



# **Les effets des bisphénols sur le métabolisme et les réponses cellulaires des neutrophiles humains**

**Mémoire**

**Anthony Kerever**

**Maîtrise en microbiologie-immunologie - avec mémoire**  
Maître ès sciences (M. Sc.)

Québec, Canada



# **Les effets des bisphénols sur le métabolisme et les réponses cellulaires des neutrophiles humains**

**Mémoire**

**Anthony Kerever**

Sous la direction de :

**Dr Martin Pelletier**

# RÉSUMÉ

Le bisphénol A (BPA), un composé chimique largement utilisé dans la fabrication de plastiques et de résines époxy, se retrouve dans les fluides humains tels que le sang et l'urine. Il est connu que le BPA affecte, entre autres, les systèmes endocrinien, reproducteur et immunitaire en influençant le métabolisme (glycolyse et respiration mitochondriale) et les fonctions cellulaires. Les préoccupations concernant la sécurité du BPA ont conduit à son remplacement par des substituts tels que le bisphénol S (BPS). Les neutrophiles polymorphonucléaires (PMN), les leucocytes les plus abondants dans le sang, sont des cellules fortement glycolytiques en raison de leur faible nombre de mitochondries et de leur utilisation de l'oxygène pour effectuer des fonctions antimicrobiennes. En raison de cette caractéristique métabolique, nous avons émis l'hypothèse qu'une exposition constante à de faibles doses de bisphénols pourrait altérer le métabolisme énergétique et les fonctions antibactériennes des PMN. Nous avons stimulé les PMN avec le peptide bactérien chimiotactique N-formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine (fMLP) et évalué leur réponse glycolytique en utilisant un analyseur de flux extracellulaire. Nous avons examiné l'impact des bisphénols sur le métabolisme des neutrophiles dans les moments suivant leur isolement du sang de volontaires sains (exposition immédiate) et suite à une exposition de 6h en culture (prolongée). Nous avons observé qu'une exposition immédiate au BPA, au BPS et à leurs métabolites glucuronidés, à des concentrations retrouvées dans le sang, n'avait aucun effet sur la glycolyse basale et la glycolyse induite par le fMLP. Cependant, une exposition prolongée aux bisphénols diminue la glycolyse induite par le fMLP dans les PMN sans affecter la viabilité cellulaire. Ces résultats suggèrent que l'incapacité à répondre correctement aux besoins énergétiques pourrait altérer les fonctions cellulaires des PMN lors d'infections bactériennes. En effet, suite à une exposition prolongée à de faibles concentrations de bisphénols, les neutrophiles activés ont une concentration de CXCL8/IL-8 intracellulaire plus faible que les témoins et une dérégulation de la production de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS). La diminution du métabolisme, entraînant une dérégulation de certaines fonctions cellulaires, pourrait contribuer au développement de pathologies ou augmenter la susceptibilité aux infections. Collectivement, ces données supportent les conclusions sur les effets néfastes du BPA et de ses substituts et appuient de nouvelles réglementations concernant leur utilisation au Canada.

# SUMMARY

Bisphenol A (BPA), a chemical compound widely used in the fabrication of plastics and epoxy resins, is found in human fluids such as blood and urine. BPA is known to affect the endocrine, reproductive and immune systems by influencing metabolism (glycolysis and mitochondrial respiration) and cellular functions. Concerns about the safety of BPA have led to its replacement with substitutes such as bisphenol S (BPS). Polymorphonuclear neutrophils (PMNs), the most abundant leukocytes in the blood, are highly glycolytic cells due to their low mitochondria count and their use of oxygen to perform anti-microbial functions. Because of this metabolic feature, we hypothesized that constant exposure to low doses of bisphenols could alter energy metabolism and anti-bacterial functions of PMNs. We stimulated PMNs with the chemotactic bacterial peptide N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) and evaluated their glycolytic response using an extracellular flux analyzer. We examined the impact of bisphenols on neutrophil metabolism in the moments following their isolation from the blood of healthy volunteers (immediate exposure) and following 6h culture exposure (prolonged). We found that an acute exposure to BPA, BPS and their glucuronidated metabolites, at concentrations found in the blood, had no effect on both basal glycolysis and fMLP-induced glycolysis. However, a prolonged exposure to bisphenols reduced the fMLP-induced glycolysis in PMNs without affecting cellular viability. These results suggest that the inability to properly respond to energy requirements could alter the cellular functions of PMNs during bacterial infections. Indeed, following prolonged exposure to low concentrations of bisphenols, activated neutrophils have a lower intracellular CXCL8/IL-8 concentration than the controls and a deregulation of the production of reactive oxygen species (ROS). Decreased metabolism, leading to deregulation of cellular functions, could contribute to the development of pathologies or increase susceptibility to infections. Collectively, these data support conclusions about the adverse effects of BPA and its substitutes and support new regulations regarding their use in Canada.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>RÉSUMÉ</b> .....	<b>III</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>IV</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....	<b>V</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>VII</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>VII</b>
<b>LISTE DES ABBRÉVIATIONS</b> .....	<b>VIII</b>
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>XI</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
<b>LE METABOLISME BIOENERGETIQUE</b> .....	<b>1</b>
<i>Généralités</i> .....	<b>1</b>
<i>La glycolyse</i> .....	<b>1</b>
<i>La respiration mitochondriale</i> .....	<b>4</b>
<i>Le métabolisme des cellules immunitaires</i> .....	<b>9</b>
<b>LES BISPHENOLS</b> .....	<b>11</b>
<i>Généralités</i> .....	<b>11</b>
<i>Mécanisme d'action</i> .....	<b>14</b>
<i>Réglementation</i> .....	<b>17</b>
<i>Substituts et métabolites</i> .....	<b>22</b>
<i>Effets sur la santé humaine</i> .....	<b>24</b>
<b>LES NEUTROPHILES</b> .....	<b>27</b>
<i>Généralités</i> .....	<b>27</b>
<i>La réaction inflammatoire</i> .....	<b>30</b>
<i>La migration</i> .....	<b>33</b>
<i>La phagocytose</i> .....	<b>36</b>
<i>La production de molécules inflammatoires</i> .....	<b>37</b>
<i>L'apoptose des neutrophiles</i> .....	<b>40</b>
<i>Effets des bisphénols sur les fonctions des neutrophiles</i> .....	<b>42</b>
<b>CHAPITRE 1 : PROBLEMATIQUE, HYPOTHESE ET OBJECTIFS</b> .....	<b>43</b>
1.1 : PROBLEMATIQUE.....	<b>43</b>
1.2 : HYPOTHESE.....	<b>43</b>
1.3 : OBJECTIFS.....	<b>44</b>
<b>CHAPITRE 2 : MATÉRIELS ET MÉTHODES</b> .....	<b>45</b>
2.1 MATERIEL.....	<b>45</b>
2.2 METHODES.....	<b>46</b>
2.2.1 <i>Isolement des neutrophiles humains</i> :.....	<b>46</b>
2.2.2 <i>Exposition des neutrophiles avec le bisphénol</i> :.....	<b>47</b>
2.2.3 <i>Étude du métabolisme glycolytique</i> :.....	<b>47</b>

2.2.4 Viabilité cellulaire : .....	50
2.2.5 Test de phagocytose : .....	51
2.2.6 Détection et quantification de CXCL8/IL-8 intra et extracellulaire : .....	52
2.2.7 Test de la production d'anions superoxydes : .....	53
2.2.8 Analyse statistique : .....	53
<b>CHAPITRE 3 : RESULTATS</b> .....	<b>54</b>
<b>CHAPITRE 4 : DISCUSSION</b> .....	<b>71</b>
<b>CONCLUSION</b> .....	<b>76</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>77</b>

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 :	Les étapes de la glycolyse .....	3
Figure 2 :	Le cycle de Krebs.....	5
Figure 3 :	La phosphorylation oxydative.....	8
Figure 4 :	Structure de la molécule de BPA .....	11
Figure 5 :	Les secteurs d'utilisation du BPA.....	13
Figure 6 :	Les récepteurs oestrogéniques du BPA.....	15
Figure 7 :	Courbe monotone versus non monotone .....	18
Figure 8 :	L'estradiol avec la famille des bisphénols .....	23
Figure 9 :	Les effets systémiques du BPA .....	26
Figure 10 :	Les précurseurs du neutrophile.....	28
Figure 11 :	Les différentes classes de récepteurs du neutrophile.....	29
Figure 12 :	La réaction inflammatoire .....	31
Figure 13 :	La transmigration du neutrophile.....	34
Figure 14 :	Les cytokines exprimées/produites par les neutrophiles.....	38
Figure 15 :	Isolement des neutrophiles .....	47
Figure 16 :	Les deux stratégies de stimulation.....	50
Figure 17 :	Test Annexine V/PI .....	51
Figure 18 :	Test de phagocytose .....	52
Figure 19 :	Une exposition prolongée au BPA, BPS et leurs métabolites glucuronidés réduit la glycolyse induite par le fMLP dans les neutrophiles humains. ....	58
Figure 20 :	Une exposition prolongée au BPA, BPS et leurs métabolites glucuronidés n'affecte pas la viabilité des neutrophiles humains. ....	62
Figure 21 :	Une exposition prolongée au BPA, BPS et leurs métabolites glucuronidés n'affecte pas la phagocytose des neutrophiles humains.....	66
Figure 22 :	Une exposition prolongée au BPA, BPS et plus particulièrement aux métabolites glucuronidés réduit le pourcentage intracellulaire de CXCL8/IL-8 dans les neutrophiles humains.....	68
Figure 23 :	Une exposition prolongée au BPA, BPS et leurs métabolites glucuronidés perturbe la production d'anions superoxyde par les neutrophiles activés par le fMLP. ....	69

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau I.	La réglementation mondiale du BPA.....	21
------------	--	----

## LISTE DES ABBRÉVIATIONS

2-DG :	2-Deoxy-D-glucose
AR :	( <i>Androgen Receptor</i> ) Récepteur des androgènes
ATP :	Adénosine Triphosphate
BPA :	Bisphénol A
BPA-G :	Bisphénol A glucuronide
BPB :	Bisphénol B
BPE :	Bisphénol E
BPF :	Bisphénol F
BPS :	Bisphénol S
BPS-G :	Bisphénol S glucuronide
CBDO :	2,2,4,4-Tetramethyl-1,3-cyclobutanediol
CD :	Cluster de différenciation
CMH :	Complexe majeur d'histocompatibilité
CR :	( <i>Complement Receptor</i> ) Récepteur du complément
DHT :	Dihydrotestostérone
DJA :	Dose journalière admissible
DMEM :	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO :	Diméthylsulfoxyde
DMT :	( <i>Dimethyl terephthalate</i> ) Téréphtalate de diméthyle
ECAR:	( <i>Extracellular acidification rate</i> ) Taux d'acidification extracellulaire
ECHA :	( <i>European Chemicals Agency</i> ) Agence européenne des produits chimiques
EFSA:	( <i>European Food Safety Authority</i> ) Autorité européenne de sécurité des aliments
ELISA :	( <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> ) Dosage d'immunoabsorption par enzyme liée
ER :	( <i>Estrogen Receptor</i> ) Récepteur des œstrogènes
ERR :	( <i>Estrogen-related receptor</i> ) Récepteur nucléaire orphelin
FADH :	Flavine adénine dinucléotide
FBS :	( <i>Fetal Bovine Serum</i> ) Sérum de veau foetal

FDA :	<i>(Food and Drug Administration)</i> Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux
fMLP :	N-formylméthionine-leucyl-phénylalanine
FSH :	<i>(Follicle-stimulating hormone)</i> Hormone folliculo-stimulante
GM-CSF :	<i>(Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor)</i> Facteur de stimulation des colonies de granulocytes et de macrophages
GPR :	<i>(G-protein-coupled receptor)</i> Récepteur couplé aux protéines G
GTP :	Guanosine Triphosphate
H <sub>2</sub> O :	Molécule d'eau
HBSS :	Hank's Balanced Salt Solution
ICAM :	<i>(Intercellular Adhesion Molecule)</i> Molécule d'adhésion intercellulaire
IL :	Interleukine
IRF :	<i>(Interferon regulatory factor)</i> Facteur de régulation de l'interféron
LFA :	Lymphocyte function-associated antigen
LH :	<i>(Luteinizing hormone)</i> Hormone lutéinisante
LPS :	Lipopolysaccharide
NADH :	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH :	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NIEHS :	<i>(National Institute of Environmental Health Sciences)</i> Institut national des sciences en santé environnementale
NOAEL :	<i>(No observed adverse effect level)</i> Dose sans effet néfaste observable
OCR :	<i>(Oxygen Consumption Rate)</i> Taux de consommation de l'oxygène
PAMP :	<i>(Pathogen Associated Molecular Patterns)</i> Motif moléculaire associé aux pathogènes
PBMC :	<i>(Peripheral Blood Mononuclear Cell)</i> Cellules mononucléaires périphériques sanguines
PBS :	<i>(Phosphate Buffered Saline)</i> Tampon phosphate salin
PECAM :	Platelet endothelial cell adhesion molecule
PES :	Polyethersulfone
pH :	Potentiel hydrogène
PMN :	<i>(Polymorphonuclear neutrophil)</i> Polymorphonucléaire neutrophile

PRR : (*Pattern Recognition Receptors*) Récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires

ROS : (*Reactive oxygen species*) Dérivé réactif de l'oxygène

RPMI : Roswell Park Memorial Institute medium

SEM : (*Standard Error of the Mean*) Erreur standard de la moyenne

TLR : Toll-like receptors

TNF : (*Tumor necrosis factor*) Facteur de nécrose tumorale

TR : (*Thyroid hormone receptor*) Récepteur des hormones thyroïdiennes

UDP : Uridine diphosphate

# REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier tout particulièrement mon directeur de recherche, le Dr Martin Pelletier, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire. Son sens de la sociabilité m'a tout de suite mis à l'aise et m'a permis de m'adapter facilement à ce nouveau pays d'accueil. Son goût pour la recherche et ses nombreuses idées ont su éveiller en moi une motivation pour effectuer ma maîtrise et écrire ce mémoire.

En recherche que serions-nous sans une équipe ? Je remercie très chaleureusement Asmaa Lachhab, étudiante en doctorat, et Marie-Pier Longchamps, étudiante à la maîtrise, pour leurs précieux conseils et leur amitié. Un grand merci à Nathalie Page, assistante de recherche, qui m'a aidé à résoudre de nombreux problèmes ; elle a toujours eu une réponse à mes questions.

Tout le monde le sait, des études supérieures en recherche, ce n'est pas évident. Je tiens donc à remercier mes collègues de travail et amis, Julien, Stephan, Isa, Pépito Abdé, Yann, Jouda, Marine, Nico, Imène pour leur écoute et leurs précieux conseils.

Je tiens à souligner également ma sincère amitié envers Tania Levesque qui m'a toujours suivi depuis mon arrivée au Canada.

Merci aussi à ma famille qui depuis la France était toujours à mes côtés dans les bons et les mauvais moments ; merci de croire en moi. Fanny, Liza, Alexis, Mathieu et Matthieu, Cécile, vous êtes mes piliers peu importe le pays où je me trouve.

D'autres personnes formidables n'ont pas besoin que je les cite ici pour savoir toute l'amitié et la reconnaissance que je leur accorde !

