de mélanges aux faibles doses sur des cibles particulièrement en liaison avec le développement, le comportement (maternel et alimentaire). Nos résultats viennent compléter les travaux précédemment développés au sein de l'unité pour évaluer les effets multi-générationnels en fonction de la période d'exposition (*néonatale, adulte ou continue*) à des faibles doses de génistéine et de vinclozoline seules ou en mélanges : ces études avaient permis de discriminer des effets en fonction de la fenêtre d'exposition et avaient montré des effets de synergie entre la génistéine et la vinclozoline sur ces mêmes paramètres lors d'une exposition précoce.

Le mélange GV a été reconduit dans notre étude pour pouvoir comparer les effets lors d'une exposition continue (mélange TGV). Curieusement ces effets sont souvent moins marqués que lors des expositions précédentes. Le fait de diminuer la dose de vinclozoline (mélange GVf) ne diminue pas les effets, au contraire, sur certaines cibles en particulier sur les glandes salivaires, les effets délétères sont les plus significatifs.

D'une manière globale, mis à part dans le lot traité par le BPA et le mélange TGV, nous avons eu peu d'effets d'anomalies du développement. Toutefois, l'analyse multi-organes montre clairement des atteintes tissulaires spécifiques aux mélanges. Le mélange GVB a un effet sur le tissu adipeux analogue à celui du BPA tandis qu'il est quasiment sans effet sur la glande salivaire. A l'inverse, le mélange TGV est sans effet sur le tissu adipeux, mais actif sur les sécrétions salivaires ou sur les taux circulants d'EGF.

Un autre fait marquant de cette étude est que sauf pour le comportement le BPA est souvent plus actif lorsqu'il est administré seul qu'en mélange, et que le mélange ternaire est rarement le plus toxique. Toutefois, il semblerait que la génistéine atténue les effets du BPA (mélange GB) tandis que la vinclozoline parfois les amplifie (mélange VB)

Nos précédents travaux concordent avec les données de la littérature pour montrer les effets majorés du mélange sur le développement et le comportement, en l'occurrence le comportement alimentaire (prise et préférences), et les effets repro-toxiques sur les deux générations (projet PNRE-PPE 2005-2008), en particulier lors d'exposition précoce ([Eustache et al 2009](#)). Ce travail amène de nouvelles données et montrent que l'impact d'une exposition à des perturbateurs endocriniens sur l'organisme varie selon le statut physiologique et les conditions d'exposition, la composition du mélange mettant en jeu des mécanismes multiples.

Prise de manière plus ciblée, notre étude identifie différents paramètres qui peuvent se comparer par rapport aux données de la littérature.

Dans un premier temps, on a cherché à identifier les effets sur le développement dans les deux générations. Concernant l'apparition des malformations, il est vraiment difficile d'établir un lien direct entre ces malformations et l'exposition à nos molécules, mais on a pu observer une fréquence de malformations plus faible dans les lots traités par les mélanges que dans le lot traité avec le BPA seul. Le fait d'associer des composés aux propriétés hormonales différentes modulerait donc les effets de chacun des composés lorsqu'ils sont mis en mélange.

De plus, ces effets sur le développement varient selon les propriétés hormonales des mélanges [œstrogénique- anti-androgénique (VB, GV); œstrogénique- anti-androgénique- œstrogénique (GVB)...etc.], mais surtout selon les *end-points* : distance ano-génitale, sex-ratio...etc. Lorsqu'on compare les effets sur l'ensemble des organes étudiés, on constate qu'il n'y a pas de mélange « inoffensif », c'est-à-dire sans effet sur aucune cible. Des effets sont plus marqués pour les mélanges contenant du BPA, en particulier sur le tissu adipeux et la glande salivaire à la deuxième génération. Notre étude ne permet pas d'extrapoler les effets aux générations suivantes, mais on sait que le BPA comme la vinclozoline peuvent exercer des effets multi-générationnels au-delà de la 2^{ème} génération. A titre d'exemple, Anway et al, montrent qu'une exposition *in utero* à la vinclozoline affecte l'appareil de reproduction mâle, des effets qui s'étendent jusqu'à la 4^{ème} génération ([Anway et al 2005](#)). Les organes génitaux mâles ont été prélevés et sont en cours d'analyse par les équipes participant à ce programme, il sera intéressant de comparer les profils d'action des mélanges.

Le comportement (maternel et alimentaire) semble être l'un des paramètres les plus affecté dans notre étude, avec des effets plus prononcés dans la deuxième génération, ce qui confirme les travaux de Crews avec la vinclozoline qui provoque chez le rat des effets trans-générationnels dans la

réponse au stress ([Crews et al 2012](#)). Une des hypothèses la plus discutée dans la littérature est celle des effets épigénétiques. Skinner et al, montrent qu'une exposition *in utero* à la vinclozoline provoque une modification dans le transcriptome du cerveau dans la troisième génération, cela conduit à une altération dans le comportement d'anxiété ([Skinner et al 2008](#)). L'altération du comportement maternel chez les mères F1 est peut être due à une action directe du BPA, ou à une altération dans le comportement de leurs mères (les femelles F0). Nos données ne permettent pas de conclure sans explorer ce qui se passe au niveau du cerveau. L'exploration des cerveaux est envisagée pour tenter de relier ou non ces effets à une perturbation de type neuroendocrinienne et/ou épigénétique. Une étude est également envisagée où les femelles issue des mères exposées au BPA seront adoptées par des mères non exposées afin d'observer alors les effets sur le comportement maternel.

Bien que les effets sur les préférences gustatives dans la première génération soit minimes dans la deuxième génération, ces effets sont plus accentués et ils se répercutent sur l'amplitude du dimorphisme sexuel des préférences. Dans la littérature, l'exposition au xéno-œstrogènes (bisphénol A, méthoxychlor) entraîne aussi des modifications dans le comportement (*open field, elevated plus maze*) qui se traduisent par des altérations dans le dimorphisme ([Panzica et al 2007](#)).

Un des organes qui a un lien avec le comportement alimentaire est le tissu adipeux car il joue un rôle primordial dans la régulation de l'homéostasie énergétique. Ce travail montre que cet organe est une cible des perturbateurs endocriniens, et confirme les études publiées par plusieurs auteurs et qui vont dans le même sens que nos résultats ([Heindel 2003](#)), ([Lassiter & Brimijoin 2008](#)) ([Miyawaki et al 2007](#)) ([Newbold 1995](#)) ([Penza et al 2006](#)) ([Rubin et al 2001](#)) ([Somm et al 2009](#)) ([Newbold et al 2005](#)).

L'étude *in vitro* permet d'expliquer la prise de poids enregistrée chez les animaux de la deuxième génération. L'une des pistes les plus discutées est celle d'une possible interaction entre le perturbateur endocrinien et le PPAR γ (un marqueur de différenciation adipocytaire). Dans la littérature l'équipe de Balaguer a montré que le BPA peut lier le PPAR γ et agit comme un antagoniste ([Riu et al 2011](#)). Se rajoute à ces effets sur le tissu adipeux, une perturbation du bilan métabolique, ce qui renforce l'hypothèse de la capacité des perturbateurs endocriniens à engendrer des troubles métaboliques. Ces derniers peuvent être l'origine de plusieurs problèmes de santé publique tels que l'obésité, l'hypertension artérielle, et les maladies cardio-vasculaires. Dans la littérature une exposition aux perturbateurs endocriniens peut provoquer un dysfonctionnement au

niveau du pancréas, et par conséquent entrainer des troubles métaboliques ([Alonso-Magdalena et al 2010](#)) ([Soriano et al 2012](#)). Dans le même sens il existe des interactions au niveau du système neuroendocrinien qui régulent d'une part la balance énergétique et d'autre part la reproduction, et les perturbateurs endocriniens peuvent cibler ce système ([Bourguignon et al 2010](#)) ([Bourguignon & Parent 2010](#)). Donc une atteinte de la régulation neuroendocrinienne peut être à l'origine des problèmes reprotoxiques, mais aussi des troubles métaboliques enregistrés chez nos rats.

Les effets sur les glandes salivaires submandibulaires mâles sont moins prononcés dans notre étude, en tout cas dans la première génération. Les modifications au niveau moléculaires sont plutôt enregistrées au stade immature, et cela n'affecte pas vraiment les préférences gustatives. Les effets des perturbateurs endocriniens sont pas ou très peu documentés, mais on sait que les hormones sexuelles peuvent influencer leur morphogénèse ([Li et al 2005](#)) ([Kouidhi et al 2012b](#)), ou leur plasticité ([Folia et al 2012](#)). Toutefois, nos résultats sont à prendre en considération car ils traduisent des effets sur les fonctions endocrines et exocrines des glandes salivaires dont les retombées sur la sphère endobuccale, mais aussi au niveau systémique sur d'autres organes ne peuvent être écartés. Mieux connaître l'implication des protéines salivaires dans les processus gustatifs permettrait également d'anticiper sur les désordres du comportement alimentaire associés aux perceptions sensorielles. *Quoiqu'il en soit, notre étude montre que les protéines salivaires peuvent être considérées comme des marqueurs d'exposition à des perturbateurs endocriniens.*

En conclusion, ce travail identifie différents effets de cocktails de PE à des faibles doses, et montre surtout les difficultés à prédire les effets d'une exposition aux perturbateurs endocriniens à partir des propriétés hormonales initialement établies pour chacune des molécules qui constitue le cocktail. A côté de cette difficulté d'apporter des réponses claires et précises concernant la thématique de perturbateurs endocriniens et leurs impacts sur la santé publique, il souligne les lacunes dont dispose l'outil réglementaire qui ne peut utiliser sans risque les données des scientifiques compte tenu des divergences dans les résultats, qui peut être une conséquence de conditions expérimentales, insuffisamment contrôlées. A ce jour un des exemples les plus connus qui illustre cette insuffisance est celui du BPA. Vom Saal et Welshons exposent dans une revue les 130 études sur les effets du BPA *in vivo* publiées avant juillet 2005, et trouvent que 109 publications décrivent des effets néfastes contre 21 publications qui ne trouvent pas des effets significatifs ([vom Saal & Welshons 2006](#)).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Notre étude montre qu'une exposition chronique à des mélanges de xéno-hormones aux faibles doses, entraîne des effets multi-générationnels qui sont majorés à la F2. Les altérations dans le comportement, en l'occurrence le comportement maternel, montrent des effets sur les centres supérieurs au niveau cérébral. On a pu montrer que les études de comportement tel que le comportement maternel et alimentaire (préférences gustatives) sont non seulement des méthodes non invasives pour étudier les effets des xéno-hormones, mais également ils peuvent être utilisés comme marqueurs d'effets potentiels.

Ce travail nous a permis d'étudier les effets des perturbateurs endocriniens sur deux organes périphériques (tissu adipeux, glandes salivaires) qui ont un lien avec le comportement alimentaire (prise et préférences gustatives). Sur le premier on a pu détecter des effets alors que sur le second les effets sont minimales. L'altération du comportement maternel est peut être due à une action au niveau central, les analyses en cours sur l'hypothalamus nous permettront de mieux comprendre et d'expliquer ces effets. Enfin dans notre étude la nature des composants est non prédictive des effets des mélanges, ce qui rend difficile et complexe la caractérisation des effets des mélanges.

Ces résultats amènent quelques questionnements sur la suite à donner à ce travail et nous conduisent à proposer un programme visant à explorer plusieurs cibles potentielles des xéno-hormones qui présentent un lien avec la prise alimentaire et les préférences gustatives. Cependant dans l'immédiat une analyse de métabolomique sur les sérums des animaux exposés est entamée, afin de mieux expliquer l'aspect mécanistique de la perturbation endocrinienne en mélange et à faibles doses.