« Rester c'est exister : mais voyager c'est vivre » - Georges Brassens

# INTRODUCTION

## Le métabolisme bioénergétique

### Généralités

Le mot métabolisme vient du grec ancien « metabolê » signifiant changement. En effet, le métabolisme est un ensemble de changements et de réactions chimiques exercés dans un organisme dans le but de le maintenir vivant. Le métabolisme couvre trois fonctions importantes. Il convertit la nourriture en énergie et en micromolécules, il permet de construire des macromolécules (protéines, lipides) et il permet l'élimination des déchets azotés (1).

Les êtres humains obtiennent les molécules nécessaires à la construction des cellules via l'alimentation. Même si le corps humain est capable de synthétiser un grand nombre de molécules suite à de nombreuses réactions chimiques, il ne peut pas tout produire. Les acides aminés essentiels, les acides gras essentiels et certaines vitamines doivent être obligatoirement apportés par la nourriture sans quoi des pathologies apparaissent. La vitamine C, par exemple, doit être obtenue via l'alimentation, car les primates, dont l'être humain, sont incapables de la synthétiser (2).

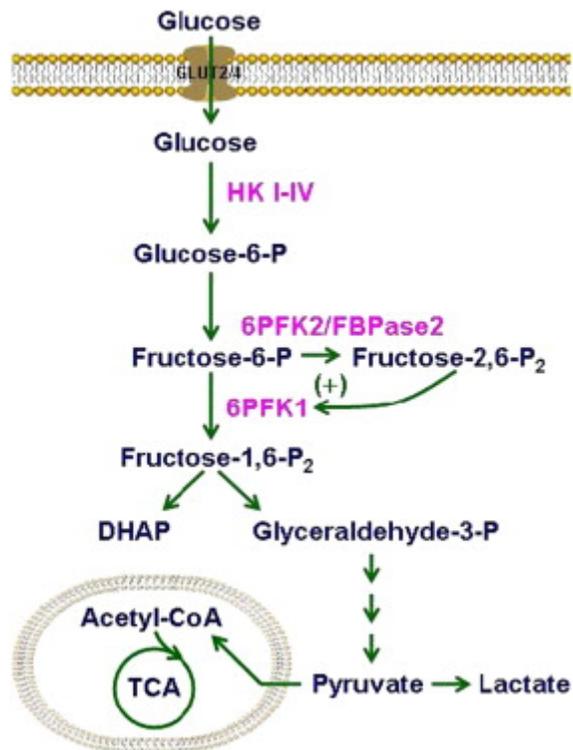
### La glycolyse

La glycolyse (**Figure 1**) est une voie métabolique ancienne présente dans la majorité des êtres vivants. Elle ne nécessite pas d'oxygène, ce qui explique son utilisation par de nombreuses espèces anaérobiques. La glycolyse possède un rôle central dans la génération d'intermédiaires pour d'autres voies métaboliques comme la voie des pentoses phosphates mais elle est également en amont d'une autre voie métabolique qui produit plus d'énergie, la respiration mitochondriale (3).

La glycolyse permet la génération de deux molécules d'ATP et de deux molécules de NADH suite à une série de 10 étapes de catalyse enzymatique formant au final deux molécules de pyruvate pour une molécule de glucose initial. Elle se déroule dans le

cytosol et se sépare en deux grandes phases. Une phase initiale qui va consommer de l'ATP (2 molécules) pour modifier le glucose en deux molécules phosphorylées, la dihydroxyacétone phosphate et le glycéraldéhyde-3-phosphate. Ces deux groupements phosphorylés sont apparus suite à la consommation de deux molécules d'ATP. Cette partie est donc énergivore. Dans la deuxième phase, chaque molécule phosphorylée est convertie en pyruvate suite à diverses réactions libérant ainsi 2 molécules d'ATP et 1 molécule de NADH. Il y a donc production de 4 molécules d'ATP et de 2 molécules de NADH dans cette phase. Au final nous avons une production nette de deux molécules de pyruvate, 2 molécules d'ATP (4 molécules d'ATP produits – 2 molécules d'ATP consommées) et 2 molécules de NADH (4).

Les produits de la glycolyse vont permettre d'initier d'autres voies métaboliques. En anaérobiose, le pyruvate se convertit en lactate (et mène, du même coup, à l'acidification extracellulaire observée dans les cultures cellulaires) à travers la fermentation lactique ou en éthanol à travers la fermentation alcoolique. En aérobose, le pyruvate se convertit en acétyl-Coenzyme A (acétyl-CoA) dans la matrice mitochondriale pour amorcer la respiration mitochondriale (5).



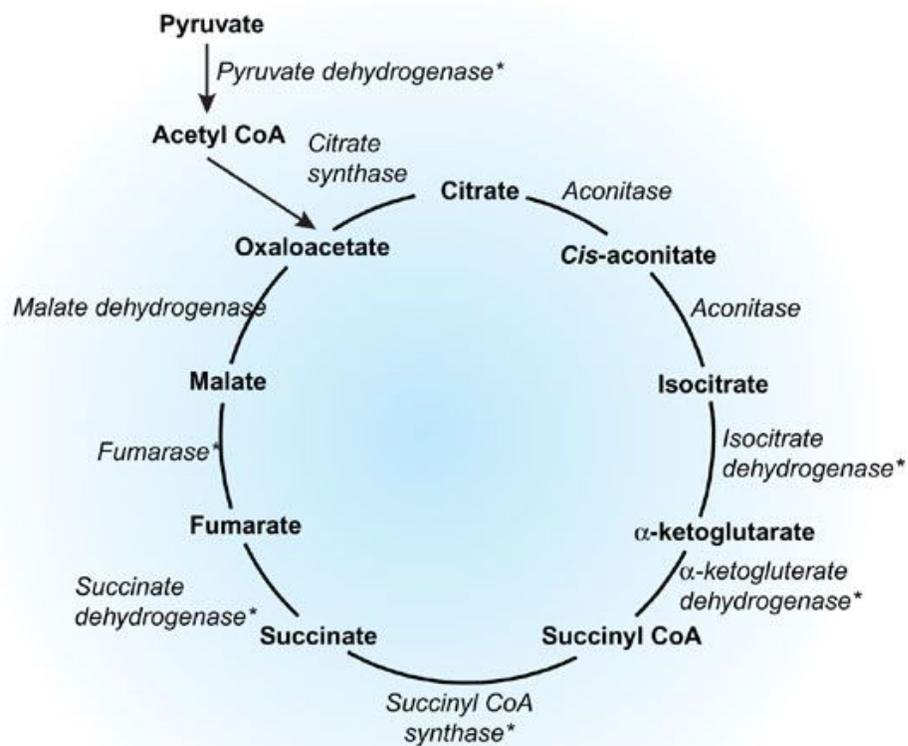
**Figure 1 : Les étapes de la glycolyse**

Un schéma de la glycolyse est représenté ici avec toutes les enzymes et les molécules produites durant la conversion du glucose en pyruvate. HK : Hexokinase ; 6PFK1 : 6-phosphofructo-1-kinase ; 6PFK2/FBPase2 : 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase ; Glucose-6-P : Glucose-6-phosphate ; Fructose-6-P : Fructose-6-phosphate ; Fructose-2,6-P<sub>2</sub> : Fructose-2,6-bisphosphate ; Fructose-1,6-P<sub>2</sub> : Fructose-1,6-bisphosphate ; DHAP : Dihydroxyacétone phosphate ; Glyceraldehyde-3-P : Glyceraldehyde-3-phosphate ; Acetyl-CoA : Acetyl-coenzyme A ; TCA : Acide tricarboxylique.

Tirée de Xin Guo et al. 2012 (6)

## La respiration mitochondriale

En conditions aérobies, la respiration mitochondriale permet un rendement énergétique beaucoup plus important que la glycolyse. Elle se compose de deux parties se déroulant dans la mitochondrie, le cycle de l'acide citrique (également connu sous le nom de cycle de Krebs) et la phosphorylation oxydative. Le pyruvate résultant de la glycolyse du glucose se transforme en acétyl-CoA durant son passage à travers la membrane externe de la mitochondrie. L'acétyl-CoA s'associe avec l'oxaloacétate pour générer du citrate. Le cycle peut ensuite commencer en enchainant plusieurs réactions enzymatiques qui va générer 8 molécules différentes, la production de coenzymes d'oxydoréduction et du  $\text{CO}_2$  (**Figure 2**). Les réactions enzymatiques se terminent par la régénération du citrate pour maintenir la continuité du cycle. Chaque cycle produit 3 molécules de NADH, 1 molécule de  $\text{FADH}_2$  et 1 molécule de GTP ou équivalent à 1 molécule d'ATP. Les NADH cytosoliques et mitochondriaux et les  $\text{FADH}_2$  seront oxydés par la chaîne respiratoire durant la phosphorylation oxydative afin de produire de l'ATP. Comme la glycolyse permet la génération de deux molécules de pyruvate par molécule de glucose, le bilan d'un point de vue énergétique pour le cycle de Krebs est donc de 6 molécules de NADH, 2 molécules de  $\text{FADH}_2$  et 2 molécules de GTP (7,8).



**Figure 2 : Le cycle de Krebs**

Nous pouvons voir ici le cycle de Krebs composé de ses 8 enzymes avec comme substrat initial le pyruvate, qui est le produit de la dégradation du glucose via la voie de la glycolyse.

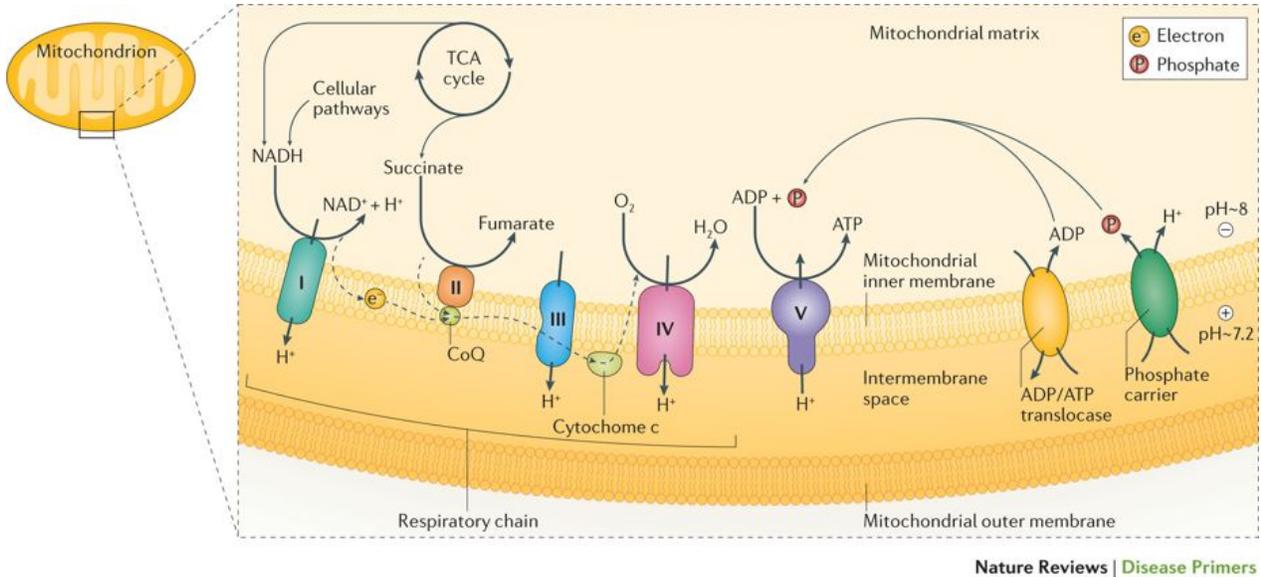
Tirée de Munnich 2008 (9)

La membrane externe de la mitochondrie est imperméable aux molécules de NADH. Deux types de navette permettent de transporter le NADH à l'intérieur de la mitochondrie : la navette malate-aspartate et la navette du glycérol 3-phosphate. La navette malate-aspartate permet le passage indirectement des molécules de NADH dans la mitochondrie. Grâce à cette navette, les molécules de NADH conservent tout leur potentiel énergétique tandis qu'avec la seconde navette, celle du glycérol-3-phosphate, les molécules de NADH sont plus rapidement transférées dans la mitochondrie, mais perdent partiellement leur potentiel énergétique. Au final, si la navette utilisée est celle de la malate-aspartate, les deux molécules de NADH permettront la production de 3 molécules d'ATP par molécule de NADH; or si la navette utilisée est celle du glycérol-3-phosphate, il n'y aura que 2 molécules d'ATP produites par molécule de NADH (10).

Dans la membrane interne de la mitochondrie se trouve différents complexes protéiques impliqués dans la chaîne d'électrons : le complexe I : NADH-coenzyme Q oxydoréductase, le complexe II : succinate-coenzyme Q oxydoréductase, le complexe III : coenzyme Q cytochrome c oxydoréductase et le complexe IV : cytochrome c oxydase (11) (**Figure 3**).

Par ailleurs, il existe deux transporteurs mobiles, le coenzyme Q (ubiquinone) et le cytochrome c. Les coenzymes d'oxydoréductions NADH et  $FADH_2$  présents dans la matrice véhiculent des ions hydrogènes et des électrons à la chaîne de transfert des électrons. Ainsi la molécule de NADH transfère ces électrons au complexe I qui les transfère à son tour à l'ubiquinone. Les protons sont, quant à eux, pompés à travers le complexe vers l'espace intermembranaire. L'ubiquinone transfère les électrons au complexe III. Ensuite le complexe III les transfère au cytochrome c entraînant le passage de protons également à travers le complexe III vers l'espace intermembranaire. Toujours dans la même logique, les électrons sont transférés du cytochrome c au complexe IV qui permet de pomper des protons de la matrice vers l'espace intermembranaire. Le  $FADH_2$  transfère ses électrons non pas au complexe I, mais au complexe II et la chaîne d'électron reste la même que la molécule du NADH. L'oxygène, apporté en respirant, permet de récupérer les électrons du complexe IV et s'unit avec des protons pour générer des

molécules d'eau ( $H_2O$ ). Au final les protons accumulés dans l'espace intermembranaire vont traverser un canal, l'ATP synthase ; qui va permettre d'assembler un phosphate inorganique avec une molécule d'ADP afin de produire une molécule d'ATP. Une molécule de NADH permet la génération d'environ 3 molécules d'ATP alors que le  $FADH_2$  permet la génération d'environ 2 molécules d'ATP. Donc, en bilan général, le glucose est complètement oxydé en  $CO_2$  et en  $H_2O$  en générant de 36 à 38 molécules d'ATP en conditions aérobies (12).



**Figure 3 : La phosphorylation oxydative**

La phosphorylation oxydative est une voie métabolique que les cellules utilisent pour oxyder les nutriments, libérant ainsi de l'énergie sous forme d'ATP. La voie respiratoire comprend les complexes I – IV de la chaîne respiratoire et le complexe V, une ATP synthase. Le complexe I oxyde le NADH en réduisant le coenzyme Q10 de sa forme ubiquinone (CoQ; Q) en ubiquinol (QH<sub>2</sub>), générant un gradient électrochimique à travers la membrane mitochondriale interne. Le complexe II oxyde le succinate en réduisant CoQ de sa forme ubiquinone (CoQ; Q) en ubiquinol (QH<sub>2</sub>). Le complexe III (ubiquinol-cytochrome c oxydoréductase) catalyse la réduction du cytochrome c par oxydation de l'ubiquinol avec génération d'un gradient électrochimique. Le complexe IV (cytochrome c oxydase) est responsable de la réaction enzymatique terminale de la chaîne respiratoire qui transfère des électrons (e<sup>-</sup>) à l'oxygène moléculaire et génère un gradient électrochimique. Le complexe V convertit l'énergie du gradient du proton électrochimique (H<sup>+</sup>) transmembranaire en énergie mécanique, qui catalyse l'énergie de la liaison chimique entre l'ADP et le phosphate (P) pour former de l'ATP.

Tirée de Gorman *et al.* 2016 (13)

## **Le métabolisme des cellules immunitaires**

Le métabolisme énergétique permet d'assurer les fonctions propres au système immunitaire. En effet les cellules immunitaires ont besoin d'énergie pour exercer toutes leurs fonctions afin de survivre, mais elles en ont également besoin pour développer des réponses immunes. Si le métabolisme ne parvient pas à fournir l'énergie nécessaire aux cellules, leurs fonctions sont impactées et les cellules peuvent se diriger vers le processus d'apoptose. Au contraire, un métabolisme excessif peut empêcher l'apoptose et provoquer de l'hyperactivité, pouvant contribuer à de l'auto-immunité et aux maladies inflammatoires (14). Historiquement, les chercheurs croyaient que la reprogrammation métabolique était due aux niveaux d'oxygène et l'apport des nutriments. Dorénavant, il a été démontré que des stimuli immunologiques comme les cytokines peuvent induire une reprogrammation métabolique qui va permettre aux cellules d'exercer leurs fonctions spécifiques (15,16).

Les neutrophiles ont une courte durée de vie et exercent leurs fonctions dans les tissus, c'est-à-dire un environnement hypoxique. Ils possèdent peu de mitochondries et utilisent donc majoritairement la glycolyse pour produire de l'ATP. La voie des pentoses-phosphates sert à générer le NADPH pour la fonction antimicrobienne. Le peu d'oxygène présent est consommé pour la flambée oxydative. Les monocytes, quant à eux, circulent dans le sang, un environnement riche en oxygène, et utilisent préférentiellement la phosphorylation oxydative pour générer de l'énergie. Par contre, lors d'une réaction inflammatoire, leur passage dans les tissus entraîne un changement métabolique qui consiste en la diminution d'utilisation de la voie de la phosphorylation oxydative et à l'augmentation de la glycolyse pour ainsi générer des molécules antimicrobiennes (17). En plus des niveaux d'oxygène, la reconnaissance de motifs bactériens peut activer la voie de AKT-mTOR-HIF-1 qui va permettre une forte augmentation de la glycolyse. L'activation de cette voie permet l'entraînement des cellules et la génération d'une réponse plus performante lors d'une stimulation pro-inflammatoire (18).

De plus, l'utilisation de la glycolyse permet l'accumulation d'intermédiaires du cycle de l'acide citrique comme le succinate qui va réguler le facteur de transcription HIF-1

responsable de la production accrue de molécules pro-inflammatoires. L'utilisation de la glycolyse comme principale voie d'énergie permet aux cellules, comme les macrophages de type M1, d'avoir un profil inflammatoire et de pouvoir se défendre contre les pathogènes. Au contraire, les cellules impliqués dans la résolution de l'inflammation, comme les macrophages de type M2, utilisent préférentiellement la phosphorylation oxydative pour des effets de plus longues durées (19).

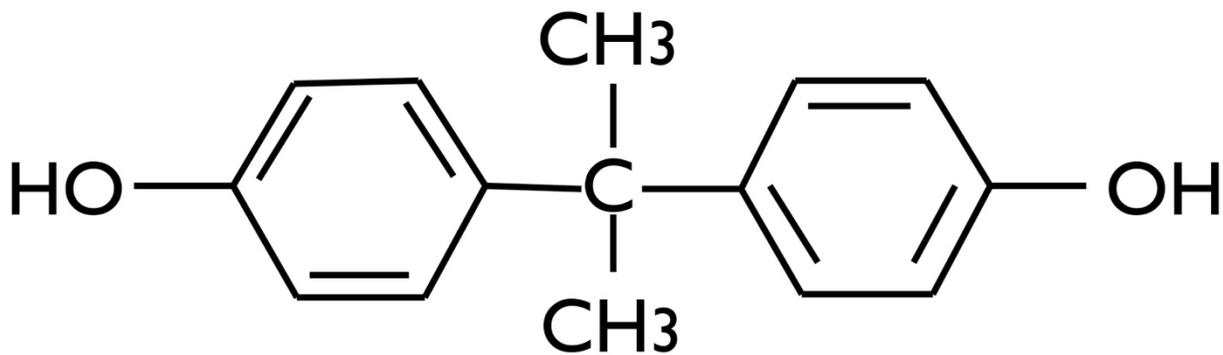
Comme la plupart des cellules immunitaires, les lymphocytes n'échappent pas à cette règle. L'ATP provient de la mitochondrie dans les cellules au repos, mais une fois activés, l'ATP provient de la glycolyse afin de libérer les acides gras et les acides aminés nécessaires à la synthèse membranaire et protéique des cellules clonales. Les lymphocytes effecteurs (T CD8<sup>+</sup>, T CD4<sup>+</sup>, Th1, Th2 ou encore Th17) utilisent la glycolyse comme principale voie d'énergie contrairement aux lymphocytes régulateurs et mémoires qui utilisent la phosphorylation oxydative (20).

Nous utilisons dans notre laboratoire un instrument de pointe, le XF96 Extracellular Flux Analyzer (Agilent/Seahorse Biosciences), qui permet de mesurer en temps réel la consommation d'oxygène reliée à la respiration mitochondriale et la libération de protons reliée à la glycolyse (acidification du milieu).

## Les bisphénols

### Généralités

Le bisphénol A (BPA) a été synthétisé pour la première fois en 1891 par un chimiste russe, Alexandre Dianine (21). Ce composé est obtenu chimiquement par la combinaison de phénols et d'acétones (**Figure 4**). Le BPA appartient à une grande famille. En effet nous connaissons déjà actuellement le bisphénol S, F ou G.



**Figure 4 : Structure de la molécule de BPA**

Le BPA est sélectionné dans les années 1930 quand de nombreux scientifiques sont à la recherche d'œstrogènes synthétiques pour éviter des accouchements précoces ou des avortements spontanés. Le BPA possède de nombreux avantages, mais la découverte du diéthylstilbestrol le fait oublier, de par ses caractéristiques physico-chimiques plus intéressantes, notamment la stabilité de la molécule. Néanmoins, de nombreux effets secondaires sont à déclarer comme des problèmes de stérilité chez les enfants nés de mères traitées au diéthylstilbestrol. La molécule sera interdite dans les années 1970 (22).

Les bisphénols sont des perturbateurs oestrogéno-endocriniens de par leur action à faible dose sur les récepteurs des œstrogènes. Ils peuvent mimer les ligands naturels des récepteurs oestrogéniques entraînant leur blocage ou une activation dérégulée (23). Depuis les années 1950, le BPA est utilisé par les industries plastiques en combinaison avec le phosgène pour produire du polycarbonate. Le polycarbonate est utilisé dans une

large variété de produits (biberons, emballages plastiques, contenants alimentaires, équipements médicaux, tickets de caisse, lentilles de contact) (**Figure 5**). Il fait polémique depuis plusieurs années pour ces effets indésirables autant sur les problèmes de diabète, obésité et cancer que sur le système immunitaire (24,25). Le débat est encore non résolu, de par le fait que les industries plastiques utilisent des substituts au BPA qui sont de la même famille et dont la toxicité n'a jamais été étudiée.

Les bisphénols peuvent se retrouver dans l'eau et moindrement dans l'air, mais la principale voie de contamination est l'ingestion (26). En effet, sous l'effet de la chaleur, les bisphénols peuvent se retrouver dans le contenu d'un contenant alimentaire (27). Il a été prouvé que le simple contact peau-bisphénol est suffisant pour l'incorporer dans notre corps. Une étude a été réalisée sur des caissières de différents lieux de travail comme des restaurants ou des librairies et il s'avère qu'elles possédaient des taux élevés de BPA dans leur sang (28).

Des études ont permis de quantifier la présence du BPA dans l'urine des Canadiens et il s'avère que 91% de la population possède un taux de BPA quantifiable dans l'urine (29). Dans la circulation sanguine, les concentrations sont très variables, mais les scientifiques estiment que la concentration sérique du BPA se situe entre 0.2-20 ng/mL soit environ entre  $10^{-9}$  M et  $10^{-7}$  M (30).

Chez les adultes, les bisphénols sont métabolisés dans le foie et éliminés par l'urine. Les bisphénols possèdent une demi-vie relativement courte dans le sang de l'ordre de 6-24h et ils se retrouvent majoritairement sous leur forme conjuguée (31). Les enfants et les bébés n'ont pas encore un système d'excrétion et de métabolisation parfaitement fonctionnel, expliquant pourquoi les bébés et les jeunes enfants sont les principales victimes du bisphénol. Un article montre que les enfants ont un taux plus élevé de BPA dans le sang que les adultes (32).

## Les secteurs d'utilisation

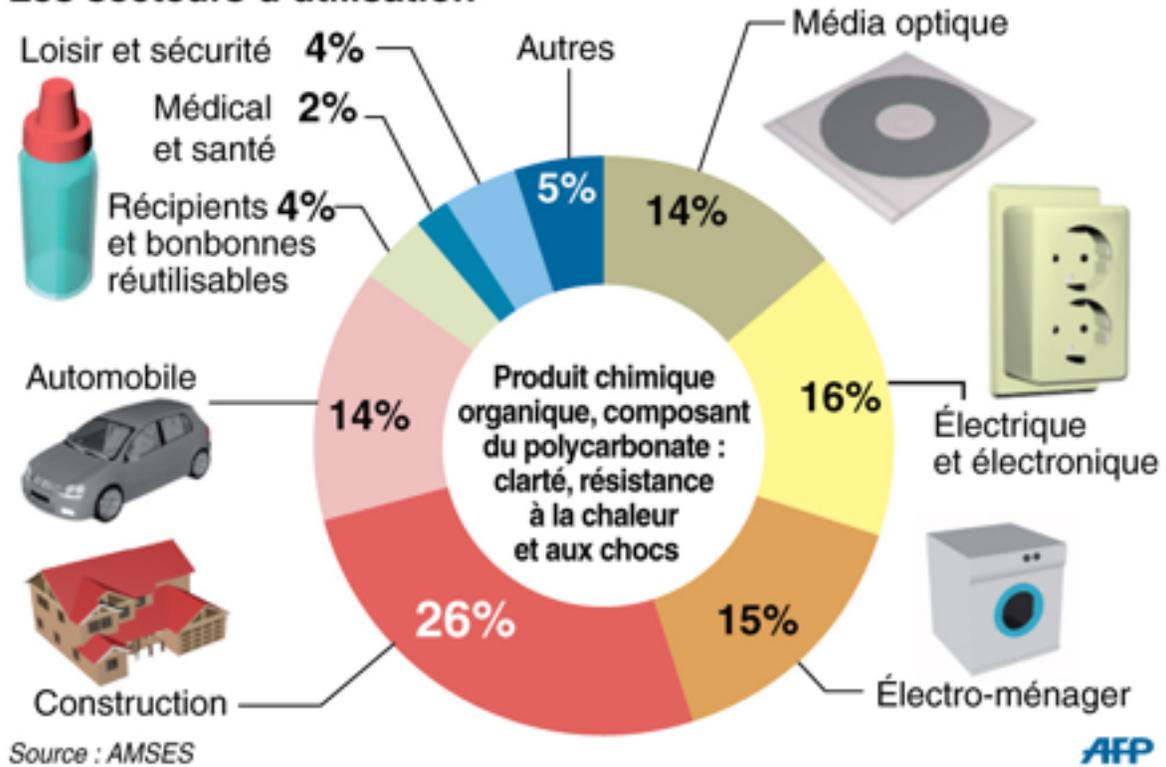


Figure 5 : Les secteurs d'utilisation du BPA

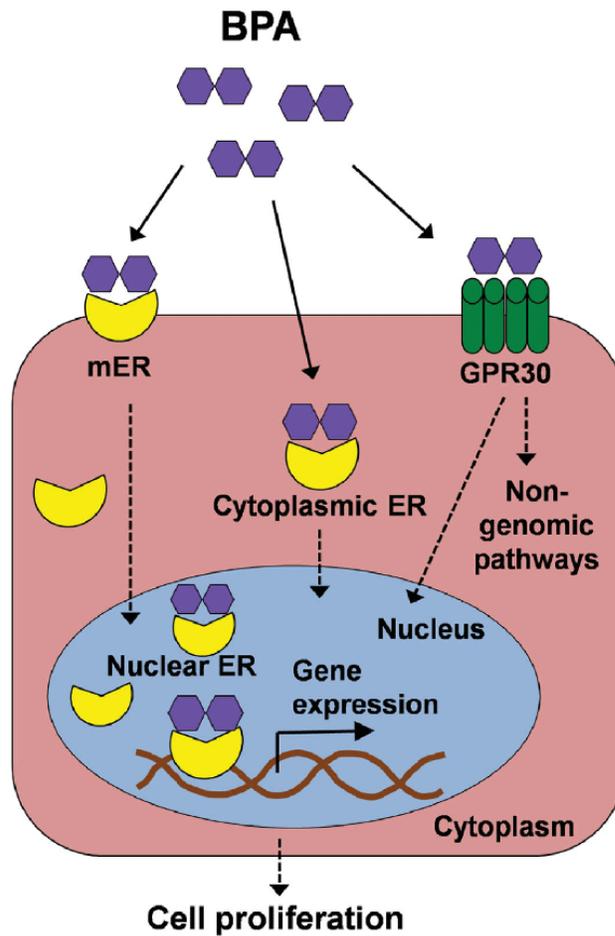
Le BPA est présent dans beaucoup de secteurs comme le secteur de la construction, les équipements médicaux, les contenants alimentaires ou encore les biberons. Les réglementations actuelles commencent à bannir le BPA des biberons et des contenants alimentaires, mais il restera bien présent dans la majorité des autres secteurs d'utilisation.

Tirée du site web [https://www.sciencesetavenir.fr/sante/bisphenol-a-le-detecter-au-quotidien\\_19315](https://www.sciencesetavenir.fr/sante/bisphenol-a-le-detecter-au-quotidien_19315).

## Mécanisme d'action

Le mécanisme d'action des bisphénols est encore mal compris. La structure de la molécule du BPA lui permet de se lier à deux sous-types de récepteurs oestrogéniques membranaires, les récepteurs ER $\alpha$  et ER $\beta$  (**Figure 6**). Les récepteurs oestrogéniques agissent en tant que facteurs de transcription après avoir été activés et sont impliqués dans la différenciation cellulaire, la physiologie reproductive (33) et dans l'immunité, notamment dans la stimulation de la production d'anticorps (34). Son affinité pour ces récepteurs est environ 10 000 fois plus faible que le ligand naturel, le 17 $\beta$ -estradiol (E2) (35). Malgré sa faible affinité, il semblerait qu'il puisse être aussi efficace que l'E2 dans certaines réponses, telles que la perméabilité vasculaire utérine, la différenciation et la croissance des glandes mammaires ou encore la plasticité synaptique de l'hippocampe (36).