ANNEXES

Tableau 1: poids relatifs des organes (g/100 g PC) au moment des sacrifices :

FF0	T	TGV	GVf	GB	VB	GVB	BPA
Foie	3.70±0.10	3.33±0.06 *	3.52±0.08	3.52±0.11	3.49±0.08	3.48±0.08	3.47±0.05
Cerveau	0.75±0.01	0.78±0.01	0.77±0.02	0.77±0.02	0.77±0.01	0.75±0.01	0.77±0.01
T A Abdo	1.68±0.14	1.92±0.18	1.21±0.19	1.21±0.14 *	1.93±0.18	1.92±0.08	1.93±0.21
T A Périgo	0.79±0.05	0.77±0.06	0.58±0.05	0.56±0.06 *	0.76±0.06	0.78±0.06	0.82±0.08
T A S cut	0.89±0.11	0.83±0.10	0.64±0.13	0.64±0.05 *	0.69±0.09	0.77±0.07	1.11±0.13

FF1 J25	T	TGV	GVf	GB	VB	GVB	BPA
Foie	2.9±0.06	2.95±0.02	2.9±0.03	2.95±0.027	2.77±0.12	2.92±0.03	2.78±0.13
Cerveau	3.05±0.08	2.97±0.05	2.9±0.06	2.99±0.1	3±0.04	3.02±0.06	3±0.06
T A Blan	17.31±1.66	17.91±2.3	22.05±2.43	17.99±2.32	19.31±1.82	19.45±1.93	17.62±2.06
GS SM	2.35±0.03	2.37±0.07	2.40±0.05	2.23±0.07	2.41±0.09	2.44±0.06	2.51±0.1

MF1 J25	T	TGV	GVf	GB	VB	GVB	BPA
Foie	2.99±0.09	2.84±0.02	3.02±0.05	2.97±0.03	2.97±0.04	2.9±0.06	2.96±0.04
Cerveau	3.1±0.07	2.97±0.05	2.91±0.07	3.02±0.09	3.04±0.06	3.06±0.07	2.98±0.05
T.A.Blanc	20.01±1.57	22.41±2.62	20.17±1.99	20.04±2.04	19.76±1.59	19.77±1.73	19.30±2.46
GS SM	2.4±0.09	2.22±0.03	2.45±0.08	2.43±0.05	2.42±0.04	2.43±0.08	2.33±0.08

FF1 J100	T	TGV	GVf	GB	VB	GVB	BPA
Foie	2.12±0.06	2.12±0.04	2.10±0.03	2.12±0.05	2.29±0.06	2.20±0.05	2.16±0.01
Cerveau	0.79±0.01	0.78±0.01	0.83±0.01	0.80±0.02	0.84±0.04	0.80±0.01	0.82±0.02
T.A.Blanc	3.80±0.42	4.18±0.26	4.27±0.6	3.53±0.24	3.03±0.4	3.87±0.27	4.20±0.44
GS SM	0.13±0.004	0.13±0.003	0.14±0.008	0.14±0.004	0.15±0.01	0.14±0.005	0.14±0.004

MF1 J100	T	TGV	GVf	GB	VB	GVB	BPA
Foie	2.22±0.07	2.07±0.04	2.26±0.04	2.16±0.04	2.11±0.05	2.19±0.04	2.18±0.04
Cerveau	0.56±0.02	0.56±0.01	0.55±0.01	0.54±0.01	0.56±0.01	0.56±0	0.56±0.01
T.A.Blanc	3.90±0.17	3.96±0.5	3.75±0.26	3.77±0.42	3.34±0.3	3.94±0.5	4.08±0.3
GS SM	0.14±0.006	0.14±0.004	0.15±0.005	0.14±0.006	0.14±0.004	0.14±0.005	0.13±0.003

FF2 J100	T	TGV	GVf	GB	VB	GVB	BPA
Foie	2.46±0.06	2.35±0.10	2.41±0.07	2.28±0.09	2.31±0.07	2.45±0.05	2.32±0.06
Cerveau	0.93±0.01	0.89±0.028	0.87±0.007	0.87±0.027	0.89±0.027	0.85±0.023	0.83±0.021*
T.A.Blanc	4.42±0.39	4.79±0.23	5.05±0.51	4.75±0.42	5.16±0.29	4.75±0.28	4.51±0.45
GS SM/SL	0.18±0.005	0.18±0.005	0.17±0.004	0.18±0.004	0.18±0.007	0.17±0.003	0.17±0.004

MF2 J100	T	GVf	GB	VB	GVB	TGV	BPA
Foie	2.36±0.06	2.28±0.03	2.29±0.12	2.54±0.09	2.63±0.28	2.34±0.03	2.43±0.04
Cerveau	0.57±0.02	0.57±0.02	0.57±0.02	0.59±0.007	0.65±0.06	0.59±0.011	0.56±0.009
T A Blanc	5.28±0.5	5.84±0.26	5.01±0.35	5.49±0.56	5.78±0.31	5.36±0.77	5.86±0.68
GS SM/SL	0.16±0.009	0.17±0.003	0.18±0.006	0.16±0.007	0.18±0.015	0.17±0.005	0.16±0.004

Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM, * représente une différence significative par rapport au groupe témoin avec $p < 0,05$ (Test de Dunett).

T A Abdo : tissu adipeux abdominal, T A Périgo : tissu adipeux péri-gonadique, T A S cut : tissu adipeux sous cutané, GS SM : glande salivaire submandibulaire, SL : sublinguale.

Tableau 2: Propriétés physiques et chimiques du BPA ([BURSZTYKA 2008](#))

Paramètre	Valeur
No.CAS	80-05-7
Poids moléculaire	228,29 g/mol
Formule brute	C₁₅H₁₆O₂
Densité spécifique	Entre 1,060 et 1,195 g/cm³
Point de fusion	Entre 150 et 155°C
Point d'ébullition	220°C à 4 mmHg 398°C à 760 mm Hg
Solubilité dans l'eau	120 à 300 mg/l
Log K	3,40

Tableau 3: Propriétés physiques et chimiques de la vinclozoline ([BURSZTYKA 2008](#))

Paramètre	Valeur
No.CAS	50471-44-8
Poids moléculaire	268,1 g/mol
Formule brute	C₁₂H₉Cl₂NO₃
Densité spécifique	1,51 g/cm³
Point de fusion	Entre 108°C
Point d'ébullition	131°C à 0,05 mmHg
Solubilité dans l'eau	2,6 mg/l à 20°C
Log K	3

Tableau 4: Propriétés physiques et chimiques de la génistéine
(<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=5280961#x27>)

Paramètre	Valeur
No.CAS	446-72-0
Poids moléculaire	270,24 g/mol
Formule brute	C₁₅H₁₀O₅
Point de fusion	Entre 297 et 298 °C
Pression de vapeur	25°C à 5,2x10⁻¹² mm Hg
Solubilité dans l'eau	Pratiquement insoluble dans l'eau
Log K	2,84

Tableau 5 : Formule de régime purifié à teneur réduite en saccharose (g/kg de régime)

L5 (2009)	
Caséine chlorhydrique	180
Amidon de maïs	400
Amidon dextrinisé	200
Saccharose	60
Huile de maïs	50
Cellulose en poudre	50
Mélange minéral M Dijon	50
Mélange vitaminique V Dijon	10
Total	1000

Tableau 6 : Mélange minéral MDijon (50 g de mélange/kg de régime)

Produit	g ou mg/kg de mélange	g ou mg/kg de régime
CaCO₃	240 g	12.00 g
K₂HPO₄	215 g	10.75 g
CaHPO₄	215 g	10.75 g
MgSO₄,7H₂O	100 g	5.00 g
NaCl	60 g	3.00 g
MgO	40 g	2.00 g
FeSO₄,7H₂O	8.00 g	400 mg
ZnSO₄,7H₂O	7.00 g	350 mg
MnSO₄,H₂O	2.00 g	100 mg
CuSO₄,5H₂O	1.00 g	50 mg
Na₂SiO₇,3H₂O	500 mg	25 mg
AlK(SO₄)₂,12H₂O	200 mg	10 mg
K₂CrO₄	150 mg	7.5 mg
NaF	100 mg	5 mg
NiSO₄,6H₂O	100 mg	5 mg
H₂BO₃	100 mg	5 mg
CoSO₄,7H₂O	50 mg	2.5 mg
KIO₃	40 mg	2 mg
(NH₄)₆Mo₇O₂₄,4H₂O	20 mg	1 mg
LiCl	15 mg	0.75 mg
Na₂SeO₃	15 mg	0.75 mg
NH₄VO₃	10 mg	0.5 mg
Sucre en poudre	110.70 g (q.s.p. 1000 g)	5.535 g (q.s.p. 50 g)

Tableau 7 : Mélange vitaminique VDijon (10 g de mélange/kg de régime)

Vitamine	g ou mg de produit /kg de mélange	mg ou UI /kg de régime
Vitamine A (acétate de rétinol) en poudre, 500 000 UI/g	1 g	5000 UI
Vitamine D3 (cholécalférol) en poudre, 500 000 UI/g	250 mg	1250 UI
Vitamine E (acétate de DL-a-tocophérol) en poudre, 500 UI/g	20 g	100 UI
Vitamine K (*)	100 mg	1 mg
Thiamine chlorhydrate	1 g	10 mg
Riboflavine	1 g	10 mg
Acide nicotinique	5 g	50 mg
D-pantothénate de Ca	2.5 g	25 mg
Pyridoxine chlorhydrate	1 g	10 mg
D-biotine, poudre à 2 %	1 g	0.2 mg
Acide folique	200 mg	2 mg
Cyanocobalamine, poudre à 1 mg/g	2.5 g	0.025 mg
Choline chlorhydrate, poudre à 50 %	200 g	1 g
DL-méthionine	200 g	2 g
Acide p-aminobenzoïque	5 g	50 mg
Inositol	10 g	100 mg
Sucre en poudre	549.45 g (q.s.p. 1000 g)	5.495 g (q.s.p. 10 g)

(*) Vitamine K1 (phylloquinone), ou, à défaut, vitamine K3 (ménadione).

Tableau 8 : Formule de régime 2018

Harlan Laboratories

2018

Teklad Global 18% Protein Rodent Diet

Product Description- 2018 is a fixed formula, non-autoclavable diet manufactured with high quality ingredients and designed to support gestation, lactation, and growth of rodents. 2018 does not contain alfalfa, thus lowering the occurrence of natural phytoestrogens. Typical isoflavone concentrations (daidzein + genistein aglycone equivalents) range from 150 to 250 mg/kg. Exclusion of alfalfa reduces chlorophyll, improving optical imaging clarity. Absence of animal protein and fish meal minimizes the presence of nitrosamines. Also available **certified (2018C) and irradiated (2018I)**. For autoclavable diet, refer to 2018S (Sterilizable) or 2018SX (Extruded & Sterilizable).

Ingredients (In descending order of inclusion)- Ground wheat, ground corn, wheat middlings, dehulled soybean meal, corn gluten meal, soybean oil, calcium carbonate, dicalcium phosphate, brewers dried yeast, iodized salt, L-lysine, DL-methionine, choline chloride, kaolin, magnesium oxide, vitamin E acetate, menadione sodium bisulfite complex (source of vitamin K activity), manganese oxide, ferrous sulfate, zinc oxide, niacin, calcium pantothenate, copper sulfate, pyridoxine hydrochloride, riboflavin, thiamin mononitrate, vitamin A acetate, calcium iodate, vitamin B₁₂ supplement, folic acid, biotin, vitamin D₃ supplement, cobalt carbonate.

Macronutrients		
Crude Protein	%	18.6
Fat (ether extract) ^a	%	6.2
Carbohydrate (available) ^b	%	44.2
Crude Fiber	%	3.5
Neutral Detergent Fiber ^c	%	14.7
Ash	%	5.3
Energy Density ^d	kcal/g (kJ/g)	3.1 (13.0)
Calories from Protein	%	24
Calories from Fat	%	18
Calories from Carbohydrate	%	58
Minerals		
Calcium	%	1.0
Phosphorus	%	0.7
Non-Phytate Phosphorus	%	0.4
Sodium	%	0.2
Potassium	%	0.6
Chloride	%	0.4
Magnesium	%	0.2
Zinc	mg/kg	70
Manganese	mg/kg	100
Copper	mg/kg	15
Iodine	mg/kg	6
Iron	mg/kg	200
Selenium	mg/kg	0.23
Amino Acids		
Aspartic Acid	%	1.4
Glutamic Acid	%	3.4
Alanine	%	1.1
Glycine	%	0.8
Threonine	%	0.7
Proline	%	1.6
Serine	%	1.1
Leucine	%	1.8
Isoleucine	%	0.8
Valine	%	0.9
Phenylalanine	%	1.0
Tyrosine	%	0.6
Methionine	%	0.4
Cystine	%	0.3
Lysine	%	0.9
Histidine	%	0.4
Arginine	%	1.0
Tryptophan	%	0.2

Standard Product Form: *Pellet*

Vitamins		
Vitamin A ^{e,1}	IU/g	15.0
Vitamin D ₃ ^{e,2}	IU/g	1.5
Vitamin E	IU/kg	110
Vitamin K ₃ (menadione)	mg/kg	50
Vitamin B ₁ (thiamin)	mg/kg	17
Vitamin B ₂ (riboflavin)	mg/kg	15
Niacin (nicotinic acid)	mg/kg	70
Vitamin B ₆ (pyridoxine)	mg/kg	18
Pantothenic Acid	mg/kg	33
Vitamin B ₁₂ (cyanocobalamin)	mg/kg	0.08
Biotin	mg/kg	0.40
Folate	mg/kg	4
Choline	mg/kg	1200
Fatty Acids		
C16:0 Palmitic	%	0.7
C18:0 Stearic	%	0.2
C18:1ω9 Oleic	%	1.2
C18:2ω6 Linoleic	%	3.1
C18:3ω3 Linolenic	%	0.3
Total Saturated	%	0.9
Total Monounsaturated	%	1.3
Total Polyunsaturated	%	3.4
Other		
Cholesterol	mg/kg	-

^a Ether extract is used to measure fat in pelleted diets, while an acid hydrolysis method is required to recover fat in extruded diets. Compared to ether extract, the fat value for acid hydrolysis will be approximately 1% point higher.