Mais dans la majorité des cas, une si faible affinité laisse à penser que le BPA se fixe ailleurs. En effet, les œstrogènes peuvent induire une réponse rapide extranucléaire basée sur la localisation de quelques récepteurs sur la membrane plasmique. De faibles quantités de ER $\alpha$  et ER $\beta$  peuvent, après activation, former des cascades de signalisation particulièrement complexes (37). Ces cascades de signalisation peuvent mener à divers changements moléculaires comme la phosphorylation des protéines, la sécrétion d'oxyde nitrique ou encore l'activation des canaux potassiques et calciques. Le calcium est impliqué dans de nombreux processus comme la motilité cellulaire, les signalisations intra et extracellulaires et son dérèglement peut entraîner des malformations du système reproductif ou encore l'apparition de cancer (38). Le BPA, étant capable de mimer l'action de l'E2, peut se fixer sur le récepteur membranaire ER $\alpha$  et entraîner rapidement l'activation de voies de signalisation cytoplasmiques (39).



**Figure 6 : Les récepteurs oestrogéniques du BPA**

Le BPA peut interagir avec les récepteurs oestrogéniques nucléaires, cytoplasmiques et membranaires. Il interagit également avec les récepteurs membranaires GPR30. En utilisant tous ces récepteurs, le BPA est capable d'activer des voies de signalisation aussi bien génomiques que non génomiques.

Tirée de Wang *et al.* 2017 (40).

Comme mentionné auparavant, les bébés sont une population à risque concernant leur exposition prolongée aux bisphénols. Le BPA peut également se fixer aux ERR $\gamma$  (estrogen-related receptor gamma) avec une très forte affinité. Or, ces récepteurs sont très exprimés dans le placenta, ce qui peut entraîner l'accumulation du BPA dans le placenta et augmenter ces effets sur le développement du fœtus (41).

Comme expliqué auparavant, le BPA est capable de générer des réponses à de très faibles doses et au vu de son affinité faible pour les récepteurs oestrogéniques, les scientifiques tentent d'identifier d'autres récepteurs capables de lier la molécule de BPA. Récemment, un nouveau récepteur des œstrogènes a fait son apparition : il s'agit de GPR30 (G-protein-coupled receptor 30). C'est un récepteur couplé aux protéines G à 7 domaines transmembranaires non relié aux récepteurs oestrogéniques nucléaires. Le GPR30 peut engendrer une réponse rapide non génomique (42,43). Le BPS peut se fixer sur ce récepteur et induire une activation rapide de la voie MAP kinase ERK1/2 et du facteur de transcription AP-1 (43). Il a été prouvé que le BPA confère de la chimiorésistance dans le cancer du sein et induit une prolifération des cellules cancéreuses du sein via sa fixation avec GPR30 (44). Le BPA possède une affinité 8 à 50 fois plus grande pour GPR30 que les récepteurs oestrogéniques nucléaires. Les scientifiques émettent l'hypothèse que les effets BPA-dépendants peuvent être expliqués par cette liaison (45).

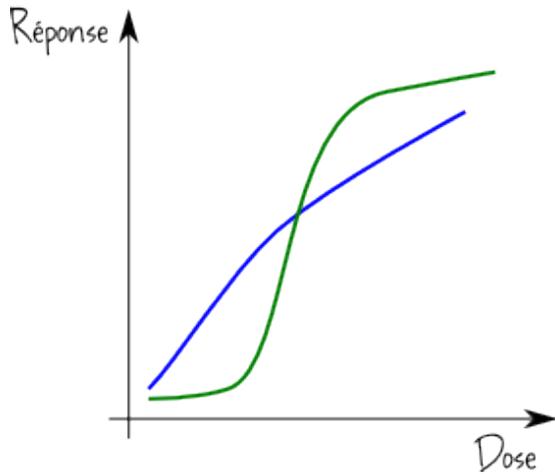
Le BPA peut également se fixer et jouer son rôle d'antagoniste sur les récepteurs des androgènes (Androgen Receptor (AR)) et prendre la place des ligands naturels, soit la testostérone et la dihydrotestostérone (DHT). Une étude chinoise comportant 560 hommes révèle que les hommes ayant un taux détectable de BPA dans leur urine sont associés avec une plus grande concentration d'hormone lutéinisante (LH) et d'hormone folliculo-stimulante (FSH), mais une plus faible concentration de testostérone comparée aux hommes avec un taux indétectable de BPA dans l'urine (46). Sa fixation avec les AR empêcherait sa translocation au noyau et inhiberait toute la voie de signalisation qui en découle (47).

En continuant sur ces effets d'antagoniste, nous savons désormais que le BPA peut se fixer sur les récepteurs de l'hormone thyroïdienne (Thyroid hormone Receptor (TR)). Le BPA inhibe l'activité transcriptionnelle médiée par les TR en étant l'antagoniste des ligands naturels (48). Les effets de cette liaison sur les TR ne sont pas encore bien compris.

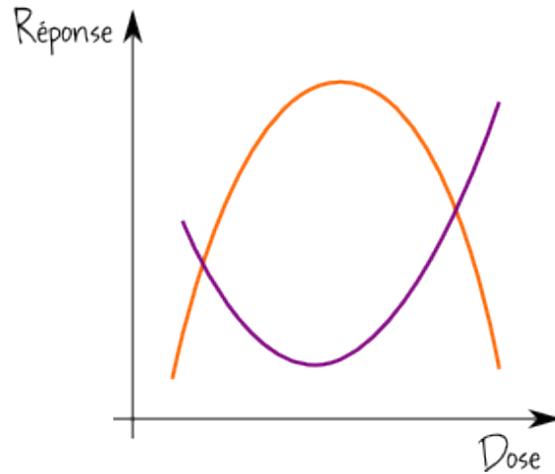
## Réglementation

Le BPA est utilisé dans les industries plastiques depuis les années 1950. Elles en produisent environ 4 millions de tonnes par année (49). Il faut attendre presque un demi-siècle pour qu'une étude du Dr Frederick Vom Saal de l'université du Missouri en 1997 révèle des effets nocifs sur le système reproducteur pour de très faibles doses de BPA (50). En effet, depuis les années 1980, nous savons déjà que le BPA possède des effets sur le système endocrinien et sur le système reproductif, mais personne ne se doutait que de très faibles doses pouvaient avoir elles aussi un effet. Néanmoins, ces études sont très controversées, notamment par le fait que le BPA agit sur le corps humain à faibles doses comparées aux doses supérieures où l'effet se perd (51). Nous savons désormais que le BPA possède une courbe dose-réponse en U inversé ; il possède une courbe non-monotone typique à de semblables perturbateurs endocriniens (52) (**Figure 7**).

### Courbes monotones



### Courbes non-monotones



**Figure 7 : Courbe monotone versus non monotone**

Voici l'exemple de deux courbes monotones à gauche où plus nous augmentons la dose et plus nous observons une réponse. À droite se trouve l'exemple de deux courbes non monotones où le maximum de la réponse ne correspond pas forcément au maximum de la dose.

Tirée du site web <https://sciencetonnante.files.wordpress.com/2013/06/courbes-dose-recc81ponse-non-monotones.png?w=676>.

Face aux résultats d'études démontrant les effets des bisphénols à très faibles doses, l'agence de l'autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) fixe en 2006 une concentration où il n'y a aucun effet nocif observé (NOAEL pour No Observed Adverse Effect Level) de 5 mg/kg/jour. De cette concentration découle la dose journalière tolérable qui est simplement la NOAEL/100 soit 50 µg/kg/jour (53). Donc, l'EFSA estime que durant une vie entière, si le corps est en contact avec au maximum 50 µg/kg/jour de BPA, il n'y a aucun risque encouru.

Face à la montée croissante de preuves et de recherche sur les effets potentiels du BPA, l'institut national des sciences de l'environnement et de la santé des États-Unis d'Amérique (NIEHS) supporte un congrès comportant une quarantaine de chercheurs internationaux. Ce congrès s'est déroulé à Chapel Hill dans l'état de New York, États-Unis d'Amérique, du 28 au 30 novembre 2006. Les chercheurs participent à ce congrès pour débattre sur les potentiels rôles du BPA sur la santé humaine. Il en résulte que le BPA est biologiquement actif dans 95% de la population et qu'il possède beaucoup trop d'effets indésirables, que ce soit sur le comportement et le développement des bébés et des jeunes enfants, que l'exposition chronique subite par les adultes (54). En effet, comme rappelé dans le rapport, beaucoup d'études évoquant l'innocuité du BPA ont été réalisées avec de grandes doses de BPA et sur des expositions immédiates. Or, dorénavant, nous savons que le BPA agit à faible dose sur une exposition prolongée, voire chronique.

En 2008, l'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (FDA) fixe sa dose journalière autorisée (DJA) au même niveau que l'EFSA soit 50 µg/kg/jour (55). Durant les années qui suivent, les grandes agences de témoin des aliments ont commencé à émettre des inquiétudes concernant l'effet du BPA sur la population des nourrissons et des jeunes enfants (56).

En avril 2010, le Canada devient le premier pays au monde à interdire le BPA dans les biberons (57). S'en suit un mouvement général, d'abord avec la France en janvier 2011, puis toute l'Union Européenne deux mois plus tard (58) (**Tableau I**). Les premières lois contre le BPA sont enfin apparues. En attendant, la FDA et l'EFSA témoignent qu'après

l'interdiction du BPA dans les biberons, il n'y a plus de risque à l'heure actuelle et pour n'importe quel groupe de population (59). Néanmoins, la France a interdit la présence de BPA dans les contenants alimentaires destinés aux bébés depuis 2013 et, depuis 2015, ce sont tous les contenants alimentaires qui doivent être exempts de BPA (60). La DJT de l'EFSA a aussi été réévaluée et diminuée de 50 µg/kg/jour à 4 µg/kg/jour (61). Comme pour les Etats-Unis, où chaque état possède ou non une réglementation sur le BPA, il existe une inégalité réglementaire dans le reste du monde. En effet, le Japon ou l'Australie, par exemple, n'ont aucune loi à l'heure actuelle concernant le BPA (62).

Aux dernières nouvelles, l'agence européenne des produits chimiques (ECHA) a reconnu le BPA comme perturbateur endocrinien en tant que tel. Les substituts du BPA, quant à eux, n'ont aucune loi les impliquant.

## Tableau I. La réglementation mondiale du BPA

Les premières lois concernant le BPA ont été créés dans le début des années 2000. S'en suit désormais,

Pays	Application	Limite	Introduction
Union Européenne	Plastique en contact avec les denrées alimentaires	Limite de migration fixée à 0.6 mg/kg	2004
	Biberons en polycarbonate*	Interdit	2011
	Jouets	Limite de migration fixée à 0.1 mg/l	2015
	Papiers thermiques	Interdit (limite fixée à 0.02% du poids)	2020
Autriche	Tétines et jouets de dentition	Interdit	2012
Belgique	Contenants alimentaires dédiés aux enfants de moins de 3 ans	Interdit	2013
Danemark	Contenants alimentaires dédiés aux enfants de moins de 3 ans	Interdit	2010
France	Tous les contenants alimentaires	Interdit	2015
Suède	Contenants alimentaires dédiés aux enfants de moins de 3 ans	Interdit	2013
Suisse	Plastique en contact avec la Nourriture	Limite de migration fixée à 0.6 mg/kg	2006
	Jouets	Limite de migration fixée à 0.1 mg/l	2015
	Biberons en polycarbonate*	Interdit	Mai 2017**
	Papiers thermiques	Interdiction en discussion	
Afrique du Sud	Biberons en polycarbonate	Interdit	2011
Australie	Pas d'interdiction réglementaire		
Chine	Biberons en polycarbonate	Interdit	2011
Canada	Biberons en polycarbonate	Interdit	2010
Japon	Pas d'interdiction, mais mesures volontaires des fabricants		
Malaisie	Biberons en polycarbonate	Interdit	2012
USA	Biberons en polycarbonate	Interdit	2012
	Contenants alimentaires dédiés aux enfants de moins de 3 ans	Interdit ou non selon les Etats	2010-2013

\* Dans le cadre de la législation des matières plastiques en contact avec les denrées alimentaires

\*\* Avec une période transitoire d'1 an

une interdiction plus généralisée notamment dans les biberons et aussi dans les contenants alimentaires. Ces interdictions se mettent en place dans le monde au fil des années.

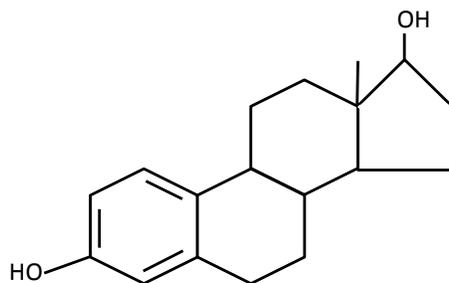
Tiré de Bisphénol A, Office fédéral de la santé publique OFSP, Confédération suisse.

## Substituts et métabolites

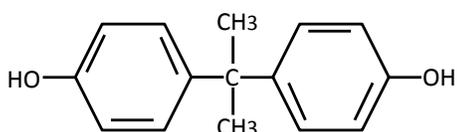
Devant l'interdiction du BPA dans la majorité des pays, les industries plastiques ont dû chercher des substituts analogues. En effet, il a fallu trouver des substituts qui confèrent solidité et résistance au plastique au même titre que le BPA. Tous les substituts actuellement utilisés sont également des bisphénols (BPS, BPF, BPB ou encore BPE) (63) (**Figure 8**). Comme pour le BPA, ces analogues sont retrouvés dans les produits de polymérisation du plastique en quantités différentes. De plus, ils sont tous capables d'entrer en contact avec le corps humain à travers la peau (papiers thermiques des tickets de caisses) et la contamination alimentaire (contenants ou biberons) (64,65). La plupart des produits sans BPA ne vont pas être sans bisphénols ; ils vont avoir un ou plusieurs de ces substituts. Leurs structures moléculaires très similaires (noyaux phénols) suggèrent que leurs effets secondaires sont les mêmes que le BPA (66). Le BPS reste le substitut majoritairement utilisé dans les industries plastiques, de par sa contribution à une meilleure résistance à la chaleur et aux rayons du soleil (67). Même si des études récentes mettent en avant sa dangerosité, il est déjà présent dans presque tous les produits de remplacement du BPA comme le polyethersulfone (PES) qui tapisse dorénavant les biberons, mais aussi les contenants alimentaires (68). Les industries en produisent de plus en plus chaque année et une étude le détecte dans 85% de l'urine des américains (69). Comparé avec les autres substituts, le BPS possède l'activité oestrogénique et anti-androgénique la plus faible, mais cela n'empêche pas que celui-ci et les autres analogues possèdent un profil toxicologique similaire au BPA et sont impliqués dans des effets sur le métabolisme, le stress oxydatif ou encore le cancer (70).

Malgré le manque d'études sur les substituts, la métabolisation du BPA et du BPS dans notre corps a été récemment mieux caractérisé. Le BPA et le BPS vont être métabolisés principalement dans le foie. Ils peuvent subir une glucuronidation ou une sulfatation (71). Majoritairement, la voie la plus utilisée est la glucuronidation qui va permettre de métaboliser les bisphénols en bisphénols glucuronidés grâce aux enzymes UDP-glucuronosyltransférases (72,73).

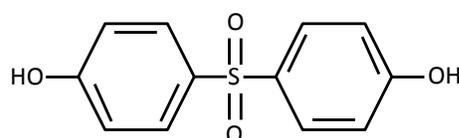
17 $\beta$ -Estradiol (E2)



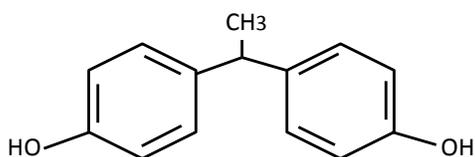
Bisphénol A (BPA)



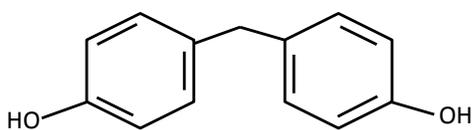
Bisphénol S (BPS)



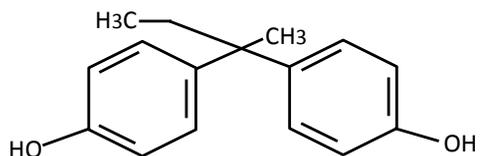
Bisphénol E (BPE)



Bisphénol F (BPF)



Bisphénol B (BPB)



**Figure 8 : L'estradiol avec la famille des bisphénols**

L'estradiol, le ligand naturel des récepteurs oestrogéniques nucléaires, est représenté en premier, au-dessus de cette figure. En dessous de celui-ci se trouve le perturbateur oestrogénique BPA avec ses différents analogues.

## Effets sur la santé humaine

Les bisphénols, de par leur affinité pour les récepteurs des œstrogènes, sont impliqués dans des perturbations hormonales qui vont affecter la puberté, la fertilité masculine et féminine, les tumeurs hormono-dépendantes comme le cancer du sein ou de la prostate, mais aussi l'immunité (74) (**Figure 9**).

De nombreuses études ont démontré le rôle des bisphénols dans les troubles de la fertilité. *In vitro*, une exposition aux bisphénols affecte la mobilité des spermatozoïdes et leur nombre dans le sperme constituant ainsi les principales causes de l'infertilité masculine (75). Les bisphénols peuvent également se fixer sur les récepteurs des androgènes en ayant un effet antagoniste. En effet, il a été montré qu'une exposition à ces perturbateurs endocriniens peut provoquer une féminisation des fœtus mâles, une atrophie des testicules et des glandes épидидymes et une augmentation de la taille de la prostate (76). Chez la femme, ils seraient impliqués dans des anomalies morphologiques et fonctionnelles de l'appareil reproducteur comme l'utérus où ils diminueraient la qualité des parois utérines entraînant une diminution des sites d'implantations de l'embryon (77).

Le BPA utilisé dans des études sur des rongeurs et des primates affecte la morphologie de la glande mammaire de la progéniture exposée *in utero*. En provoquant une augmentation du tissu épithélial dans la glande mammaire, le BPA favorise l'apparition de lésion cancéreuses sans l'action d'autres carcinogènes comme les tératogènes (78). Une étude effectuée sur l'homme met en association l'exposition au BPA et le développement du cancer de la prostate. En effet, dans cette étude, les patients atteints du cancer de la prostate ont un niveau de BPA urinaire quatre fois supérieur au groupe témoin. Le BPA induirait une augmentation du nombre de centrosomes et cette augmentation entraîne une instabilité génétique directement impliquée dans le cycle cellulaire et le développement de cellules malignes (79).

Une exposition au BPA impacterait également autant l'immunité innée que l'immunité acquise. En effet, il diminuerait la capacité de phagocytose des macrophages et augmenterait la production de cytokines pro-inflammatoire, tels que le TNF et l'IL-6

(80,81). Il diminue le nombre de cellules T régulatrices, ce qui entraîne une altération des réponses Th1/Th2 (82).



**Figure 9 : Les effets systémiques du BPA**

Il s'agit d'un dessin qui représente Popeye et les effets que lui procure une vie entière de consommation d'épinard contaminé par le BPA. L'ingestion prolongée de BPA est responsable de nombreux symptômes et est un facteur aggravant de nombreuses maladies.

Tirée du site web <https://joemohrtoons.com/2010/11/23/canned-spinach-killing-popeye-cartoon/>.

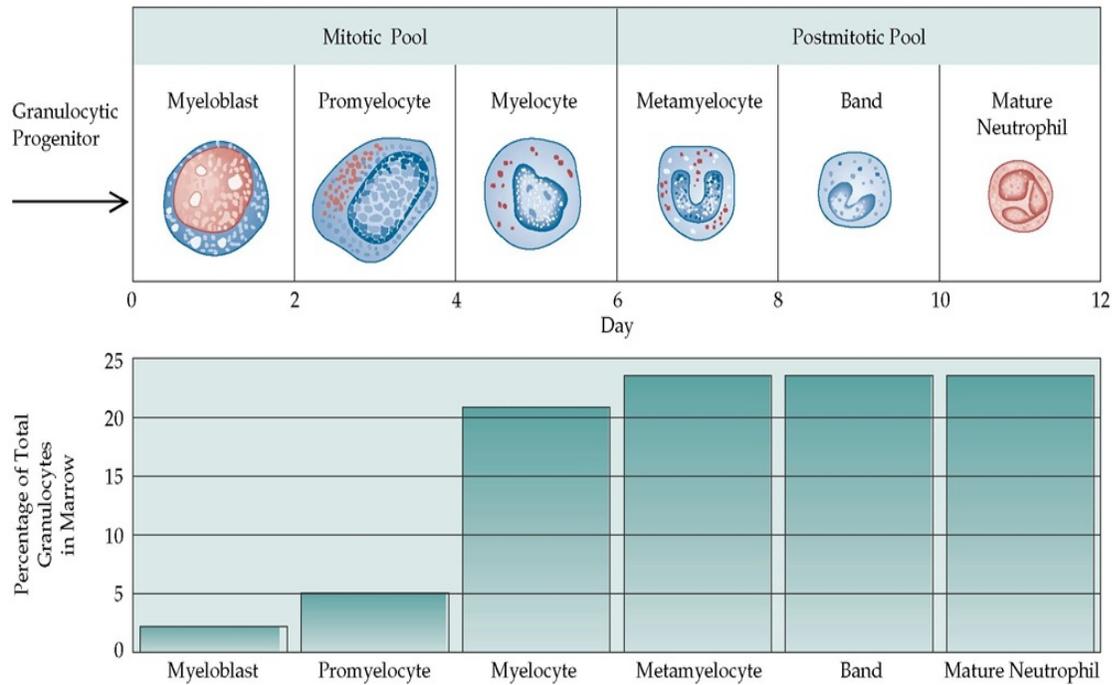
## Les neutrophiles

### Généralités

Les neutrophiles humains sont des leucocytes polymorphonucléaires et sont les leucocytes les plus abondants du sang. Ils sont les premiers sur les lieux d'une infection et constituent notre première ligne de défense contre les microbes (83). Les neutrophiles dérivent de la cellule souche hématopoïétique qui donne aussi naissance aux érythrocytes, aux plaquettes et aux autres leucocytes. Ils sont formés dans la moelle osseuse et subissent différents stades. Au bout de 10 à 14 jours, ils deviennent matures et ils ont une durée de vie relativement courte (**Figure 10**). En effet, la demi-vie du neutrophile dans le sang est de 6 à 8 heures, mais ils peuvent persister plusieurs jours dans les tissus au cours d'infections (84). Au cours de leur cycle de maturation, ils vont acquérir divers granules. Les granules contiennent des protéases, des défensines, d'autres substances antimicrobiennes et diverses protéines comme la collagénase (85).

Du fait de leur faible contenance en mitochondries, les neutrophiles produisent l'essentiel de leur énergie sous forme d'ATP via la glycolyse afin d'assurer leurs fonctions (86). Les neutrophiles réalisent leurs fonctions dans les tissus infectés en franchissant la barrière endothéliale. Ils combattent donc les microbes dans un milieu anaérobie qui convient à leur orientation métabolique.

Les neutrophiles expriment une large variété de récepteurs à leur surface qui vont servir à la reconnaissance des pathogènes, mais également à leur migration dans les tissus infectés (87). Brièvement, ceci inclut des récepteurs couplés aux protéines G, qui vont se lier aux chimioattractants comme la N-formylméthionine-leucyl-phénylalanine (fMLP), ou encore des sélectines et des intégrines qui vont aider au phénomène de diapédèse. Cinq grandes familles de récepteurs de motifs moléculaires (PRR) participent à la reconnaissance des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP) (88) (**Figure 11**).



**Figure 10 : Les précurseurs du neutrophile**

Dans la moelle osseuse, le myéloblaste passe par différents stades au cours desquels il va y avoir la formation des granules et le modelage du noyau multilobé. La formation du neutrophile (au-dessus) est séparée en deux phases : une phase mitotique et l'autre phase post-mitotique ou de maturation. Le pourcentage de neutrophiles à chaque stade de développement (en-dessous) dans la moelle osseuse va de 2.5% au stade du myéloblaste à environ 25% au stade du neutrophile mature.

Tirée de <http://what-when-how.com/acp-medicine/nonmalignant-disorders-of-leukocytes-part-1/>.

G-protein-coupled receptors	Fc-receptors	Adhesion receptors	Cytokine receptors	Innate immune receptors
<i>Formyl-peptide receptors</i>	<i>Fcγ-receptors</i>	<i>Selectins and selectin ligands</i>	<i>Type I cytokine receptors</i>	<i>Toll-like receptors</i>
• FPR1 (FPR)	• FcγRI	• L-selectin	• IL-4R	• TLR1
• FPR2 (FPRL1)	• FcγRIIA (human)	• PSGL-1	• IL-6R	• TLR2
• FPR3 (FPRL2)	• FcγRIIB (inhibitory)	<i>Integrins</i>	• IL-12R	• TLR4
<i>Classical chemoattractant receptors</i>	• FcγRIII (mouse)	• LFA-1 ( $\alpha_L\beta_2$ )	• IL-15R	• TLR5
• BLT1 (LTB <sub>4</sub> -rec.)	• FcγRIIIB (human)	• Mac-1 ( $\alpha_M\beta_2$ )	• G-CSFR	• TLR6
• BLT2 (LTB <sub>4</sub> -rec.)	• FcγRIV (mouse)	• VLA-4 ( $\alpha_4\beta_1$ )	• GM-CSFR	• TLR7 (?)
• PAFR	<i>Fcα-receptors</i>		<i>Type II cytokine receptors</i>	• TLR8
• C5aR	• FcαRI (human)		• IFNAR (IFN $\alpha/\beta$ -rec.)	• TLR9
<i>Chemokine receptors</i>	<i>Fcε-receptors</i>		• IFNGR	<i>C-type lectins</i>
• CXCR1 (human)	• FcεRI		• IL-10R	• Dectin-1
• CXCR2	• FcεRII		<i>IL-1R family</i>	• Mincle
• CCR1			• IL-1RI	• MDL-1
• CCR2			• IL1RII (decoy)	• Mcl
			• IL-18R	• CLEC-2
			<i>TNFR family</i>	<i>NOD-like receptors</i>
			• TNFR1 (p55)	• NOD2
			• TNFR2 (p75)	• NLRP3
			• Fas	<i>RIG-like receptors</i>
			• LTβR	• RIG-I
			• RANK	• MDA5
			• TRAIL-R2	
			• TRAIL-R3	

**Figure 11 : Les différentes classes de récepteurs du neutrophile**

Il existe cinq grandes familles de récepteurs exprimés sur le neutrophile. Nous retrouvons la famille des récepteurs couplés aux protéines G comme les récepteurs de chimiokines par exemple, la famille des récepteurs Fc, les récepteurs d'adhésion, les récepteurs des cytokines et les récepteurs de l'immunité innée.

Tirée de Futosi *et al.* 2013 (88)

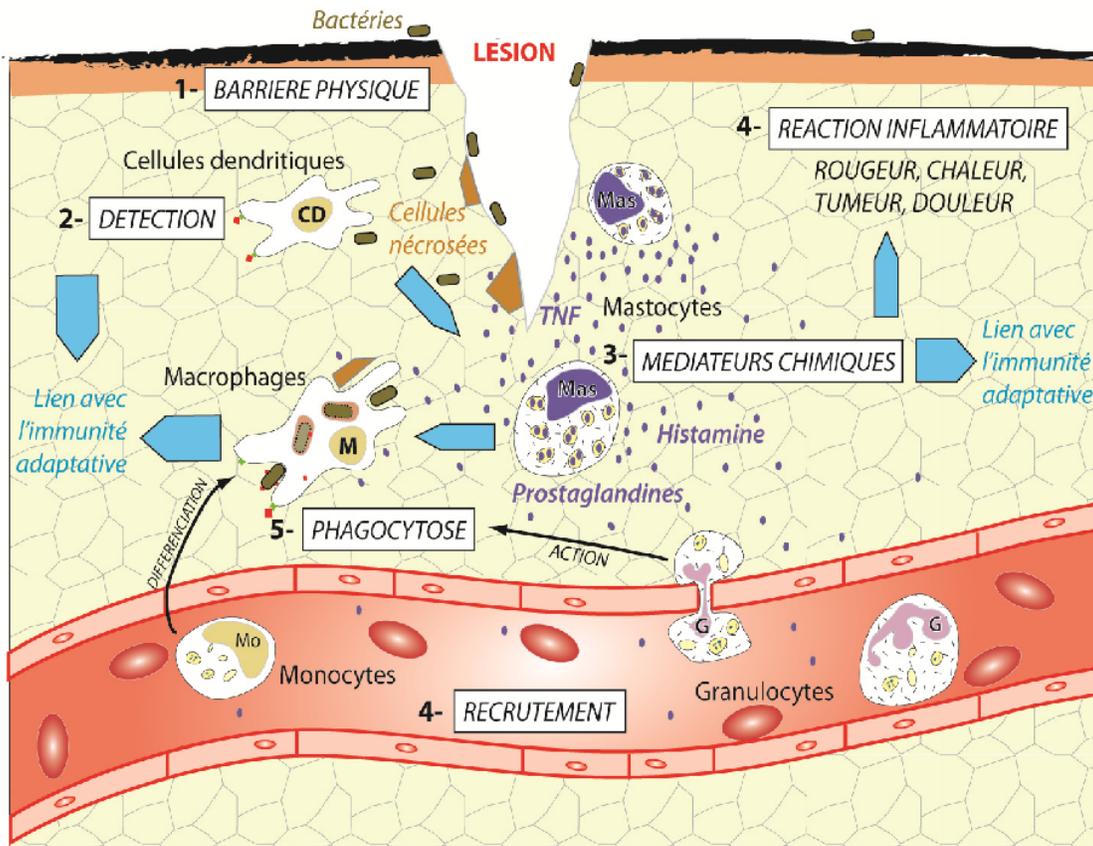
La liaison des PAMP aux PRR mène à l'activation cellulaire et à l'élimination des pathogènes grâce aux diverses fonctions du neutrophile comme la libération de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS), de cytokines pro-inflammatoires, la phagocytose ou encore la NETose. La régulation des neutrophiles se doit d'être relativement précise car un trop faible nombre (neutropénie) entraîne des infections sévères et récurrentes tandis qu'un trop grand nombre (neutrophilie) cause de l'auto-immunité et des lésions tissulaires (89).

### **La réaction inflammatoire**

Les premières cellules immunitaires à entrer en contact avec les bactéries qui réussissent à franchir la barrière épithéliale sont les cellules phagocytaires. Nous pouvons distinguer les macrophages, les granulocytes et les cellules dendritiques (**Figure 12**). Les macrophages dérivent de la maturation des monocytes circulants dans le sang et sont présents dans les tissus. Les granulocytes sont composés des éosinophiles, des basophiles et des neutrophiles. Ensemble, les macrophages et les granulocytes ont un rôle important dans l'immunité innée : ils vont reconnaître, ingérer et détruire les pathogènes (90).