^b Carbohydrate (available) is calculated by subtracting neutral detergent fiber from total carbohydrates.

^c Neutral detergent fiber is an estimate of insoluble fiber, including cellulose, hemicellulose, and lignin. Crude fiber methodology underestimates total fiber.

^d Energy density is a calculated estimate of metabolizable energy based on the Atwater factors assigning 4 kcal/g to protein, 9 kcal/g to fat, and 4 kcal/g to available carbohydrate.

^e Indicates added amount but does not account for contribution from other ingredients.

¹ 1 IU vitamin A = 0.3 µg retinol

² 1 IU vitamin D = 25 ng cholecalciferol

For nutrients not listed, insufficient data is available to quantify.

Nutrient data represent the best information available, calculated from published values and direct analytical testing of raw materials and finished product. Nutrient values may vary due to the natural variations in the ingredients, analysis, and effects of processing.

Teklad Diets are designed and manufactured for research purposes only.

Harlan, Harlan Laboratories, Helping you do research better, and the Harlan logo are trademarks and trade names of Harlan Laboratories, Inc. © 2008 Harlan Laboratories, Inc.

harlanTM
Helping you do research better



RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (EFSA) EFSA. 2008. Reasoned opinion of EFSA prepared by PRAPeR on MRLs of concern for the active substance vinclozolin. *EFSA Scientific Report*: 166, 1-36
- (EPA) USEPA. 2000. Reregistration Eligibility Decision (RED) :Vinclozolin.
- Abumrad NA. 2005. CD36 may determine our desire for dietary fats. *The Journal of clinical investigation* 115: 2965-7
- Acosta A, Hurtado MD, Gorbatyuk O, La Sala M, Duncan D, et al. 2011. Salivary PYY: a putative bypass to satiety. *PloS one* 6: e26137
- Adewale HB, Todd KL, Mickens JA, Patisaul HB. 2011. The impact of neonatal bisphenol-A exposure on sexually dimorphic hypothalamic nuclei in the female rat. *Neurotoxicology* 32: 38-49
- Ahrens-Fath I, Politz O, Geserick C, Haendler B. 2005. Androgen receptor function is modulated by the tissue-specific AR45 variant. *Febs J* 272: 74-84
- Alonso-Magdalena P, Vieira E, Soriano S, Menes L, Burks D, et al. 2010. Bisphenol A exposure during pregnancy disrupts glucose homeostasis in mothers and adult male offspring. *Environ Health Perspect* 118: 1243-50
- Andrade AJ, Grande SW, Talsness CE, Grote K, Chahoud I. 2006. A dose-response study following in utero and lactational exposure to di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP): non-monotonic dose-response and low dose effects on rat brain aromatase activity. *Toxicology* 227: 185-92
- Anton R, Barlow S, Boskou D, Castle L, Crebelli R, et al. 2004. Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food on a Request from the Commission related to para hydroxybenzoates (E 214-219). *The EFSA Journal* 83 1-26
- Anway MD, Cupp AS, Uzumcu M, Skinner MK. 2005. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science* 308: 1466-9
- Arancibia S, Assenmacher I. 1985. [Submaxillary glands in an endocrine context]. *J Biol Buccale* 13: 185-203
- Arnold AP, Gorski RA. 1984. Gonadal steroid induction of structural sex differences in the central nervous system. *Annual review of neuroscience* 7: 413-42
- Baldi E, Luconi M, Murtatori M, Marchiani S, Tamburrino L, Forti G. 2009. Nongenomic activation of spermatozoa by steroid hormones: facts and fictions. *Mol Cell Endocrinol* 308: 39-46
- Barker DJ, Eriksson JG, Forsen T, Osmond C. 2002. Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis. *International journal of epidemiology* 31: 1235-9
- Barnett SA, Burn J, eds. 1970. *Maternal and Infant Behavior*, Vols. 177-191.: HAFEZ ES.

- Batista TM, Alonso-Magdalena P, Vieira E, Amaral ME, Cederroth CR, et al. 2012. Short-term treatment with bisphenol-A leads to metabolic abnormalities in adult male mice. *PLoS one* 7: e33814
- Belanger C, Luu-The V, Dupont P, Tcherno A. 2002. Adipose tissue intracrinology: potential importance of local androgen/estrogen metabolism in the regulation of adiposity. *Horm Metab Res* 34: 737-45
- Bisenius ES, Veeramachaneni DN, Sammonds GE, Tobet S. 2006. Sex differences and the development of the rabbit brain: effects of vinclozolin. *Biol Reprod* 75: 469-76
- Blaker M, Kock K, Ahlers C, Buck F, Schmale H. 1993. Molecular cloning of human von Ebner's gland protein, a member of the lipocalin superfamily highly expressed in lingual salivary glands. *Biochimica et biophysica acta* 1172: 131-7
- Bonefeld-Jorgensen EC, Long M, Hofmeister MV, Vinggaard AM. 2007. Endocrine-disrupting potential of bisphenol A, bisphenol A dimethacrylate, 4-n-nonylphenol, and 4-n-octylphenol in vitro: new data and a brief review. *Environ Health Perspect* 115 Suppl 1: 69-76
- Borges BC, Fulco GM, Souza AJ, de Lima KC. 2010. Xerostomia and hyposalivation: a preliminary report of their prevalence and associated factors in Brazilian elderly diabetic patients. *Oral Health Prev Dent* 8: 153-8
- Bosch OJ, Neumann ID. 2012. Both oxytocin and vasopressin are mediators of maternal care and aggression in rodents: From central release to sites of action. *Horm Behav* 61: 293-303
- Bouchard C, Despres JP, Mauriege P. 1993. Genetic and nongenetic determinants of regional fat distribution. *Endocr Rev* 14: 72-93
- Bourguignon JP, Parent AS. 2010. Early homeostatic disturbances of human growth and maturation by endocrine disrupters. *Curr Opin Pediatr* 22: 470-7
- Bourguignon JP, Rasier G, Lebrethon MC, Gerard A, Naveau E, Parent AS. 2010. Neuroendocrine disruption of pubertal timing and interactions between homeostasis of reproduction and energy balance. *Mol Cell Endocrinol* 324: 110-20
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-54
- Branchi I, Santucci D, Alleva E. 2001. Ultrasonic vocalisation emitted by infant rodents: a tool for assessment of neurobehavioural development. *Behavioural brain research* 125: 49-56
- Braniste V, Jouault A, Gaultier E, Polizzi A, Buisson-Brenac C, et al. 2010. Impact of oral bisphenol A at reference doses on intestinal barrier function and sex differences after perinatal exposure in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 448-53
- Breslin PA, Spector AC. 2008. Mammalian taste perception. *Current biology* : CB 18: R148-55
- Bridges R, Rigerio B, Byrnes E, Yang L, Walker A. 2001. Central infusions of the recombinant human prolactin receptor antagonist, S179D-PRL, delay the onset of maternal behavior in steroid-primed, nulliparous female rats. *Endocrinology* 142: 730-9

- Bridges RS, Numan M, Ronsheim PM, Mann PE, Lupini CE. 1990. Central prolactin infusions stimulate maternal behavior in steroid-treated, nulliparous female rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87: 8003-7
- Bruns CM, Baum ST, Colman RJ, Eisner JR, Kemnitz JW, et al. 2004. Insulin resistance and impaired insulin secretion in prenatally androgenized male rhesus monkeys. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 6218-23
- Bueker ED, Weis P, Schenkein I. 1965. Sexual Dimorphism of Mouse Submaxillary Glands and Its Relationship to Nerve Growth Stimulating Protein. *Proc Soc Exp Biol Med* 118: 204-7
- BURSZTYKA J. 2008. METABOLISME DU BISPHENOL A, DE LA VINCHLOZOLINE ET DE LA GENISTEINE DANS LES SYSTEMES BIOLOGIQUES UTILISES POUR ETUDIER LES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS.
- Bursztyka J, Debrauwer L, Perdu E, Jouanin I, Jaeg JP, Cravedi JP. 2008. Biotransformation of vinclozolin in rat precision-cut liver slices: comparison with in vivo metabolic pattern. *J Agric Food Chem* 56: 4832-9
- Butte NF, Hopkinson JM, Wong WW, Smith EO, Ellis KJ. 2000. Body composition during the first 2 years of life: an updated reference. *Pediatr Res* 47: 578-85
- Byyny RL, Orth DN, Cohen S. 1972. Radioimmunoassay of epidermal growth factor. *Endocrinology* 90: 1261-6
- C.C.E. 1999. Stratégie communautaire concernant les perturbateurs endocriniens : une série de substances suspectées d'influer sur le système hormonal des hommes et des animaux, Commission des Communautés Européennes. COM(1999) 706, Bruxelles
- C.E. 2002. Endocrine disruptors: study on gathering information on 435 substances with insufficient data.
- Cabaton NJ, Wadia PR, Rubin BS, Zalko D, Schaeberle CM, et al. 2011. Perinatal exposure to environmentally relevant levels of bisphenol A decreases fertility and fecundity in CD-1 mice. *Environ Health Perspect* 119: 547-52
- Cagen SZ, Waechter JM, Jr., Dimond SS, Breslin WJ, Butala JH, et al. 1999. Normal reproductive organ development in CF-1 mice following prenatal exposure to bisphenol A. *Toxicol Sci* 50: 36-44
- Carlisle HJ, Stellar E. 1969. Caloric regulation and food preference in normal, hyperphagic, and aphagic rats. *Journal of comparative and physiological psychology* 69: 107-14
- Carwile JL, Michels KB. 2011. Urinary bisphenol A and obesity: NHANES 2003-2006. *Environmental research* 111: 825-30
- Cederroth CR, Vassalli JD, Nef S. 2007 De l'épigénétique et du développement. *Revue Médicale Suisse* 100

- Cederroth CR, Vinciguerra M, Gjinovci A, Kuhne F, Klein M, et al. 2008. Dietary phytoestrogens activate AMP-activated protein kinase with improvement in lipid and glucose metabolism. *Diabetes* 57: 1176-85
- Cederroth CR, Vinciguerra M, Kuhne F, Madani R, Doerge DR, et al. 2007. A phytoestrogen-rich diet increases energy expenditure and decreases adiposity in mice. *Environ Health Perspect* 115: 1467-73
- Chakraborty S, Sachdev A, Salton SR, Chakraborty TR. 2008. Stereological analysis of estrogen receptor expression in the hypothalamic arcuate nucleus of ob/ob and agouti mice. *Brain Res* 1217: 86-95
- Champagne F, Diorio J, Sharma S, Meaney MJ. 2001. Naturally occurring variations in maternal behavior in the rat are associated with differences in estrogen-inducible central oxytocin receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 12736-41
- Chavarro JE, Toth TL, Sadio SM, Hauser R. 2008. Soy food and isoflavone intake in relation to semen quality parameters among men from an infertility clinic. *Human reproduction* 23: 2584-90
- Chow SY, Sakai RR, Witcher JA, Adler NT, Epstein AN. 1992. Sex and sodium intake in the rat. *Behavioral neuroscience* 106: 172-80
- Christiansen S, Scholze M, Dalgaard M, Vinggaard AM, Axelstad M, et al. 2009. Synergistic disruption of external male sex organ development by a mixture of four antiandrogens. *Environ Health Perspect* 117: 1839-46
- Clegg DJ, Brown LM, Woods SC, Benoit SC. 2006. Gonadal hormones determine sensitivity to central leptin and insulin. *Diabetes* 55: 978-87
- Colborn T. TEDX list of potential endocrine disruptors, the endocrine disruptor exchange. Available from: <http://www.endocrinedisruption.com/endocrine.TEDXList.overview.php>
- Cooke PS, Naaz A. 2004. Role of estrogens in adipocyte development and function. *Experimental biology and medicine* 229: 1127-35
- Crews D, Gillette R, Scarpino SV, Manikkam M, Savenkova MI, Skinner MK. 2012. Epigenetic transgenerational inheritance of altered stress responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 9143-8
- Curtis KS, Davis LM, Johnson AL, Therrien KL, Contreras RJ. 2004. Sex differences in behavioral taste responses to and ingestion of sucrose and NaCl solutions by rats. *Physiol Behav* 80: 657-64
- Curtis KS, Stratford JM, Contreras RJ. 2005. Estrogen increases the taste threshold for sucrose in rats. *Physiol Behav* 86: 281-6
- Dahlman-Wright K, Cavailles V, Fuqua SA, Jordan VC, Katzenellenbogen JA, et al. 2006. International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen receptors. *Pharmacol Rev* 58: 773-81
- Dalu A, Haskell JF, Coward L, Lamartiniere CA. 1998. Genistein, a component of soy, inhibits the expression of the EGF and ErbB2/Neu receptors in the rat dorsolateral prostate. *Prostate* 37: 36-43