Les cellules dendritiques sont présentes dans les tissus et dans la circulation à l'état immature et sont responsables de la capture des antigènes. Les PRR peuvent reconnaître spécifiquement les PAMP des pathogènes. En exemple, le lipopolysaccharide (LPS) bactérien se fixe sur le récepteur TLR4 (91). Ces PRR sont présents à la surface de toutes les cellules immunitaires. Ils peuvent être extracellulaires, intracellulaires ou sécrétés (92). Quand le pathogène franchit la barrière épithéliale, il peut donc activer les mastocytes (liaison PAMP/PRR) qui vont libérer de grandes quantités d'histamine. L'histamine fait partie des médiateurs inflammatoires dérivés des cellules et elle a pour effet de favoriser la vasodilatation et l'augmentation de la perméabilité vasculaire (93). Ces effets vont permettre l'entrée massive de globules blancs. Ce phénomène s'appelle la diapédèse.

## Les mécanismes de l'immunité innée



**Figure 12 : La réaction inflammatoire**

1 : Barrière physique lésée ; 2 : Détection des pathogènes ; 3 : Libération des médiateurs chimiques ; 4 : Recrutement des cellules immunitaires et réaction inflammatoire ; 5 : Phagocytose des pathogènes. La réaction inflammatoire est caractérisée par cinq points cardinaux que sont la rougeur, la douleur, la chaleur, le gonflement et la perte de fonction. Ces points cardinaux apparaissent suite à l'action de médiateurs chimiques et cellulaires. Si un microbe arrive à franchir nos barrières physiques, il va être détecté par les récepteurs des cellules de l'immunité innée (cellules dendritiques, neutrophiles ou macrophages). Une fois ces cellules activées, elles peuvent exercer leurs fonctions effectrices comme l'élimination du pathogène et aussi libérer des médiateurs chimiques (l'histamine par les mastocytes). Ces médiateurs chimiques vont permettre de créer une inflammation et de l'entretenir en recrutant d'autres acteurs de l'immunité.

Tirée de <http://svt.laurence.michel.pagesperso-orange.fr/page86.html>.

Les macrophages, également présents dans les tissus, sont activés par les liaisons PAMP/PRR. Activés, les macrophages vont phagocyter les pathogènes grâce à de nombreux récepteurs (exemple : récepteur au mannose) et aussi grâce à l'opsonisation des pathogènes par des anticorps ou par des protéines du complément (94). Ils vont aussi activer des cascades de signalisation aboutissant à l'activation de facteurs de transcription, NF- $\kappa$ B, AP-1 et IRF. NF- $\kappa$ B et AP-1 vont induire la transcription de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires comme le TNF, l'IL-1 ou encore le CXCL8/IL-8. L'IRF induit la transcription de l'interféron  $\alpha$  et  $\beta$  (95). Ces chimiokines, en plus des cytokines libérées par les cellules épithéliales, vont permettre le recrutement d'autres cellules immunitaires au site infecté. Elles vont également entretenir l'inflammation locale et systémique en induisant de la fièvre par exemple (96). Dirigés par le gradient de chimiokines, les neutrophiles migrent de la circulation sanguine vers les tissus infectés où ils vont s'activer grâce aux liaisons PAMP/PRR. Les neutrophiles participent à l'élimination des bactéries grâce à la phagocytose (facilitée par l'opsonisation), la production de ROS ou encore la NETose (libération d'ADN et d'enzymes qui vont piéger et détruire les pathogènes) (97).

Les monocytes circulant dans le sang vont traverser la barrière endothéliale pour rejoindre les tissus infectés et se différencier en macrophages qui, à leur tour, vont pouvoir phagocyter et libérer des cytokines pro-inflammatoires. D'autres médiateurs sont importants dans l'inflammation : ce sont les métabolites de l'acide arachidonique produits par les cellules endothéliales, les mastocytes et d'autres types de cellules immunitaires (98). Nous trouvons les prostaglandines qui induisent de la fièvre et de la sensation de douleur et les leucotriènes (libérés aussi par les basophiles) qui ont un rôle de chimioattractant et qui augmentent également la perméabilité vasculaire (99). Il existe aussi des médiateurs qui dérivent du plasma, les protéines du complément et les kinines qui sont impliqués dans le témoin de la douleur et la vasodilatation (100).

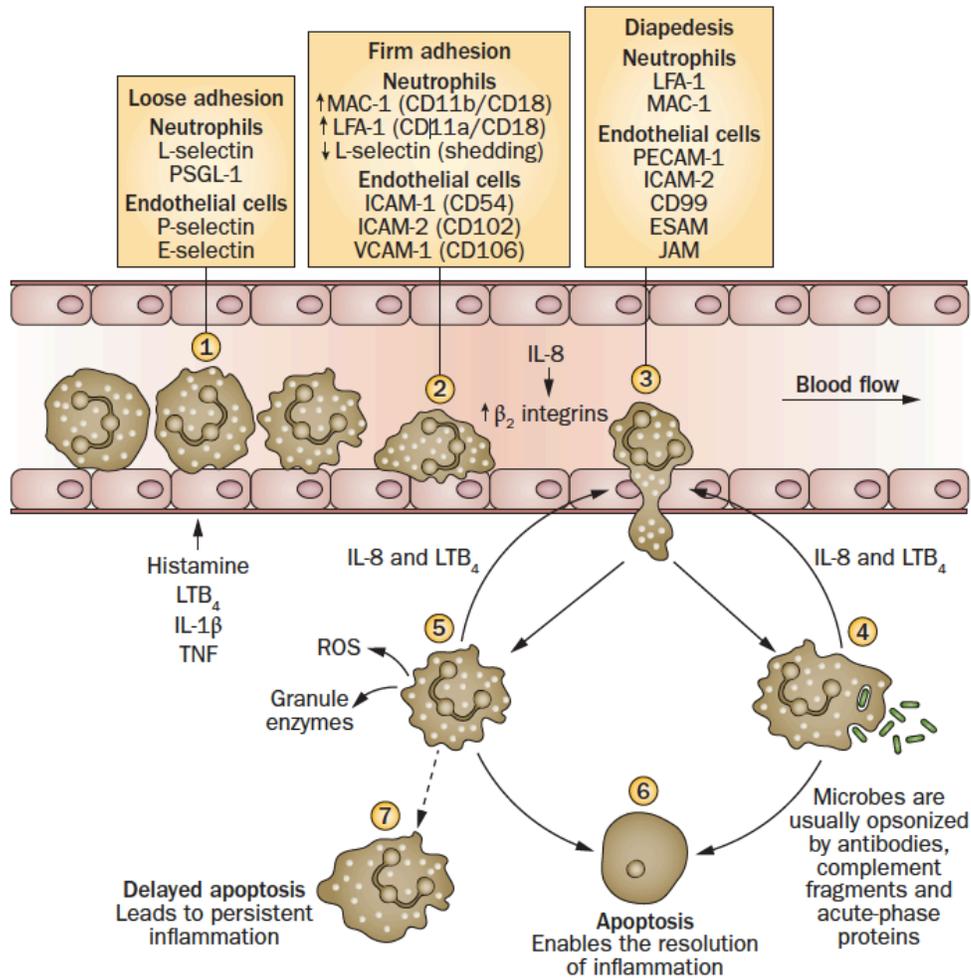
## La migration

En conditions physiologiques, les neutrophiles circulent dans le sang et se fixent de manière plus ou moins importante à la surface de l'endothélium vasculaire. Sous l'effet d'un gradient de chimioattractants prenant sa source au lieu d'infection, les neutrophiles vont être activés et vont effectuer une transmigration endothéliale. Ils vont migrer au site d'infection pour combattre les pathogènes. Cette transmigration ou diapédèse s'effectue en 4 étapes : la capture, le roulement et l'adhésion faible et réversible, l'adhésion forte et irréversible et finalement la traversée de l'endothélium vasculaire vers les tissus sous-jacents infectés (**Figure 13**).

Les neutrophiles effectuent un contact avec l'endothélium grâce aux L-sélectines (CD62L) présentes à la surface des neutrophiles et leurs ligands mucosialine (CD34) présents à la surface de l'endothélium. Ce contact est faible et réversible, mais permet aux cellules de ralentir leur vitesse (101).

Normalement, les cellules continuent leur chemin dans la circulation sanguine mais en conditions inflammatoires, comme lors d'infections, de nombreuses cytokines pro-inflammatoires (exemple : TNF ou IL-1) sont produites dans le tissu infecté ainsi que des chimioattractants (exemple : fMLP ou CXCL8/IL-8). Ces interleukines activent l'endothélium et ce dernier va exprimer des sélectines P/E. Les E-sélectines endothéliales fixent les mucines-CAM des neutrophiles et les P-sélectines endothéliales fixent des oligosaccharides des neutrophiles. Ces nouveaux contacts neutrophile-endothélium permettent le roulement du neutrophile à une vitesse encore plus réduite que le simple contact L-sélectine/CD34, mais les contacts sont toujours faibles, transitoires et réversibles (102).

Les neutrophiles possèdent à leur surface des récepteurs d'interleukines ou de chimioattractants comme les récepteurs au fMLP ou les récepteurs à CXCL8/IL-8. Les endothéliums activés produisent de grandes quantités de CXCL8/IL-8.



**Figure 13 : La transmigration du neutrophile**

1 : Adhésion faible ; 2 : Adhésion forte ; 3 : Diapédèse ; 4 : Phagocytose ; 5 : Libération des ROS et des enzymes ; 6 : Apoptose ; 7 : Apoptose retardée. La migration du neutrophile est caractérisée par plusieurs étapes. Le neutrophile va tout d'abord se lier avec une faible affinité à certaines molécules d'adhésion de l'endothélium. En condition infectieuse, l'endothélium exprime des molécules comme le TNF, le fMLP ou encore le CXCL8/IL8 qui vont rendre la liaison du neutrophile irréversible et de forte affinité. Le neutrophile va ensuite réarranger sa conformation pour pouvoir traverser l'endothélium et aller exercer ses fonctions effectrices. Si les pathogènes sont tous éliminés, le neutrophile va entrer en apoptose sinon, il va retarder sa mort pour éliminer ceux qui restent.

Tirée de Wright *et al.* 2014 (103)

La liaison de la chimiokine à son récepteur va permettre l'activation des neutrophiles, qui vont alors pouvoir interagir avec de nouvelles protéines inactives jusque-là : les intégrines, majoritairement de la famille ICAM. LFA-1 (CD11a/CD18), ligand des intégrines est constitutivement présent à la surface de l'endothélium. Un nouveau contact peut désormais s'effectuer, le contact ICAM-1/LFA-1 (104). Ce contact est irréversible et fort. Les neutrophiles sont désormais bloqués dans leur circulation à l'endroit où ils détectent un gradient de chimioattractants (gradient de fMLP) par exemple.

Les neutrophiles vont désormais effectuer la diapédèse entre les cellules endothéliales. Pour commencer, il est nécessaire d'ouvrir les jonctions endothéliales qui sont étroites. Les interactions neutrophile/endothélium via l'intégrine  $\beta 2$  et ICAM-1 déclenchent la phosphorylation de la cadhérine VE ce qui aboutit à l'ouverture des jonctions endothéliales. Les neutrophiles migrent ensuite grâce à de fortes interactions entre JAM-A/C et PECAM. Les interactions PECAM recrutent d'autres acteurs comme CD99 (MIC2) qui permet de guider les neutrophiles durant leur migration (105).

## La phagocytose

La phagocytose est une fonction importante du neutrophile car elle participe à l'élimination des pathogènes. D'autres cellules sont capables de phagocytose comme les macrophages ou les cellules dendritiques mais sur un site d'infection, les neutrophiles, de par leur nombre, seront des phagocytes importants (106).

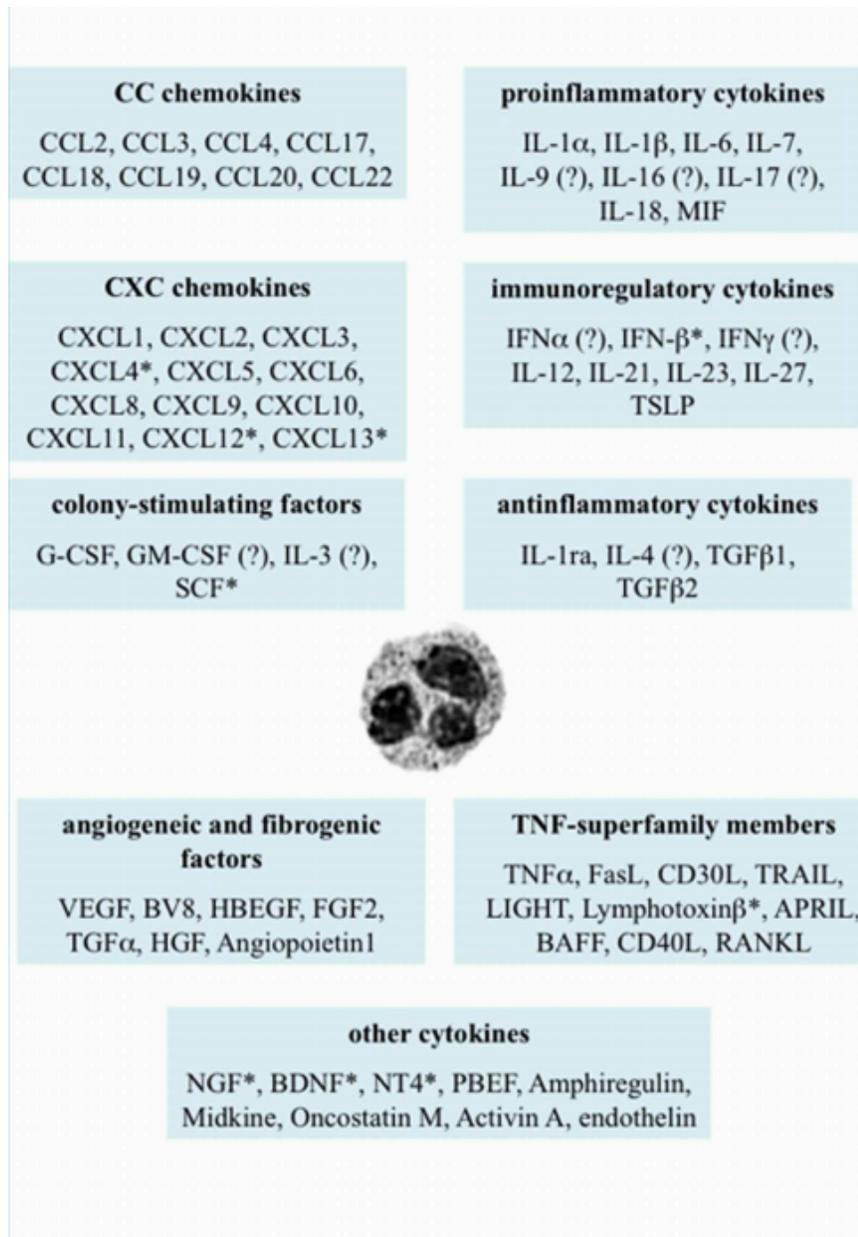
Grâce notamment aux récepteurs  $Fc\gamma$  et aux CR3 (Complement Receptor 3) qui sont présents sur la membrane des neutrophiles, il peut y avoir des liaisons entre le pathogène et le neutrophile. Les pathogènes opsonisés par des anticorps IgG vont pouvoir se fixer aux récepteurs  $Fc\gamma$  tandis que ceux opsonisés par des molécules du complément vont se lier aux CR3. Des PAMP peuvent également déclencher la phagocytose, soit directement ou indirectement, en se fixant aux PRR (107). Cette liaison constitue la première étape de la phagocytose. L'attachement du pathogène aux neutrophiles induit un changement du cytosquelette; l'actine présente sur le site d'ingestion se polymérise et cause un changement de la structure membranaire pour former les pseudopodes (108). Les pseudopodes vont commencer à entourer le pathogène jusqu'à son internalisation complète. À partir de cette étape, l'actine va se dépolymériser menant à la formation d'une vacuole, le phagosome (109).

Le phagosome présent dans le cytosol va fusionner avec un lysosome qui contient de nombreux ROS et des protéases. Toutes ces molécules vont dégrader le pathogène en plusieurs fragments qui vont pouvoir être exocytés tandis que d'autres fragments vont pouvoir se lier à des molécules d'histocompatibilité (CMH, complexe majeur d'histocompatibilité) et interagir dans la réaction dite « de second contact ». Cette réaction est caractérisée par une seconde rencontre avec le dit pathogène et d'une réaction immunitaire plus rapide et plus efficace (108,110). Il est intéressant de noter que le neutrophile lui-même peut faciliter la phagocytose par le processus de NETose. Pour cela, il peut éjecter son propre matériel génétique sur sa cible afin de l'engluer. Il éjecte une substance longue et visqueuse, son ADN, des histones et des granules qui vont figer les pathogènes et rendre ainsi leur élimination plus facile (111).

## La production de molécules inflammatoires

Les neutrophiles peuvent sécréter des molécules chimiotactiques comme le CXCL8/IL-8 qui va attirer d'autres neutrophiles et ainsi garder un nombre suffisant pour combattre l'infection. Les neutrophiles synthétisent diverses cytokines dépendamment de l'agoniste. Ils sécrètent de nombreuses cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 ou encore le TNF (112) (**Figure 14**).

Les neutrophiles sont également capables de produire des ROS lors de la phagocytose ou sous l'effet d'agonistes solubles. En effet, une fois activés, les neutrophiles génèrent majoritairement des ROS grâce à l'enzyme NADPH oxydase; ce phénomène s'appelle l'explosion oxydative (respiratory burst) (113). L'explosion oxydative se déclenche grâce à la liaison aux récepteurs des neutrophiles, de molécules inflammatoires (molécules du complément), de PAMP (ex : fMLP, LPS) ou encore de chimiokines (CXCL8/IL-8). L'enzyme NADPH oxydase est constituée de deux protéines membranaires, la gp91phox et la p22phox. La gp91phox et la p22phox se situent au cœur du complexe protéique. Les cascades de signalisation vont permettre l'assemblage des sous-parties de l'enzyme NADPH oxydase qui est donc quiescente en absence d'activation cellulaire. Ces sous-parties sont des protéines cytosoliques p47phox, p67phox et p40phox et une GTPase, RAC1 (114). L'enzyme devient active et fonctionnelle sur les membranes cellulaires et va réduire les molécules d'O<sub>2</sub> en anions superoxydes (O<sub>2</sub><sup>-</sup>). Les ROS dérivent de cette molécule pour former de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou encore de l'HClO (115). Ces ROS peuvent s'accumuler dans le cytosol ou encore dans les vacuoles de la cellule comme les lysosomes. Un témoin de la quantité de ROS est indispensable durant une réponse immune. Effectivement une trop grande production de ROS peut entraîner des lésions tissulaires et potentiellement des maladies auto-immunes comme le lupus érythémateux disséminé (116). À l'inverse, des personnes peuvent être atteintes de granulomatose septique chronique, avoir une trop faible production de ROS et souffrir d'infections récurrentes.



**Figure 14 : Les cytokines exprimées/produites par les neutrophiles**

De nombreuses cytokines sont exprimées/produites par les neutrophiles, notamment lors d'une infection. Cette large gamme de cytokines disponibles fait de lui un adversaire redoutable contre les microbes. (\*) Réfère uniquement aux études réalisées au niveau de l'ARN messager. (?) Indique des données controversées.

Tirée de Tecchio *et al.* 2014 (117)

Cette pathologie est héréditaire récessive et présente sur le chromosome X. Généralement les phagocytes de ces patients ne possèdent pas de NADPH oxydase ou ont une absence d'un composé de l'enzyme. Il n'y a donc pas production suffisante de ROS durant une infection et cela se traduit par des granulomes. Ce sont des agrégats de cellules immunitaires et de pathogènes formant des boules en forme de grain ou des plaques sur la peau (118).

## L'apoptose des neutrophiles

Chez le neutrophile, il existe deux principales voies qui mènent à l'apoptose et donc à l'élimination de la cellule. Il existe la voie intrinsèque et la voie extrinsèque. La voie intrinsèque est associée avec la mitochondrie. Des agressions intracellulaires comme une augmentation de la concentration de ROS, des dommages de l'ADN ou encore des oncogènes constituent des signaux de mort (119). Ces signaux de mort mènent à l'activation des protéines de la famille Bcl-2. Cette famille comporte des protéines pro-apoptotiques (Bax ou Bak) et des protéines anti-apoptotiques (Bcl-xL ou Mcl-1) (120). En conditions normales, ces protéines se régulent entre elles et n'entraînent aucune conséquence. Mais en présence de stress et des signaux de mort qui s'accumulent, il y a une activation de la protéine p53 qui va activer elle-même la protéine pro-apoptotique Bax (121). La protéine Bax change de conformation et se fixe sur la membrane externe de la mitochondrie. Le pouvoir inhibiteur des protéines anti-apoptotiques sur Bax est bloqué par la protéine p53. En se fixant sur la mitochondrie, la protéine Bax crée des pores et permet la libération du cytochrome-C (122). S'en suit une chaîne d'activation qui commence par l'assemblage des cytochromes-C, des protéines Apaf-1 et des procaspases-9 formant ainsi l'apoptosome (123). Le relargage du cytochrome-C entraîne également une augmentation de la production de ROS et une libération du  $Ca^{2+}$  du réticulum endoplasmique (124). L'apoptosome clive la procaspase-9 en caspase-9. La caspase-9 active ensuite la caspase-3, la caspase-6 et la caspase-7. Ces caspases activées permettent l'activation des protéases et des nucléases, qui en complément avec les ROS, va induire la mort cellulaire (125).

L'autre voie existante est la voie extrinsèque. Suite à des signaux extracellulaires, des ligands solubles ou membranaires peuvent se fixer sur des récepteurs membranaires appartenant à la superfamille TNF comme les récepteurs Fas (126). Après fixation, le ligand entraîne la trimérisation du récepteur et son activation permet le recrutement de nombreuses protéines comme la protéine adaptatrice FADD. Ce processus induit l'activation de la procaspase-8 en caspase-8 (127). A partir de ce moment, les deux voies d'apoptose se combinent et exercent leurs rôles ensemble. En effet, la caspase-8 active à son tour la caspase-3, la caspase-6 et la caspase-7 (128). De plus, la caspase-8 permet

le clivage de la protéine Bid en tBid qui va permettre le changement de conformation de Bax et ainsi au final la perméabilisation de la membrane mitochondriale (129).

Dans leur processus d'apoptose, la membrane plasmique des cellules perd de son asymétrie et les phosphatidylsérines présentes sur le feuillet interne de la membrane se délocalisent sur le feuillet externe. Cette délocalisation est un signe pour les macrophages qui détectent les phosphatidylsérines extérieures comme des signaux de phagocytose. Les macrophages phagocytent les neutrophiles et empêchent de ce fait un éclatement de la cellule et une libération de composés toxiques pour les tissus environnants (130).

Le neutrophile possède une durée de vie très courte (6 à 8 heures), mais pour qu'il puisse exercer ces fonctions lors d'une infection, plusieurs paramètres se déclenchent pour retarder la mort cellulaire. En effet, premièrement l'hypoxie retrouvée dans les tissus pourrait retarder l'apoptose (131). De plus, la présence de certaines cytokines pro-inflammatoires jouent le rôle de facteur anti-apoptotique comme le GM-CSF, l'IL-1 $\beta$  ou encore le CXCL8/IL-8 (132). Une fois l'infection contrôlée, la concentration de cytokines pro-inflammatoires chutent et entraînent une apoptose des neutrophiles et de nombreuses cellules effectrices; c'est la résolution de l'inflammation (133).

## **Effets des bisphénols sur les fonctions des neutrophiles**

Les molécules chimiques, tel que le BPA, peuvent moduler les fonctions des neutrophiles. Deux études ont d'ailleurs montré l'effet du BPA sur les fonctions des neutrophiles de poissons-zèbres. Des embryons de poissons-zèbres exposés au BPA ont présenté un profil cytokinique différent de celui des témoins. En effet, les embryons exposés à différentes concentrations de BPA, présentent une production accrue de cytokines pro-inflammatoires, notamment l'IFN- $\gamma$ . La deuxième étude montre un nombre anormalement élevé de neutrophiles chez des larves de poissons-zèbres de 7 jours exposées 24h au BPA (134,135).

Une étude récente a utilisé des neutrophiles humains dans ces expériences. L'étude a révélé une corrélation concentration dépendante entre la production des ROS et la concentration de BPA. Plus la concentration de BPA est élevée et plus la production de ROS est forte. Cette production est presque totalement inhibée par l'ajout de PHTPP, un antagoniste des récepteurs ER $\beta$ . En plus de nous montrer l'effet du BPA sur la production de ROS, cette étude nous met en évidence également l'implication des récepteurs œstrogènes dans ce phénomène. Toujours dans la même étude, la présence de BPA avec les neutrophiles dans des chambres de migration contenant du fMLP montre une diminution significative de la migration des neutrophiles. Enfin, une exposition au BPA inhibe l'habilité des neutrophiles à éliminer les *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline (136).

Une dernière étude a reporté que le BPA induit une augmentation de production de monoxyde d'azote autant chez les femmes que chez les hommes mais qu'en conditions infectieuses (ajout de LPS), la production de ROS est diminuée et ce, même en présence de BPA. Une exposition au BPA semble augmenter l'expression de NF- $\kappa$ B dans les neutrophiles indépendamment du sexe (137).

# CHAPITRE 1 : PROBLEMATIQUE, HYPOTHESE ET OBJECTIFS

## 1.1 : Problématique

Le BPA affecte les réponses cellulaires de plusieurs cellules immunitaires et son substitut, le BPS, perturbe également nos cellules immunitaires avec l'avantage d'être beaucoup plus persistant que le BPA dans l'environnement. À l'avenir, nous serons donc de plus en plus en contact avec le substitut autorisé du BPA. Une fois absorbés dans le sang, le BPA et le BPS y circulent et peuvent donc potentiellement agir avec les cellules sanguines comme les neutrophiles. De plus, ces molécules entrent dans un cycle qui permet leur conversion majoritairement en métabolites glucuronidés qui peuvent être éliminés par l'urine. Or, ces métabolites peuvent recirculer dans le sang et exercer des actions sur les récepteurs des cellules, car ils ne sont pas inactifs.

Contrairement à la plupart des cellules, les neutrophiles sont restreints à une seule voie métabolique, la glycolyse. Cette unique voie métabolique leur apporte la grande majorité de l'énergie nécessaire à l'exercice de leurs réponses cellulaires. Une altération de leur métabolisme pourrait donc être directement impliquée avec une dérégulation des fonctions cellulaires et plus particulièrement dans le cas d'une infection où les neutrophiles sont les premiers acteurs de l'immunité. Les bisphénols affectent le métabolisme de plusieurs cellules, qu'en est-il des neutrophiles ?

## 1.2 : Hypothèse

**Le métabolisme bioénergétique et les réponses cellulaires requises dans une réponse inflammatoire sont diminués par les bisphénols.**

### **1.3 : Objectifs**

- Déterminer les effets des bisphénols et de leurs métabolites sur le métabolisme bioénergétique du neutrophile en réponse au fMLP, un agent bactérien.
- Déterminer les effets des bisphénols et de leurs métabolites sur les réponses cellulaires du neutrophile.

# CHAPITRE 2 : MATÉRIELS ET MÉTHODES

## 2.1 Matériel

### **Préparation des milieux**

Tous les milieux pour une utilisation avec des neutrophiles sont ajustés à un pH de 7.40 +/- 0.05 et passés sous un filtre de porosité 0.2 µm (Sarstedt, Montreal, QC, Canada) pour garantir un milieu stérile et physiologique pour les cellules sanguines.

### **Milieu d'incubation prolongée**

Ce milieu riche en facteurs de croissance va permettre l'incubation des neutrophiles humains dans des conditions optimales afin de retarder l'apoptose spontanée de ces cellules. Il s'agit du milieu Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI 1640, Wisent, St-Bruno, QC, Canada) supplémenté de 10% de sérum fœtal de bœuf (FBS, VWR Life Science, Seradigm, Mississauga, ON, Canada), de 25mM HEPES (Wisent, St-Bruno, QC, Canada) et d'une solution 1X Pénicilline/Streptomycine (Wisent, St-Bruno, QC, Canada).

### **Milieu pour les tests glycolytiques sur l'analyseur de flux extracellulaire (Agilent/Seahorse Bioscience)**

Ce milieu minimal (Dulbecco's Modified Eagle Medium - DMEM, XF base medium, Agilent/Seahorse Bioscience, North Billerica, MA, USA) ne détient pas de pouvoir tampon, ce qui permettra de détecter des changements au niveau de l'acidité du milieu (en raison de la glycolyse cellulaire). Il est donc nécessaire d'ajuster le pH de ce milieu en présence et en absence des activateurs et inhibiteurs métaboliques. De plus, contrairement au milieu d'incubation prolongée, ce milieu ne contient pas autant de facteurs de croissance, mais est toutefois supplémenté en laboratoire de 0.5% de FBS et de 0.5 mM de L-Glutamine (Wisent, St-Bruno, QC, Canada).

### **Tampon de lyse cellulaire**

Ce tampon est composé d'eau millipore contenant 0.5% triton X-100 (Biorad, Mississauga, ON, Canada), 10 mM HEPES, 150 mM NaCl (Wisent, St-Bruno, QC, Canada), 2 mM EGTA (Millipore Sigma, Oakville, ON, Canada), 2 mM EDTA (Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada), 10% NaN<sub>3</sub> (Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada) et 1mM PMSF (Millipore Sigma, Oakville, ON, Canada).