- Dawes C. 1974. Rhythms in salivary flow rate and composition. *International journal of chronobiology* 2: 253-79
- De Matteis R, Puxeddu R, Riva A, Cinti S. 2002. Intralobular ducts of human major salivary glands contain leptin and its receptor. *J Anat* 201: 363-70
- Delage-Mourroux R, Jouvenot M. 2001. Les coactivateurs et les corépresseurs des récepteurs aux estrogènes. . *Regard sur la Biochimie* 3: 44-52
- Della Seta D, Minder I, Dessi-Fulgheri F, Farabollini F. 2005. Bisphenol-A exposure during pregnancy and lactation affects maternal behavior in rats. *Brain Res Bull* 65: 255-60
- Delwiche J, O'Mahony M. 1996. Changes in secreted salivary sodium are sufficient to alter salt taste sensitivity: use of signal detection measures with continuous monitoring of the oral environment. *Physiol Behav* 59: 605-11
- Demissie M, Lazic M, Foecking EM, Aird F, Dunaif A, Levine JE. 2008. Transient prenatal androgen exposure produces metabolic syndrome in adult female rats. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 295: E262-8
- Desmettre T, Rouland JF. 2005. [Hypothesis on the role of nutritional factors in ocular hypertension and glaucoma]. *J Fr Ophthalmol* 28: 312-6
- Dessi-Fulgheri F, Porrini S, Farabollini F. 2002. Effects of perinatal exposure to bisphenol A on play behavior of female and male juvenile rats. *Environ Health Perspect* 110 Suppl 3: 403-7
- Devoize L, Dallel R. 2010. Salivation. *Médecine buccale* 28-150-M-10
- Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon JP, Giudice LC, Hauser R, Prins GS, et al. 2009. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr Rev* 30: 293-342
- Diel P. 2002. Tissue-specific estrogenic response and molecular mechanisms. *Toxicol Lett* 127: 217-24
- Dieudonne MN, Leneuve MC, Giudicelli Y, Pecquery R. 2004. Evidence for functional estrogen receptors alpha and beta in human adipose cells: regional specificities and regulation by estrogens. *American journal of physiology. Cell physiology* 286: C655-61
- Dieudonne MN, Pecquery R, Boumediene A, Leneuve MC, Giudicelli Y. 1998. Androgen receptors in human preadipocytes and adipocytes: regional specificities and regulation by sex steroids. *Am J Physiol* 274: C1645-52
- Doerge DR, Twaddle NC, Vanlandingham M, Brown RP, Fisher JW. 2011. Distribution of bisphenol A into tissues of adult, neonatal, and fetal Sprague-Dawley rats. *Toxicology and applied pharmacology* 255: 261-70
- Dolinoy DC, Huang D, Jirtle RL. 2007. Maternal nutrient supplementation counteracts bisphenol A-induced DNA hypomethylation in early development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 13056-61
- Doré D, ed. 1994. *BIOCHIMIE CLINIQUE*.

- Drewnowski A. 1997. Why do we like fat? *J Am Diet Assoc* 97: S58-62
- Drewnowski A, Greenwood MR. 1983. Cream and sugar: human preferences for high-fat foods. *Physiol Behav* 30: 629-33
- Duncan AM, Phipps WR, Kurzer MS. 2003. Phyto-oestrogens. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 17: 253-71
- EFSA. 2008. Reasoned opinion of EFSA prepared by PRAPeR on MRLs of concern for the active substance vinclozolin. *The European Food Safety Authority (EFSA)*: 1-36
- El Sheikh Saad H, Meduri G, Phrakonkham P, Berges R, Vacher S, et al. 2011. Abnormal peripubertal development of the rat mammary gland following exposure in utero and during lactation to a mixture of genistein and the food contaminant vinclozolin. *Reprod Toxicol* 32: 15-25
- Elson AE, Dotson CD, Egan JM, Munger SD. 2010. Glucagon signaling modulates sweet taste responsiveness. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 24: 3960-9
- Enmark E, Gustafsson JA. 1999. Oestrogen receptors - an overview. *J Intern Med* 246: 133-8
- EPA. 1997. TRIBUTYLTIN OXIDE (CAS No. 56-35-9). *U.S. Environmental Protection Agency*
- European-Commission. 2006. Monitoring of Pesticide Residues in Products of Plant Origin.
- Eustache F, Mondon F, Canivenc-Lavier MC, Lesaffre C, Fulla Y, et al. 2009. Chronic dietary exposure to a low-dose mixture of genistein and vinclozolin modifies the reproductive axis, testis transcriptome, and fertility. *Environ Health Perspect* 117: 1272-9
- Even I, Berta JL, Volatier JL. 2002. Evaluation de l'exposition théorique des nourrissons et des enfants en bas âge aux résidus de pesticides apportés par les aliments courants et infantiles. *L'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA)*
- Changement de nom : L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES)*
- Extier A, Perruchot MH, Baudry C, Guesnet P, Lavialle M, Alessandri JM. 2009. Differential effects of steroids on the synthesis of polyunsaturated fatty acids by human neuroblastoma cells. *Neurochem Int* 55: 295-301
- Fahrbach SE, Pfaff DW. 1986. Effect of preoptic region implants of dilute estradiol on the maternal behavior of ovariectomized, nulliparous rats. *Hormones and behavior* 20: 354-63
- Faus H, Haendler B. 2006. Post-translational modifications of steroid receptors. *Biomed Pharmacother* 60: 520-8
- Faustini-Fustini M, Rochira V, Carani C. 1999. Oestrogen deficiency in men: where are we today? *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 140: 111-29

- Fenichel P, Dechaux H, Harthe C, Gal J, Ferrari P, et al. 2012. Unconjugated bisphenol A cord blood levels in boys with descended or undescended testes. *Human reproduction* 27: 983-90
- Ferguson SA, Delclos KB, Newbold RR, Flynn KM. 2003. Dietary ethinyl estradiol exposure during development causes increased voluntary sodium intake and mild maternal and offspring toxicity in rats. *Neurotoxicol Teratol* 25: 491-501
- Ferguson SA, Delclos KB, Newbold RR, Flynn KM. 2009. Few effects of multi-generational dietary exposure to genistein or nonylphenol on sodium solution intake in male and female Sprague-Dawley rats. *Neurotoxicol Teratol* 31: 143-8
- Ferguson SA, Flynn KM, Delclos KB, Newbold RR. 2000. Maternal and offspring toxicity but few sexually dimorphic behavioral alterations result from nonylphenol exposure. *Neurotoxicol Teratol* 22: 583-91
- Ferguson SA, Law CD, Jr., Abshire JS. 2011. Developmental treatment with bisphenol A or ethinyl estradiol causes few alterations on early preweaning measures. *Toxicol Sci* 124: 149-60
- Fleming AS, O'Day DH, Kraemer GW. 1999. Neurobiology of mother-infant interactions: experience and central nervous system plasticity across development and generations. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 23: 673-85
- Flototto T, Niederacher D, Hohmann D, Heimerzheim T, Dall P, et al. 2004. Molecular mechanism of estrogen receptor (ER)alpha-specific, estradiol-dependent expression of the progesterone receptor (PR) B-isoform. *J Steroid Biochem Mol Biol* 88: 131-42
- Flynn KM, Delclos KB, Newbold RR, Ferguson SA. 2001. Behavioral responses of rats exposed to long-term dietary vinclozolin. *J Agric Food Chem* 49: 1658-65
- Flynn KM, Delclos KB, Newbold RR, Ferguson SA. 2005. Long term dietary methoxychlor exposure in rats increases sodium solution consumption but has few effects on other sexually dimorphic behaviors. *Food Chem Toxicol* 43: 1345-54
- Folia M, Boudalia S, Ménétrier F, Decocq L, Pasquis B, et al. 2012. Oral homeostasis disruption by medical plasticizer component Bisphenol A in adult male rats. *The Laryngoscope*
- Francis D, Diorio J, Liu D, Meaney MJ. 1999. Nongenomic transmission across generations of maternal behavior and stress responses in the rat. *Science* 286: 1155-8
- Fu M, Sun T, Bookout AL, Downes M, Yu RT, et al. 2005. A Nuclear Receptor Atlas: 3T3-L1 adipogenesis. *Mol Endocrinol* 19: 2437-50
- Fukuwatari T, Kawada T, Tsuruta M, Hiraoka T, Iwanaga T, et al. 1997. Expression of the putative membrane fatty acid transporter (FAT) in taste buds of the circumvallate papillae in rats. *FEBS letters* 414: 461-4
- Furukawa T, Kurokawa J. 2007. Regulation of cardiac ion channels via non-genomic action of sex steroid hormones: implication for the gender difference in cardiac arrhythmias. *Pharmacol Ther* 115: 106-15
- Gaillard RC. 2003. Le tissu adipeux : un véritable organe endocrine. *Revue Médicale Suisse* 22822

- Gallavan RH, Jr., Holson JF, Stump DG, Knapp JF, Reynolds VL. 1999. Interpreting the toxicologic significance of alterations in anogenital distance: potential for confounding effects of progeny body weights. *Reproductive toxicology* 13: 383-90
- Gao Q, Horvath TL. 2008. Cross-talk between estrogen and leptin signaling in the hypothalamus. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294: E817-26
- Garcia R, Kondo K, Scholkens B, Boucher R, Genest J. 1977. Effect in vivo of beta-adrenergic stimulation, angiotensin II, dibutyryl cyclic AMP, and theophylline on tonin concentration in rat saliva and submaxillary gland. *Can J Physiol Pharmacol* 55: 983-9
- Geens T, Neels H, Covaci A. 2012. Distribution of bisphenol-A, triclosan and n-nonylphenol in human adipose tissue, liver and brain. *Chemosphere* 87: 796-802
- Gerozissis K. 2001. Insuline cérébrale: régulation et rôle sur la prise alimentaire. *Act. Méd. Int.* 4
- Ginci G, Arezzini L, Terzuoli L, Pizzichini M, Marinello E. 1997. Effect of estradiol on serum triglyceride lipoprotein levels and fatty acid composition in castrated rats. *Horm Metab Res* 29: 504-6
- Giordano AL, Siegel HI, Rosenblatt JS. 1989. Nuclear estrogen receptor binding in the preoptic area and hypothalamus of pregnancy-terminated rats: correlation with the onset of maternal behavior. *Neuroendocrinology* 50: 248-58
- Gradolatto A. 2004. Evaluation et identification du potentiel endocrinien d'un flavonoïde hydroxylé, l'apigénine, et comparaison à un perturbateur endocrinien reconnu, le bisphénol A.
- Graham JD, Clarke CL. 1997. Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr Rev* 18: 502-19
- Grattan DR. 2002. Behavioural significance of prolactin signalling in the central nervous system during pregnancy and lactation. *Reproduction* 123: 497-506
- Greenberg ER, Barnes AB, Resseguie L, Barrett JA, Burnside S, et al. 1984. Breast cancer in mothers given diethylstilbestrol in pregnancy. *N Engl J Med* 311: 1393-8
- Greene GL, Gilna P, Waterfield M, Baker A, Hort Y, Shine J. 1986. Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science* 231: 1150-4
- Groschl M, Rauh M, Wagner R, Neuhuber W, Metzler M, et al. 2001. Identification of leptin in human saliva. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 86: 5234-9
- Groschl M, Topf HG, Bohlender J, Zenk J, Klussmann S, et al. 2005. Identification of ghrelin in human saliva: production by the salivary glands and potential role in proliferation of oral keratinocytes. *Clinical chemistry* 51: 997-1006
- Grun F, Blumberg B. 2009. Minireview: the case for obesogens. *Mol Endocrinol* 23: 1127-34
- Hadjimichael OC, Meigs JW, Falcier FW, Thompson WD, Flannery JT. 1984. Cancer risk among women exposed to exogenous estrogens during pregnancy. *J Natl Cancer Inst* 73: 831-4

- Hall JM, McDonnell DP. 1999. The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology* 140: 5566-78
- Hamilton CL. 1964. Rat's Preference for High Fat Diets. *Journal of comparative and physiological psychology* 58: 459-60
- Hany J, Lilienthal H, Sarasin A, Roth-Harer A, Fastabend A, et al. 1999. Developmental exposure of rats to a reconstituted PCB mixture or aroclor 1254: effects on organ weights, aromatase activity, sex hormone levels, and sweet preference behavior. *Toxicol Appl Pharmacol* 158: 231-43
- Harmon AW, Harp JB. 2001. Differential effects of flavonoids on 3T3-L1 adipogenesis and lipolysis. *Am J Physiol Cell Physiol* 280: C807-13
- Hartley DE, Edwards JE, Spiller CE, Alom N, Tucci S, et al. 2003. The soya isoflavone content of rat diet can increase anxiety and stress hormone release in the male rat. *Psychopharmacology* 167: 46-53
- Hartman HB, Hu X, Tyler KX, Dalal CK, Lazar MA. 2002. Mechanisms regulating adipocyte expression of resistin. *J Biol Chem* 277: 19754-61
- Hassink SG, de Lancey E, Sheslow DV, Smith-Kirwin SM, O'Connor DM, et al. 1997. Placental leptin: an important new growth factor in intrauterine and neonatal development? *Pediatrics* 100: E1
- Heindel JJ. 2003. Endocrine disruptors and the obesity epidemic. *Toxicol Sci* 76: 247-9
- Heindel JJ. 2005. The fetal basis of adult disease: Role of environmental exposures--introduction. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 73: 131-2
- Heine PA, Taylor JA, Iwamoto GA, Lubahn DB, Cooke PS. 2000. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-alpha knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 12729-34
- Herbst AL, Ulfelder H, Poskanzer DC. 1971. Adenocarcinoma of the vagina. Association of maternal stilbestrol therapy with tumor appearance in young women. *N Engl J Med* 284: 878-81
- Hilakivi-Clarke L, Cho E, deAssis S, Olivo S, Ealley E, et al. 2001. Maternal and prepubertal diet, mammary development and breast cancer risk. *J Nutr* 131: 154S-57S
- Hood E. 2005. Are EDCs blurring issues of gender? *Environ Health Perspect* 113: A670-7
- Hotchkiss AK, Ostby JS, Vandenbergh JG, Gray LE, Jr. 2003. An environmental antiandrogen, vinclozolin, alters the organization of play behavior. *Physiol Behav* 79: 151-6
- Howdeshell KL, Hotchkiss AK, Thayer KA, Vandenbergh JG, vom Saal FS. 1999. Exposure to bisphenol A advances puberty. *Nature* 401: 763-4
- Ikeno T, Ikeno K, Uno T. 1988. Relationship between serum-amylase activity and intraductal pressures in the rat parotid and submandibular salivary glands after administration of pilocarpine or isoprenaline. *Archives of oral biology* 33: 403-6

- Inoshita H, Masuyama H, Hiramatsu Y. 2003. The different effects of endocrine-disrupting chemicals on estrogen receptor-mediated transcription through interaction with coactivator TRAP220 in uterine tissue. *Journal of molecular endocrinology* 31: 551-61
- Inoue H, Ono K, Masuda W, Morimoto Y, Tanaka T, et al. 2006. Gender difference in unstimulated whole saliva flow rate and salivary gland sizes. *Archives of oral biology* 51: 1055-60
- Insel TR, Harbaugh CR. 1989. Lesions of the hypothalamic paraventricular nucleus disrupt the initiation of maternal behavior. *Physiol Behav* 45: 1033-41
- Ismail PM, Amato P, Soyala SM, DeMayo FJ, Conneely OM, et al. 2003. Progesterone involvement in breast development and tumorigenesis--as revealed by progesterone receptor "knockout" and "knockin" mouse models. *Steroids* 68: 779-87
- Jacobsen PR, Christiansen S, Boberg J, Nellemann C, Hass U. 2010. Combined exposure to endocrine disrupting pesticides impairs parturition, causes pup mortality and affects sexual differentiation in rats. *Int J Androl* 33: 434-42
- Jayasinghe NR, Cope GH, Jacob S. 1990. Morphometric studies on the development and sexual dimorphism of the submandibular gland of the mouse. *J Anat* 172: 115-27
- Jones DE, Jr., Tran-Patterson R, Cui DM, Davin D, Estell KP, Miller DM. 1995. Epidermal growth factor secreted from the salivary gland is necessary for liver regeneration. *Am J Physiol* 268: G872-8
- Junqueira LC, Fajer A, et al. 1948. Biochemical and histochemical observations on the sexual dimorphism of mouse submaxillary glands. *The Biological bulletin* 95: 243
- Just T, Pau HW, Engel U, Hummel T. 2008. Cephalic phase insulin release in healthy humans after taste stimulation? *Appetite* 51: 622-7
- Kalfa N, Paris F, Soyer-Gobillard MO, Daures JP, Sultan C. 2011. Prevalence of hypospadias in grandsons of women exposed to diethylstilbestrol during pregnancy: a multigenerational national cohort study. *Fertility and sterility* 95: 2574-7
- Kanayama T, Kobayashi N, Mamiya S, Nakanishi T, Nishikawa J. 2005. Organotin compounds promote adipocyte differentiation as agonists of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma/retinoid X receptor pathway. *Molecular pharmacology* 67: 766-74
- Kang JH, Kondo F, Katayama Y. 2006. Human exposure to bisphenol A. *Toxicology* 226: 79-89
- Kato S, Sato T, Watanabe T, Takemasa S, Masuhiro Y, et al. 2005. Function of nuclear sex hormone receptors in gene regulation. *Cancer Chemother Pharmacol* 56 Suppl 1: 4-9
- Kawai K, Sugimoto K, Nakashima K, Miura H, Ninomiya Y. 2000. Leptin as a modulator of sweet taste sensitivities in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 11044-9
- Kebir O, Krebs MO. 2012. Diethylstilbestrol and risk of psychiatric disorders: a critical review and new insights. *The world journal of biological psychiatry : the official journal of the World Federation of Societies of Biological Psychiatry* 13: 84-95

- Kenney NJ, Redick JH. 1980. Effects of ovariectomy and subsequent estradiol replacement on intake of sweet solutions. *Physiol Behav* 24: 807-9
- Kim JY, Jo KJ, Kim OS, Kim BJ, Kang DW, et al. 2010. Parenteral 17beta-estradiol decreases fasting blood glucose levels in non-obese mice with short-term ovariectomy. *Life Sci* 87: 358-66
- Kirchner S, Kieu T, Chow C, Casey S, Blumberg B. 2010. Prenatal exposure to the environmental obesogen tributyltin predisposes multipotent stem cells to become adipocytes. *Molecular endocrinology* 24: 526-39
- Kissane JM, Robins E. 1958. The fluorometric measurement of deoxyribonucleic acid in animal tissues with special reference to the central nervous system. *J Biol Chem* 233: 184-8
- Kortenkamp A. 2007. Ten years of mixing cocktails: a review of combination effects of endocrine-disrupting chemicals. *Environ Health Perspect* 115 Suppl 1: 98-105
- Kortenkamp A, Altenburger R. 1998. Synergisms with mixtures of xenoestrogens: a reevaluation using the method of isoboles. *The Science of the total environment* 221: 59-73
- Kouidhi W, Berges R, Tiffon C, Desmetz C, El May M, et al. 2012a. Perinatal exposure to xenoestrogens impacts sweet preference and submandibular development in male rats. *Oral Diseases*
- Kouidhi W, Desmetz C, Nahdi A, Berges R, Cravedi JP, et al. 2012b. In Utero and Lactational Exposure to Low-Dose Genistein-Vinclozolin Mixture Affects the Development and Growth Factors mRNA Expressions of the Submandibular Salivary Gland in Immature Female Rats. *Toxicologic pathology*
- Kousvelari E, Tabak LA. 1991. Genetic regulation of salivary proteins in rodents. *Crit Rev Oral Biol Med* 2: 139-51
- Krecek J, Novakova V, Stibrak K. 1972. Sex differences in the taste preference for a salt solution in the rat. *Physiology & behavior* 8: 183-8
- Kristensen K, Pedersen SB, Richelsen B. 1999. Regulation of leptin by steroid hormones in rat adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 259: 624-30
- Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, et al. 1997. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 138: 863-70
- Kundakovic M, Champagne FA. 2011. Epigenetic perspective on the developmental effects of bisphenol A. *Brain, behavior, and immunity* 25: 1084-93
- Kuo CC, Huang JK, Chou CT, Cheng JS, Tsai JY, et al. 2011. Effect of bisphenol A on Ca(2+) fluxes and viability in Madin-Darby canine renal tubular cells. *Drug Chem Toxicol* 34: 454-61
- Kurzer MS, Xu X. 1997. Dietary phytoestrogens. *Annual review of nutrition* 17: 353-81

- Laivuori H, Gallaher MJ, Collura L, Crombleholme WR, Markovic N, et al. 2006. Relationships between maternal plasma leptin, placental leptin mRNA and protein in normal pregnancy, pre-eclampsia and intrauterine growth restriction without pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod* 12: 551-6
- Lang IA, Galloway TS, Scarlett A, Henley WE, Depledge M, et al. 2008. Association of urinary bisphenol A concentration with medical disorders and laboratory abnormalities in adults. *Jama* 300: 1303-10
- Lassiter TL, Brimijoin S. 2008. Rats gain excess weight after developmental exposure to the organophosphorothionate pesticide, chlorpyrifos. *Neurotoxicol Teratol* 30: 125-30
- Latendresse JR, Newbold RR, Weis CC, Delclos KB. 2001. Polycystic kidney disease induced in F(1) Sprague-Dawley rats fed para-nonylphenol in a soy-free, casein-containing diet. *Toxicol Sci* 62: 140-7
- Laugerette F, Passilly-Degrace P, Patris B, Niot I, Febbraio M, et al. 2005. CD36 involvement in orosensory detection of dietary lipids, spontaneous fat preference, and digestive secretions. *J Clin Invest* 115: 3177-84
- Lawrence AM, Tan S, Hojvat S, Kirsteins L. 1977. Salivary gland hyperglycemic factor: an extrapancreatic source of glucagon-like material. *Science* 195: 70-2
- Lazic M, Aird F, Levine JE, Dunaif A. 2011. Prenatal androgen treatment alters body composition and glucose homeostasis in male rats. *J Endocrinol* 208: 293-300
- Lehraiki A, Messiaen S, Berges R, Canivenc-Lavier MC, Auger J, et al. 2011. Antagonistic effects of gestational dietary exposure to low-dose vinclozolin and genistein on rat fetal germ cell development. *Reprod Toxicol* 31: 424-30
- Lemini C, Hernandez A, Jaimez R, Franco Y, Avila ME, Castell A. 2004. Morphometric analysis of mice uteri treated with the preservatives methyl, ethyl, propyl, and butylparaben. *Toxicology and industrial health* 20: 123-32
- Lenard NR, Berthoud HR. 2008. Central and peripheral regulation of food intake and physical activity: pathways and genes. *Obesity (Silver Spring)* 16 Suppl 3: S11-22
- Lephart ED, Porter JP, Lund TD, Bu L, Setchell KD, et al. 2004. Dietary isoflavones alter regulatory behaviors, metabolic hormones and neuroendocrine function in Long-Evans male rats. *Nutr Metab (Lond)* 1: 16
- Leroy P, Dessolin S, Villageois P, Moon BC, Friedman JM, et al. 1996. Expression of ob gene in adipose cells. Regulation by insulin. *J Biol Chem* 271: 2365-8
- Lévy F, Nowak R, Schaal B. 2001. La mère et le jeune : échange comportementaux et régulations physiologiques. In *La reproduction chez les mammifères et l'Homme*
- Li HJ, Yao B, Liang W, Wang YM, Xu QL, Huang YF. 2005. Localization and potential function of androgen receptor in rat salivary gland. *Asian J Androl* 7: 295-301
- Li L, Haynes MP, Bender JR. 2003. Plasma membrane localization and function of the estrogen receptor alpha variant (ER46) in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 4807-12

- Li X, Lonard DM, O'Malley BW. 2004. A contemporary understanding of progesterone receptor function. *Mech Ageing Dev* 125: 669-78
- Lilienthal H, Roth-Harer A, Hack A, Altmann L, Winneke G. 2005. Developmental neurotoxicity of PHAHs: Endocrine-mediated and general behavioral endpoints in adult male rats. *Environ Toxicol Pharmacol* 19: 757-9
- Liu D, Diorio J, Tannenbaum B, Caldji C, Francis D, et al. 1997. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science* 277: 1659-62
- Liu XF, Bagchi MK. 2004. Recruitment of distinct chromatin-modifying complexes by tamoxifen-complexed estrogen receptor at natural target gene promoters in vivo. *J Biol Chem* 279: 15050-8
- Lonard DM, Tsai SY, O'Malley BW. 2004. Selective estrogen receptor modulators 4-hydroxytamoxifen and raloxifene impact the stability and function of SRC-1 and SRC-3 coactivator proteins. *Molecular and cellular biology* 24: 14-24
- Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, et al. 1995. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83: 835-9
- Mann PE, Babb JA. 2004. Disinhibition of maternal behavior following neurotoxic lesions of the hypothalamus in primigravid rats. *Brain research* 1025: 51-8
- Mantzoros CS, Magkos F, Brinkoetter M, Sienkiewicz E, Dardeno TA, et al. 2011. Leptin in human physiology and pathophysiology. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 301: E567-84
- Markey CM, Luque EH, Munoz De Toro M, Sonnenschein C, Soto AM. 2001. In utero exposure to bisphenol A alters the development and tissue organization of the mouse mammary gland. *Biol Reprod* 65: 1215-23
- Martini PG, Katzenellenbogen BS. 2003. Modulation of estrogen receptor activity by selective coregulators. *J Steroid Biochem Mol Biol* 85: 117-22
- Massaad C, Barouki R. 1999. Xénohormones : mode d'action et effets suspectés *MS. Médecine sciences* vol. 15: pp. 1362-69
- Matsumura S, Mizushige T, Yoneda T, Iwanaga T, Tsuzuki S, et al. 2007. GPR expression in the rat taste bud relating to fatty acid sensing. *Biomed Res* 28: 49-55
- Matsuzawa Y. 2005. White adipose tissue and cardiovascular disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 19: 637-47
- Mayer AD, Faris PL, Komisaruk BR, Rosenblatt JS. 1985. Opiate antagonism reduces placentophagia and pup cleaning by parturient rats. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 22: 1035-44
- McCann SM, Gutkowska J, Antunes-Rodrigues J. 2003. Neuroendocrine control of body fluid homeostasis. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica ... [et al.]* 36: 165-81

- McCaughey SA, Scott TR. 1998. The taste of sodium. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 22: 663-76
- McGivern RF, Henschel DM. 1990. Interaction of naltrexone with postnatal administration of testosterone and estrogen on neurobehavioral sexual differentiation in rats. *Horm Behav* 24: 20-39
- Mehansho H, Carlson DM. 1983. Induction of protein and glycoprotein synthesis in rat submandibular glands by isoproterenol. *J Biol Chem* 258: 6616-20
- Melnick M, Jaskoll T. 2000. Mouse submandibular gland morphogenesis: a paradigm for embryonic signal processing. *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists* 11: 199-215
- Melzer D, Rice NE, Lewis C, Henley WE, Galloway TS. 2010. Association of urinary bisphenol a concentration with heart disease: evidence from NHANES 2003/06. *PLoS one* 5: e8673
- Miyawaki J, Sakayama K, Kato H, Yamamoto H, Masuno H. 2007. Perinatal and postnatal exposure to bisphenol a increases adipose tissue mass and serum cholesterol level in mice. *J Atheroscler Thromb* 14: 245-52
- Moggs JG, Orphanides G. 2001. Estrogen receptors: orchestrators of pleiotropic cellular responses. *EMBO Rep* 2: 775-81
- Mogi M, Inagaki H, Kojima K, Minami M, Harada M. 1995. Transforming growth factor- α in human submandibular gland and saliva. *J Immunoassay* 16: 379-94
- Moles A, Sarli C, Bartolomucci A, D'Amato FR. 2008. Interaction with stressed mothers affects corticosterone levels in pups after reunion and impairs the response to dexamethasone in adult mice. *Psychoneuroendocrinology* 33: 462-70
- Molina-Molina JM, Hillenweck A, Jouanin I, Zalko D, Cravedi JP, et al. 2006. Steroid receptor profiling of vinclozolin and its primary metabolites. *Toxicol Appl Pharmacol* 216: 44-54
- Monjo M, Pujol E, Roca P. 2005. α 2- to β 3-Adrenoceptor switch in 3T3-L1 preadipocytes and adipocytes: modulation by testosterone, 17 β -estradiol, and progesterone. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 289: E145-50
- Moore LB, Maglich JM, McKee DD, Wisely B, Willson TM, et al. 2002. Pregnane X receptor (PXR), constitutive androstane receptor (CAR), and benzoate X receptor (BXR) define three pharmacologically distinct classes of nuclear receptors. *Mol Endocrinol* 16: 977-86
- Moore PA, Guggenheimer J, Etzel KR, Weyant RJ, Orchard T. 2001. Type 1 diabetes mellitus, xerostomia, and salivary flow rates. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* 92: 281-91
- Moore TO, Karom M, O'Farrell L. 2004. The neurobehavioral effects of phytoestrogens in male Syrian hamsters. *Brain Res* 1016: 102-10
- Morris-Wiman J, Segó R, Brinkley L, Dolce C. 2000. The effects of sialoadenectomy and exogenous EGF on taste bud morphology and maintenance. *Chem Senses* 25: 9-19

- Mortensen A, Kulling SE, Schwartz H, Rowland I, Ruefer CE, et al. 2009. Analytical and compositional aspects of isoflavones in food and their biological effects. *Molecular nutrition & food research* 53 Suppl 2: S266-309
- Mowa CN, Iwanaga T. 2000. Differential distribution of oestrogen receptor-alpha and -beta mRNAs in the female reproductive organ of rats as revealed by in situ hybridization. *J Endocrinol* 165: 59-66
- Musatov S, Chen W, Pfaff DW, Mobbs CV, Yang XJ, et al. 2007. Silencing of estrogen receptor alpha in the ventromedial nucleus of hypothalamus leads to metabolic syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 2501-6
- Myers P, Hessler W. 2007. Does 'the dose make the poison?'. <http://www.environmentalhealthnews.org/sciencebackground/2007/2007-0415nmdrc.html>
- Nagasawa M, Okabe S, Mogi K, Kikusui T. 2012. Oxytocin and mutual communication in mother-infant bonding. *Front Hum Neurosci* 6: 31
- Nagata C, Takatsuka N, Inaba S, Kawakami N, Shimizu H. 1998. Effect of soymilk consumption on serum estrogen concentrations in premenopausal Japanese women. *J Natl Cancer Inst* 90: 1830-5
- Nah WH, Park MJ, Gye MC. 2011. Effects of early prepubertal exposure to bisphenol A on the onset of puberty, ovarian weights, and estrous cycle in female mice. *Clinical and experimental reproductive medicine* 38: 75-81
- Nakamura K, Itoh K, Dai H, Han L, Wang X, et al. 2011. Prenatal and lactational exposure to low-doses of bisphenol A alters adult mice behavior. *Brain Dev*
- Nakamura K, Itoh K, Dai H, Han L, Wang X, et al. 2012. Prenatal and lactational exposure to low-doses of bisphenol A alters adult mice behavior. *Brain & development* 34: 57-63
- Nanjappa MK, Simon L, Akingbemi BT. 2012. The industrial chemical bisphenol A (BPA) interferes with proliferative activity and development of steroidogenic capacity in rat Leydig cells. *Biol Reprod* 86: 135, 1-12
- Nashida T, Sato R, Imai A, Shimomura H. 2010. Gene expression profiles of the three major salivary glands in rats. *Biomed Res* 31: 387-99
- Newbold R. 1995. Cellular and molecular effects of developmental exposure to diethylstilbestrol: implications for other environmental estrogens. *Environ Health Perspect* 103 Suppl 7: 83-7
- Newbold RR. 2010. Impact of environmental endocrine disrupting chemicals on the development of obesity. *Hormones* 9: 206-17
- Newbold RR, Hanson RB, Jefferson WN, Bullock BC, Haseman J, McLachlan JA. 1998. Increased tumors but uncompromised fertility in the female descendants of mice exposed developmentally to diethylstilbestrol. *Carcinogenesis* 19: 1655-63

- Newbold RR, Hanson RB, Jefferson WN, Bullock BC, Haseman J, McLachlan JA. 2000. Proliferative lesions and reproductive tract tumors in male descendants of mice exposed developmentally to diethylstilbestrol. *Carcinogenesis* 21: 1355-63
- Newbold RR, Jefferson WN, Padilla-Banks E. 2009. Prenatal exposure to bisphenol a at environmentally relevant doses adversely affects the murine female reproductive tract later in life. *Environ Health Perspect* 117: 879-85
- Newbold RR, Padilla-Banks E, Jefferson WN, Heindel JJ. 2008. Effects of endocrine disruptors on obesity. *Int J Androl* 31: 201-8
- Newbold RR, Padilla-Banks E, Snyder RJ, Jefferson WN. 2005. Developmental exposure to estrogenic compounds and obesity. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 73: 478-80
- Noguchi S, Ohba Y, Oka T. 1991. Effect of salivary epidermal growth factor on wound healing of tongue in mice. *Am J Physiol* 260: E620-5
- Nohara K, Zhang Y, Waraich RS, Laque A, Tiano JP, et al. 2011. Early-life exposure to testosterone programs the hypothalamic melanocortin system. *Endocrinology* 152: 1661-9
- Ntambi JM, Young-Cheul K. 2000. Adipocyte differentiation and gene expression. *J Nutr* 130: 3122S-26S
- Nunez AA, Kannan K, Giesy JP, Fang J, Clemens LG. 2001. Effects of bisphenol A on energy balance and accumulation in brown adipose tissue in rats. *Chemosphere* 42: 917-22
- Nussey S, Whitehead S. 2001. Principles of endocrinology. In *Endocrinology: An Integrated Approach.*, ed. BS Publishers
- Ogawa S, Chan J, Gustafsson JA, Korach KS, Pfaff DW. 2003. Estrogen increases locomotor activity in mice through estrogen receptor alpha: specificity for the type of activity. *Endocrinology* 144: 230-9
- Ogryzko VV, Schiltz RL, Russanova V, Howard BH, Nakatani Y. 1996. The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* 87: 953-9
- Palanza P, Gioiosa L, vom Saal FS, Parmigiani S. 2008. Effects of developmental exposure to bisphenol A on brain and behavior in mice. *Environmental research* 108: 150-7
- Palanza P, Morellini F, Parmigiani S, vom Saal FS. 2002a. Ethological methods to study the effects of maternal exposure to estrogenic endocrine disruptors: a study with methoxychlor. *Neurotoxicol Teratol* 24: 55-69
- Palanza PL, Howdeshell KL, Parmigiani S, vom Saal FS. 2002b. Exposure to a low dose of bisphenol A during fetal life or in adulthood alters maternal behavior in mice. *Environ Health Perspect* 110 Suppl 3: 415-22
- Pamir E, Ali D, Ismail C, Sanli E, Ali K, Mustafa T. 2006. The effects of high dose progesterone on neural tube development in early chick embryos. *Neurol India* 54: 178-81

- Panzica GC, Viglietti-Panzica C, Mura E, Quinn MJ, Jr., Lavoie E, et al. 2007. Effects of xenoestrogens on the differentiation of behaviorally-relevant neural circuits. *Front Neuroendocrinol* 28: 179-200
- Parini P, Angelin B, Stavreus-Evers A, Freyschuss B, Eriksson H, Rudling M. 2000. Biphasic effects of the natural estrogen 17beta-estradiol on hepatic cholesterol metabolism in intact female rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 1817-23
- Park HJ, Della-Fera MA, Hausman DB, Rayalam S, Ambati S, Baile CA. 2009. Genistein inhibits differentiation of primary human adipocytes. *J Nutr Biochem* 20: 140-8
- Park HJ, Yang JY, Ambati S, Della-Fera MA, Hausman DB, et al. 2008. Combined effects of genistein, quercetin, and resveratrol in human and 3T3-L1 adipocytes. *J Med Food* 11: 773-83
- Patisaul HB, Dindo M, Whitten PL, Young LJ. 2001. Soy isoflavone supplements antagonize reproductive behavior and estrogen receptor alpha- and beta-dependent gene expression in the brain. *Endocrinology* 142: 2946-52
- Patisaul HB, Jefferson W. 2010. The pros and cons of phytoestrogens. *Frontiers in neuroendocrinology* 31: 400-19
- Patisaul HB, Luskin JR, Wilson ME. 2004. A soy supplement and tamoxifen inhibit sexual behavior in female rats. *Horm Behav* 45: 270-7
- Patisaul HB, Sullivan AW, Radford ME, Walker DM, Adewale HB, et al. 2012. Anxiogenic effects of developmental bisphenol a exposure are associated with gene expression changes in the juvenile rat amygdala and mitigated by soy. *PLoS One* 7: e43890
- Payne J, Rajapakse N, Wilkins M, Kortenkamp A. 2000. Prediction and assessment of the effects of mixtures of four xenoestrogens. *Environ Health Perspect* 108: 983-7
- Pedersen CA, Ascher JA, Monroe YL, Prange AJ, Jr. 1982. Oxytocin induces maternal behavior in virgin female rats. *Science* 216: 648-50
- Pedersen CA, Prange AJ, Jr. 1979. Induction of maternal behavior in virgin rats after intracerebroventricular administration of oxytocin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76: 6661-5
- Pelletier G, Labrie C, Labrie F. 2000. Localization of oestrogen receptor alpha, oestrogen receptor beta and androgen receptors in the rat reproductive organs. *J Endocrinol* 165: 359-70
- Pelletier G, Luu-The V, Li S, Labrie F. 2004. Localization and estrogenic regulation of androgen receptor mRNA expression in the mouse uterus and vagina. *J Endocrinol* 180: 77-85
- Penicaud L. 2010. Relationships between adipose tissues and brain: what do we learn from animal studies? *Diabetes Metab* 36 Suppl 3: S39-44
- Penza M, Montani C, Romani A, Vignolini P, Pampaloni B, et al. 2006. Genistein affects adipose tissue deposition in a dose-dependent and gender-specific manner. *Endocrinology* 147: 5740-51

- Phrakonkham P. 2007. Actions différentielles de xéno-hormones alimentaires sur les organes reproducteurs, le foie et le tissu adipeux chez le rat femelle: aspects endocriniens, métaboliques et morphogénétiques en relation avec les processus de cancérogénèse.
- Phrakonkham P, Viengchareun S, Belloir C, Lombes M, Artur Y, Canivenc-Lavier MC. 2008. Dietary xenoestrogens differentially impair 3T3-L1 preadipocyte differentiation and persistently affect leptin synthesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 110: 95-103
- Pinheiro J, Bates D, DebRoy S, Sarkar D, Team RDC. 2012. nlme. In *Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R package version 3.1-103*
- Poindron P. 2005. Mechanisms of activation of maternal behaviour in mammals. *Reproduction, nutrition, development* 45: 341-51
- Porrini S, Belloni V, Della Seta D, Farabollini F, Giannelli G, Dessi-Fulgheri F. 2005. Early exposure to a low dose of bisphenol A affects socio-sexual behavior of juvenile female rats. *Brain research bulletin* 65: 261-6
- Pratt WB, Galigniana MD, Morishima Y, Murphy PJ. 2004. Role of molecular chaperones in steroid receptor action. *Essays in biochemistry* 40: 41-58
- Proctor GB, Asking B, Garrett JR. 1991. Serum amylase of non-parotid and non-pancreatic origin increases on feeding in rats and may originate from the liver. *Comparative biochemistry and physiology. B, Comparative biochemistry* 98: 631-5
- Rasier G, Parent AS, Gerard A, Denooz R, Lebrethon MC, et al. 2008. Mechanisms of interaction of endocrine-disrupting chemicals with glutamate-evoked secretion of gonadotropin-releasing hormone. *Toxicol Sci* 102: 33-41
- Rat P, Korwin-Zmijowska C, Warnet JM, Adolphe M. 1994. New in vitro fluorimetric microtitration assays for toxicological screening of drugs. *Cell biology and toxicology* 10: 329-37
- Rayalam S, Della-Fera MA, Yang JY, Park HJ, Ambati S, Baile CA. 2007. Resveratrol potentiates genistein's antiadipogenic and proapoptotic effects in 3T3-L1 adipocytes. *J Nutr* 137: 2668-73
- Razandi M, Pedram A, Greene GL, Levin ER. 1999. Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of ERalpha and ERbeta expressed in Chinese hamster ovary cells. *Mol Endocrinol* 13: 307-19
- Relic B, Zeddou M, Desoroux A, Beguin Y, de Seny D, Malaise MG. 2009. Genistein induces adipogenesis but inhibits leptin induction in human synovial fibroblasts. *Lab Invest* 89: 811-22
- Riu A, Grimaldi M, le Maire A, Bey G, Phillips K, et al. 2011. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is a target for halogenated analogs of bisphenol A. *Environ Health Perspect* 119: 1227-32
- Rocha M, Bing C, Williams G, Puerta M. 2004. Physiologic estradiol levels enhance hypothalamic expression of the long form of the leptin receptor in intact rats. *J Nutr Biochem* 15: 328-34

- Rodin J, Moskowitz HR, Bray GA. 1976. Relationship between obesity, weight loss, and taste responsiveness. *Physiol Behav* 17: 591-7
- Roepke TA. 2009. Oestrogen modulates hypothalamic control of energy homeostasis through multiple mechanisms. *J Neuroendocrinol* 21: 141-50
- Ropero AB, Alonso-Magdalena P, Garcia-Garcia E, Ripoll C, Fuentes E, Nadal A. 2008. Bisphenol-A disruption of the endocrine pancreas and blood glucose homeostasis. *Int J Androl* 31: 194-200
- Rosenblum L, Moltz H, eds. 1983. *Symbiosis in parent-offspring interactions*, Vols. 7-44: Gubernick, DJ, Alberts, JR. . New York: Plenum press ed.
- Rougeot C, Rosinski-Chupin I, Mathison R, Rougeon F. 2000. Rodent submandibular gland peptide hormones and other biologically active peptides. *Peptides* 21: 443-55
- Rubin BS, Lenkowski JR, Schaeberle CM, Vandenberg LN, Ronsheim PM, Soto AM. 2006. Evidence of altered brain sexual differentiation in mice exposed perinatally to low, environmentally relevant levels of bisphenol A. *Endocrinology* 147: 3681-91
- Rubin BS, Murray MK, Damassa DA, King JC, Soto AM. 2001. Perinatal exposure to low doses of bisphenol A affects body weight, patterns of estrous cyclicity, and plasma LH levels. *Environ Health Perspect* 109: 675-80
- Ruhlen RL, Howdeshell KL, Mao J, Taylor JA, Bronson FH, et al. 2008. Low phytoestrogen levels in feed increase fetal serum estradiol resulting in the "fetal estrogenization syndrome" and obesity in CD-1 mice. *Environ Health Perspect* 116: 322-8
- Salian S, Doshi T, Vanage G. 2009a. Impairment in protein expression profile of testicular steroid receptor coregulators in male rat offspring perinatally exposed to Bisphenol A. *Life Sci* 85: 11-8
- Salian S, Doshi T, Vanage G. 2009b. Neonatal exposure of male rats to Bisphenol A impairs fertility and expression of sertoli cell junctional proteins in the testis. *Toxicology* 265: 56-67
- Salian S, Doshi T, Vanage G. 2009c. Perinatal exposure of rats to Bisphenol A affects the fertility of male offspring. *Life Sci* 85: 742-52
- Sato T, Matsumoto T, Yamada T, Watanabe T, Kawano H, Kato S. 2003. Late onset of obesity in male androgen receptor-deficient (AR KO) mice. *Biochemical and biophysical research communications* 300: 167-71
- Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Jr., Seeley RJ, Baskin DG. 2000. Central nervous system control of food intake. *Nature* 404: 661-71
- Sclafani A. 2007. Fat and sugar flavor preference and acceptance in C57BL/6J and 129 mice: experience attenuates strain differences. *Physiol Behav* 90: 602-11
- Selcer KW, Smith S, Clemens JW, Palmer BD. 2005. Androgen receptor in the oviduct of the turtle, *Trachemys scripta*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 141: 61-70

- Setchell KD, Zimmer-Nechemias L, Cai J, Heubi JE. 1998. Isoflavone content of infant formulas and the metabolic fate of these phytoestrogens in early life. *Am J Clin Nutr* 68: 1453S-61S
- Shang Y, Brown M. 2002. Molecular determinants for the tissue specificity of SERMs. *Science* 295: 2465-8
- Shankar A, Teppala S. 2011. Relationship between urinary bisphenol A levels and diabetes mellitus. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 96: 3822-6
- Sharpe P, ed. 2010. *Frontiers of Oral Biology* Vols. 14.
- Sheehan T, Numan M. 2002. Estrogen, progesterone, and pregnancy termination alter neural activity in brain regions that control maternal behavior in rats. *Neuroendocrinology* 75: 12-23
- Sheflin LG, Brooks EM, Keegan BP, Spaulding SW. 1996. Increased epidermal growth factor expression produced by testosterone in the submaxillary gland of female mice is accompanied by changes in poly-A tail length and periodicity. *Endocrinology* 137: 2085-92
- Shir Y, Campbell JN, Raja SN, Seltzer Z. 2002. The correlation between dietary soy phytoestrogens and neuropathic pain behavior in rats after partial denervation. *Anesthesia and analgesia* 94: 421-6, table of contents
- Skinner MK, Anway MD, Savenkova MI, Gore AC, Crews D. 2008. Transgenerational epigenetic programming of the brain transcriptome and anxiety behavior. *PLoS One* 3: e3745
- Slamberova R, Szilagyi B, Vathy I. 2001. Repeated morphine administration during pregnancy attenuates maternal behavior. *Psychoneuroendocrinology* 26: 565-76
- Smith-Kirwin SM, O'Connor DM, De Johnston J, Lancey ED, Hassink SG, Funanage VL. 1998. Leptin expression in human mammary epithelial cells and breast milk. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 1810-3
- Smith CL, O'Malley BW. 2004. Coregulator function: a key to understanding tissue specificity of selective receptor modulators. *Endocr Rev* 25: 45-71
- Smith D, Jr., Johnson M, Nagy T. 2009. Precision and accuracy of bioimpedance spectroscopy for determination of in vivo body composition in rats. *International journal of body composition research* 7: 21-26
- Somm E, Schwitzgebel VM, Toulotte A, Cederroth CR, Combescure C, et al. 2009. Perinatal exposure to bisphenol a alters early adipogenesis in the rat. *Environ Health Perspect* 117: 1549-55
- Song RX, Barnes CJ, Zhang Z, Bao Y, Kumar R, Santen RJ. 2004. The role of Shc and insulin-like growth factor 1 receptor in mediating the translocation of estrogen receptor alpha to the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 2076-81
- Soriano S, Alonso-Magdalena P, Garcia-Arevalo M, Novials A, Muhammed SJ, et al. 2012. Rapid insulinotropic action of low doses of bisphenol-A on mouse and human islets of Langerhans: role of estrogen receptor beta. *PloS one* 7: e31109

- Srivastava A, Wang J, Zhou H, Melvin JE, Wong DT. 2008. Age and gender related differences in human parotid gland gene expression. *Archives of oral biology* 53: 1058-70
- Stachenfeld NS, Taylor HS. 2009. Sex hormone effects on body fluid and sodium regulation in women with and without exercise-associated hyponatremia. *J Appl Physiol* 107: 864-72
- Stroheker T, Cabaton N, Berges R, Lamothe V, Lhuguenot JC, Chagnon MC. 2003a. Influence of dietary soy isoflavones on the accessory sex organs of the Wistar rat. *Food Chem Toxicol* 41: 1175-83
- Stroheker T, Chagnon MC, Pinnert MF, Berges R, Canivenc-Lavier MC. 2003b. Estrogenic effects of food wrap packaging xenoestrogens and flavonoids in female Wistar rats: a comparative study. *Reprod Toxicol* 17: 421-32
- Strom BL, Schinnar R, Ziegler EE, Barnhart KT, Sammel MD, et al. 2001. Exposure to soy-based formula in infancy and endocrinological and reproductive outcomes in young adulthood. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 286: 807-14
- Stump DG, Beck MJ, Radovsky A, Garman RH, Freshwater LL, et al. 2010. Developmental neurotoxicity study of dietary bisphenol A in Sprague-Dawley rats. *Toxicol Sci* 115: 167-82
- Sugiyama MG, Agellon LB. 2012. Sex differences in lipid metabolism and metabolic disease risk. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 90: 124-41
- Sun SY, Huang J, Meng MJ, Lu JH, Hoher B, et al. 2012. Improvement of lipid profile and reduction of body weight by shan he jian fei granules in high fat diet-induced obese rats. *Clin Lab* 58: 81-7
- Syvala H, Vienonen A, Zhuang YH, Kivineva M, Ylikomi T, Tuohimaa P. 1998. Evidence for enhanced ubiquitin-mediated proteolysis of the chicken progesterone receptor by progesterone. *Life sciences* 63: 1505-12
- Szkudelski T, Nogowski L, Pruszyńska-Oszmerek E, Kaczmarek P, Szkudelska K. 2005. Genistein restricts leptin secretion from rat adipocytes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 96: 301-7
- Tabb MM, Blumberg B. 2006. New modes of action for endocrine-disrupting chemicals. *Mol Endocrinol* 20: 475-82
- Takai N, Shida T, Uehashi K, Ueda Y, Yoshida Y. 1998. Cholecystokinin as neurotransmitter and neuromodulator in parasympathetic secretion in the rat submandibular gland. *Annals of the New York Academy of Sciences* 842: 199-203
- Takeda M, Imaizumi M, Fushiki T. 2000. Preference for vegetable oils in the two-bottle choice test in mice. *Life sciences* 67: 197-204
- Takemura H, Ma J, Sayama K, Terao Y, Zhu BT, Shimoi K. 2005. In vitro and in vivo estrogenic activity of chlorinated derivatives of bisphenol A. *Toxicology* 207: 215-21
- Tang QQ, Zhang JW, Daniel Lane M. 2004. Sequential gene promoter interactions of C/EBPbeta, C/EBPalpha, and PPARgamma during adipogenesis. *Biochemical and biophysical research communications* 319: 235-9

- Taylor RW, Jones IE, Williams SM, Goulding A. 2002. Body fat percentages measured by dual-energy X-ray absorptiometry corresponding to recently recommended body mass index cutoffs for overweight and obesity in children and adolescents aged 3-18 y. *Am J Clin Nutr* 76: 1416-21
- Tetel MJ. 2009. Modulation of steroid action in the central and peripheral nervous systems by nuclear receptor coactivators. *Psychoneuroendocrinology* 34 Suppl 1: S9-19
- Tharp AP, Maffini MV, Hunt PA, VandeVoort CA, Sonnenschein C, Soto AM. 2012. Bisphenol A alters the development of the rhesus monkey mammary gland. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 8190-5
- Thavathiru E, Jana NR, De PK. 1999. Abundant secretory lipocalins displaying male and lactation-specific expression in adult hamster submandibular gland. cDNA cloning and sex hormone-regulated repression. *European journal of biochemistry / FEBS* 266: 467-76
- Thomas P, Pang Y, Filardo EJ, Dong J. 2005. Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology* 146: 624-32
- Thula TT, Schultz G, Tran-Son-Tay R, Batich C. 2005. Effects of EGF and bFGF on irradiated parotid glands. *Ann Biomed Eng* 33: 685-95
- Titus-Ernstoff L, Troisi R, Hatch EE, Palmer JR, Hyer M, et al. 2010. Birth defects in the sons and daughters of women who were exposed in utero to diethylstilbestrol (DES). *International journal of andrology* 33: 377-84
- Toda M, Tsukinoki R, Morimoto K. 2007. Measurement of salivary adiponectin levels. *Acta diabetologica* 44: 20-2
- Toran-Allerand CD, Guan X, MacLusky NJ, Horvath TL, Diano S, et al. 2002. ER-X: a novel, plasma membrane-associated, putative estrogen receptor that is regulated during development and after ischemic brain injury. *J Neurosci* 22: 8391-401
- Treister NS, Richards SM, Lombardi MJ, Rowley P, Jensen RV, Sullivan DA. 2005. Sex-related differences in gene expression in salivary glands of BALB/c mice. *Journal of dental research* 84: 160-5
- Tuomisto JT, Viluksela M, Pohjanvirta R, Tuomisto J. 2000. Changes in food intake and food selection in rats after 2,3,7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) exposure. *Pharmacol Biochem Behav* 65: 381-7
- Tyl RW, Myers CB, Marr MC, Sloan CS, Castillo NP, et al. 2008. Two-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD-1 (Swiss) mice. *Toxicol Sci* 104: 362-84
- Tyl RW, Myers CB, Marr MC, Thomas BF, Keimowitz AR, et al. 2002. Three-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD Sprague-Dawley rats. *Toxicol Sci* 68: 121-46
- Ulleras E, Ohlsson A, Oskarsson A. 2008. Secretion of cortisol and aldosterone as a vulnerable target for adrenal endocrine disruption - screening of 30 selected chemicals in the human H295R cell model. *J Appl Toxicol* 28: 1045-53
- Uotinen N, Puustinen R, Pasanen S, Manninen T, Kivineva M, et al. 1999. Distribution of progesterone receptor in female mouse tissues. *Gen Comp Endocrinol* 115: 429-41

- Valassi E, Scacchi M, Cavagnini F. 2008. Neuroendocrine control of food intake. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 18: 158-68
- Vandenberg LN, Maffini MV, Schaeberle CM, Ucci AA, Sonnenschein C, et al. 2008. Perinatal exposure to the xenoestrogen bisphenol-A induces mammary intraductal hyperplasias in adult CD-1 mice. *Reprod Toxicol* 26: 210-9
- Vandenberg LN, Maffini MV, Wadia PR, Sonnenschein C, Rubin BS, Soto AM. 2007. Exposure to environmentally relevant doses of the xenoestrogen bisphenol-A alters development of the fetal mouse mammary gland. *Endocrinology* 148: 116-27
- Vankoningsloo S, Piens M, Lecocq C, Gilson A, De Pauw A, et al. 2005. Mitochondrial dysfunction induces triglyceride accumulation in 3T3-L1 cells: role of fatty acid beta-oxidation and glucose. *Journal of lipid research* 46: 1133-49
- Vatier C, Capeau J, Vigouroux C. 2010. [Leptin, a new therapeutic agent for treatment of diabetes?]. *Med Sci (Paris)* 26: 803-7
- Verkasalo PK, Appleby PN, Allen NE, Davey G, Adlercreutz H, Key TJ. 2001. Soya intake and plasma concentrations of daidzein and genistein: validity of dietary assessment among eighty British women (Oxford arm of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition). *The British journal of nutrition* 86: 415-21
- Verma P, Mittal S, Ghildiyal A, Chaudhary L, Mahajan KK. 2007. Salt preference: age and sex related variability. *Indian journal of physiology and pharmacology* 51: 91-5
- Vom Saal FS, Nagel SC, Coe BL, Angle BM, Taylor JA. 2012. The estrogenic endocrine disrupting chemical bisphenol A (BPA) and obesity. *Mol Cell Endocrinol* 354: 74-84
- vom Saal FS, Welshons WV. 2006. Large effects from small exposures. II. The importance of positive controls in low-dose research on bisphenol A. *Environ Res* 100: 50-76
- von Bultzingslowen I, Sollecito TP, Fox PC, Daniels T, Jonsson R, et al. 2007. Salivary dysfunction associated with systemic diseases: systematic review and clinical management recommendations. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* 103 Suppl: S57 e1-15
- Wang X, Magkos F, Mittendorfer B. 2011. Sex differences in lipid and lipoprotein metabolism: it's not just about sex hormones. *J Clin Endocrinol Metab* 96: 885-93
- Watson CS, Alyea RA, Jeng YJ, Kochukov MY. 2007. Nongenomic actions of low concentration estrogens and xenoestrogens on multiple tissues. *Mol Cell Endocrinol* 274: 1-7
- Wei J, Lin Y, Li Y, Ying C, Chen J, et al. 2011. Perinatal exposure to bisphenol A at reference dose predisposes offspring to metabolic syndrome in adult rats on a high-fat diet. *Endocrinology* 152: 3049-61
- Weihua Z, Ekman J, Almkvist A, Saji S, Wang L, et al. 2002. Involvement of androgen receptor in 17beta-estradiol-induced cell proliferation in rat uterus. *Biol Reprod* 67: 616-23

- Welshons WV, Thayer KA, Judy BM, Taylor JA, Curran EM, vom Saal FS. 2003. Large effects from small exposures. I. Mechanisms for endocrine-disrupting chemicals with estrogenic activity. *Environ Health Perspect* 111: 994-1006
- Willhite CC, Ball GL, McLellan CJ. 2008. Derivation of a bisphenol A oral reference dose (RfD) and drinking-water equivalent concentration. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 11: 69-146
- Wilson CM, McPhaul MJ. 1996. A and B forms of the androgen receptor are expressed in a variety of human tissues. *Mol Cell Endocrinol* 120: 51-7
- Wolstenholme JT, Edwards M, Shetty SR, Gatewood JD, Taylor JA, et al. 2012. Gestational exposure to bisphenol a produces transgenerational changes in behaviors and gene expression. *Endocrinology* 153: 3828-38
- Wolstenholme JT, Taylor JA, Shetty SR, Edwards M, Connelly JJ, Rissman EF. 2011. Gestational exposure to low dose bisphenol A alters social behavior in juvenile mice. *PLoS One* 6: e25448
- Woods SC, Seeley RJ, Porte D, Jr., Schwartz MW. 1998. Signals that regulate food intake and energy homeostasis. *Science* 280: 1378-83
- Wyde ME, Bartolucci E, Ueda A, Zhang H, Yan B, et al. 2003. The environmental pollutant 1,1-dichloro-2,2-bis (p-chlorophenyl)ethylene induces rat hepatic cytochrome P450 2B and 3A expression through the constitutive androstane receptor and pregnane X receptor. *Molecular pharmacology* 64: 474-81
- Xu X, Tan L, Himi T, Sadamatsu M, Tsutsumi S, et al. 2011a. Changed preference for sweet taste in adulthood induced by perinatal exposure to bisphenol A-A probable link to overweight and obesity. *Neurotoxicol Teratol*: 458-63
- Xu X, Tian D, Hong X, Chen L, Xie L. 2011b. Sex-specific influence of exposure to bisphenol-A between adolescence and young adulthood on mouse behaviors. *Neuropharmacology* 61: 565-73
- Yang RSH. 1994. Toxicology of Chemical Mixtures: Case Studies, Mechanisms, and Novel Approaches ed. SD Academic Press, CA,
- Yeh S, Hu YC, Wang PH, Xie C, Xu Q, et al. 2003. Abnormal mammary gland development and growth retardation in female mice and MCF7 breast cancer cells lacking androgen receptor. *J Exp Med* 198: 1899-908
- Yoo EJ, Chung JJ, Choe SS, Kim KH, Kim JB. 2006. Down-regulation of histone deacetylases stimulates adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 281: 6608-15
- Yu C, Tai F, Song Z, Wu R, Zhang X, He F. 2011. Pubertal exposure to bisphenol A disrupts behavior in adult C57BL/6J mice. *Environ Toxicol Pharmacol* 31: 88-99
- Zalko D, Soto AM, Dolo L, Dorio C, Rathahao E, et al. 2003. Biotransformations of bisphenol A in a mammalian model: answers and new questions raised by low-dose metabolic fate studies in pregnant CD1 mice. *Environ Health Perspect* 111: 309-19

- Zhu Y, Bond J, Thomas P. 2003. Identification, classification, and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progestin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 2237-42
- Zhu Z, Edwards RJ, Boobis AR. 2009. Increased expression of histone proteins during estrogen-mediated cell proliferation. *Environ Health Perspect* 117: 928-34