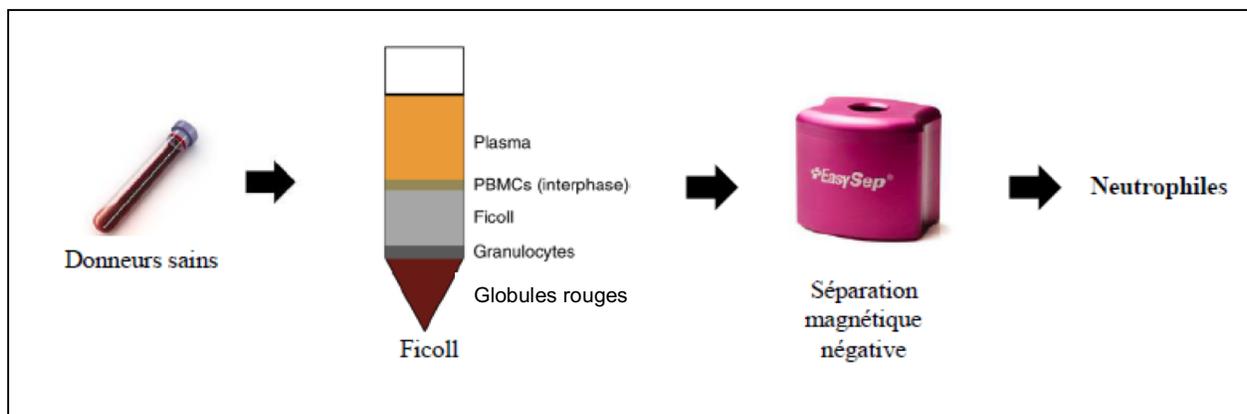
### **Molécules étudiées**

Les molécules étudiées ont toutes été diluées et aliquotées dans du DMSO 100% (Millipore Sigma, Oakville, ON, Canada). Le bisphénol A (BPA, Millipore Sigma, Oakville, ON, Canada), le bisphénol S (BPS, Millipore Sigma, Oakville, ON, Canada) ainsi que leurs métabolites, le bisphénol A  $\beta$ -D-Glucuronide (BPA-G, Toronto Research Chemicals, North York, ON, Canada) et le 4,4'-Bisphenol S O- $\beta$ -D-Glucuronide (BPS-G, Toronto Research Chemicals, North York, ON, Canada) sont conservées à -80°C.

## **2.2 Méthodes**

### **2.2.1 Isolement des neutrophiles humains :**

Nous utilisons des donneurs sains qui font don de leur sang pour la recherche en signant un consentement au protocole utilisé par la suite avec leur matériel sanguin. Le sang est collecté dans des tubes contenant du citrate de sodium afin d'éviter la coagulation. Les tubes sont ensuite centrifugés (400g 10 min) pour enlever le plasma. La portion cellulaire du sang sera ensuite séparée à l'aide d'un gradient de Ficoll (Lymphocyte separation medium, Wisent, St-Bruno, QC, Canada) (**Figure 15**) pendant 20 min à 600g. La couche des cellules mononucléaires périphériques sanguines (peripheral blood mononuclear cells – PBMC) est éliminée. Les cellules restantes vont passer par une séparation magnétique négative à l'ajout d'un cocktail d'anticorps (mélange d'anticorps monoclonaux dirigés contre les marqueurs de surface des cellules sanguines sauf les neutrophiles) et de billes magnétiques (EasySep Direct Human Neutrophil Isolation Kit, Stemcell, Vancouver, BC, Canada). Les neutrophiles ainsi purifiés sont centrifugés et resuspendus dans les milieux expérimentaux.



**Figure 15 : Isolement des neutrophiles**

Schéma récapitulatif de l'isolement des neutrophiles. Le sang est centrifugé une première fois pour enlever le plasma puis les cellules vont subir un gradient de Ficoll permettant d'éliminer les PBMC. Il ne reste ensuite que des globules rouges et des granulocytes. Afin d'avoir uniquement des neutrophiles purs, on ajoute un cocktail d'anticorps qui se fixent à une large gamme de molécules de surface sauf ceux des neutrophiles. En ajoutant des billes magnétiques, elles se fixent aux anticorps qui sont fixés sur les molécules ciblées et ce complexe adhère sur les parois du tube grâce au phénomène d'attraction magnétique. Le liquide, débarrassé de ces complexes, contient des neutrophiles purs.

### **2.2.2 Exposition des neutrophiles avec le bisphénol :**

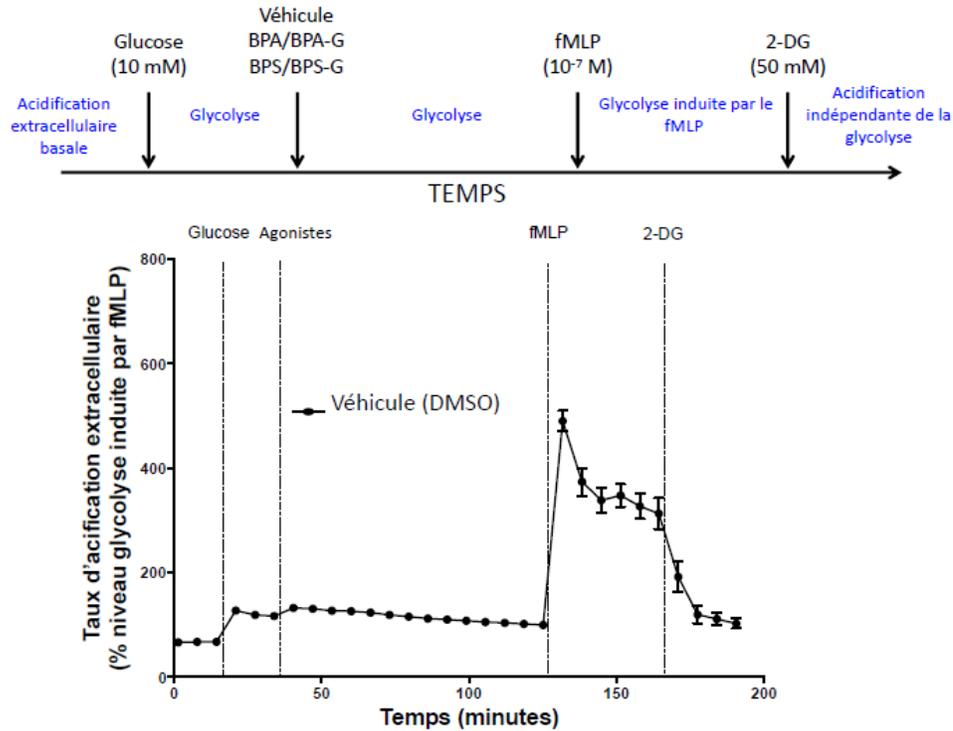
Les neutrophiles purifiés sont suspendus à une concentration de  $5 \times 10^6$ /mL dans du RPMI supplémenté avec 10% FBS + 1X Penicilline/Streptomycine (Wisent, St-Bruno, QC, Canada) dans une plaque 96 puits. Le BPA ( $10^{-12}$  à  $10^{-5}$  M), le BPS ( $10^{-12}$  à  $10^{-5}$  M), le BPA-G ( $10^{-12}$  à  $10^{-5}$  M) et le BPS-G ( $10^{-12}$  à  $10^{-5}$  M) ou le véhicule DMSO (dilué au même facteur de dilution de la plus forte concentration de bisphénol) sont ajoutés dans le milieu d'incubation durant 6 heures (cela correspond à la demi-vie d'un neutrophile soit une exposition prolongée) à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. L'exposition immédiate aux bisphénols est réalisée quant à elle directement dans l'instrument avant d'examiner leurs impacts sur le métabolisme glycolytique.

### **2.2.3 Étude du métabolisme glycolytique :**

L'analyseur de flux extracellulaire XFe96 (Agilent/Seahorse Bioscience, North Billerica, MA, USA) est utilisé pour déterminer le métabolisme bioénergétique des cellules. Il mesure à la fois le taux d'acidification extracellulaire (Extracellular Acidification Rate,

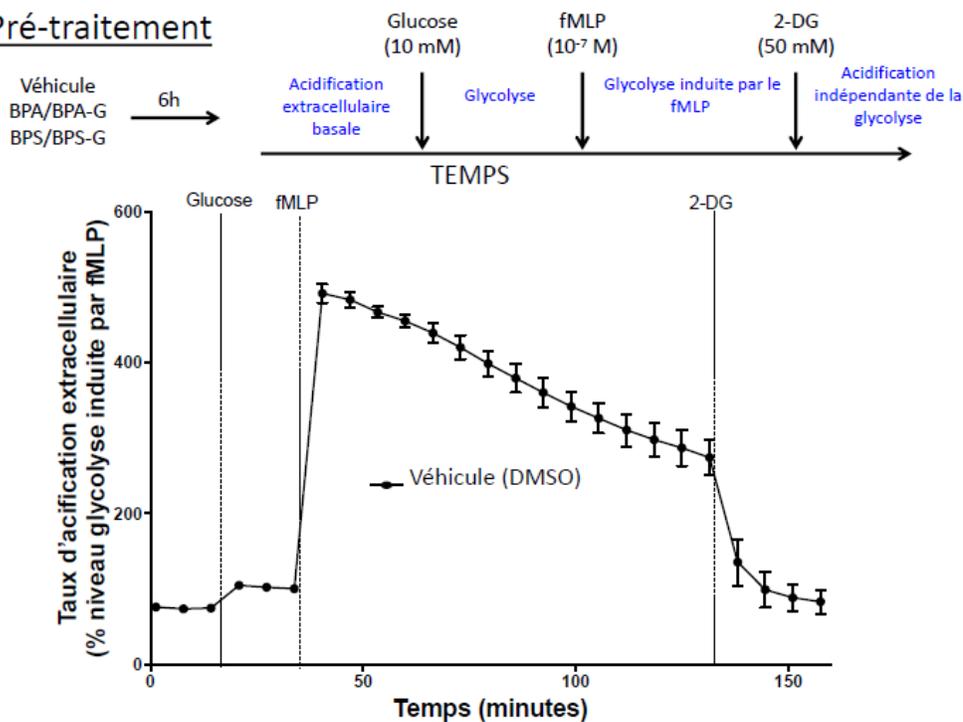
ECAR), relié à la glycolyse, et le taux de consommation d'oxygène (Oxygen Consumption Rate, OCR), relié principalement à la respiration mitochondriale, mais également à la production de ROS. Après une incubation (6h) ou non avec des bisphénols, les cellules sont suspendues (300 000 cellules par puit) dans des microplaques de culture cellulaire V3-PS (Seahorse XF96 V3 PS Cell Culture Microplates, Agilent/Seahorse Bioscience, North Billerica, MA, USA). Les cellules sont centrifugées (3min, 300g) puis équilibrées dans le milieu pour les tests glycolytiques pendant 1h à 37°C avant le début des mesures. Dans le cas d'une exposition immédiate aux bisphénols, le D-(+)-Glucose (10 mM ; Millipore Sigma, Oakville, ON, Canada), les bisphénols (concentrations variant de  $10^{-12}$  à  $10^{-5}$  M), le fMLP ( $10^{-7}$  M ; Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA) et le 2-deoxyglucose (2-DG, 50 mM ; VWR Life Science, Seradigm, Mississauga, ON, Canada) sont injectés séquentiellement à travers les ports de la plaque d'injection XFe96 (Seahorse XFe96 sensor cartridges, Agilent/Seahorse Bioscience, North Billerica, MA, USA). Lors d'une exposition prolongée où les cellules sont incubées d'abord dans du milieu RPMI en présence des bisphénols, lavées puis suspendues dans du milieu minimal (chapitre 2.1), seulement le glucose, le fMLP et le 2-DG sont injectés séquentiellement à travers les ports de la plaque d'injection. Au moins 3 cycles de mesures (3 min de mixage et 3 min de lecture) sont effectués avant et après chacune des injections selon la stratégie de stimulation (exposition immédiate ou prolongée) (**Figure 16**). Les mesures maximales d'ECAR (premier point suivant l'injection du fMLP) sont exprimées en pourcentages +/- SEM relatif au témoin (100%).

## Stratégie de stimulation: exposition immédiate



## Stratégie de stimulation: exposition prolongée

### Pré-traitement



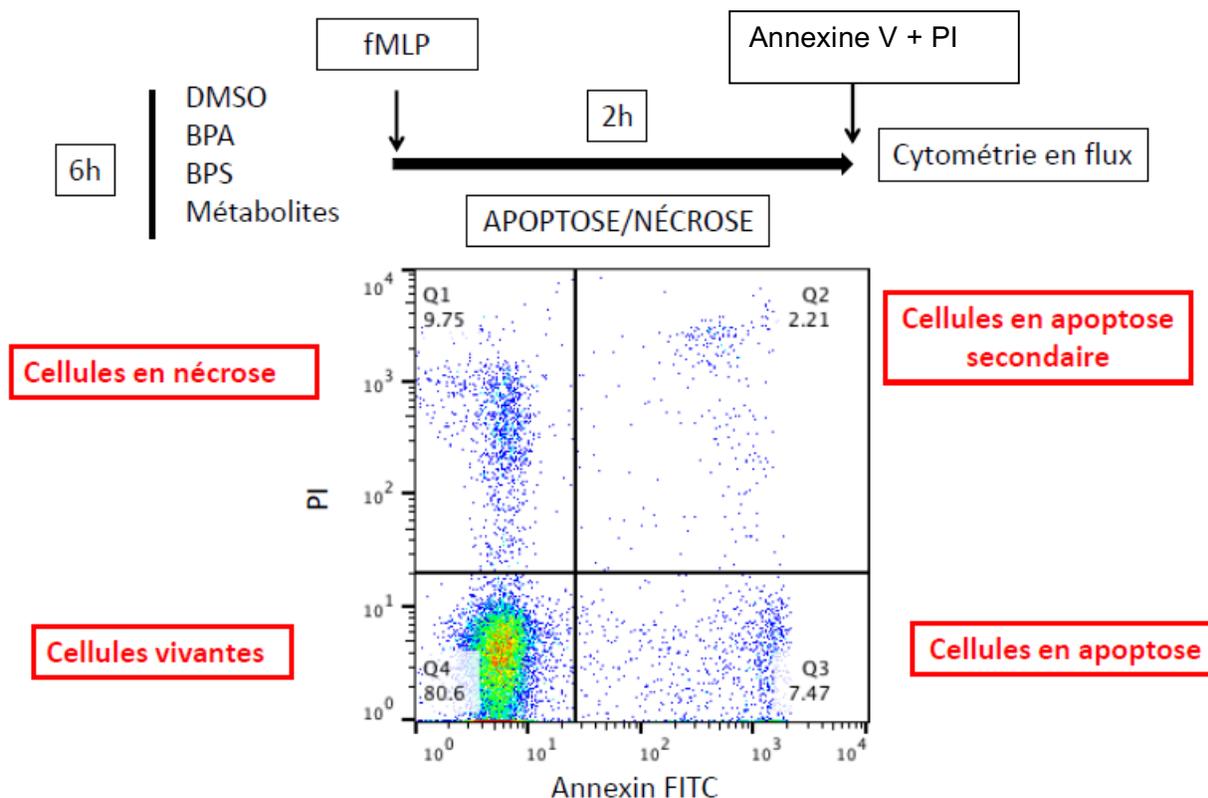
## Figure 16 : Les deux stratégies de stimulation

Le schéma illustre les deux stratégies de stimulation, l'immédiate et la prolongée (pré-incubation de 6h avec les bisphénols). Ces exemples avec du DMSO nous permettent de distinguer quatre paramètres : l'acidification extracellulaire basale (avant toute injection), la glycolyse (après l'injection du glucose) la glycolyse modulée par les bisphénols, la glycolyse induite par le fMLP (après l'injection du fMLP) et enfin l'acidification indépendante de la glycolyse (après l'injection du 2-DG).

### 2.2.4 Viabilité cellulaire :

L'effet d'une incubation de 6 heures aux bisphénols plus 2h de fMLP sur la viabilité des neutrophiles est mesuré grâce à un test classique d'annexine V + de l'iodure de propidium (PI, Propidium Iodide). En effet, l'annexine V se lie fortement aux phosphatidylsérines qui se trouvent exposés du côté extérieur de la membrane plasmique en conditions apoptotiques. L'iodure de propidium est un agent intercalant des acides nucléiques qui entre dans la cellule uniquement si la membrane est altérée, soit en conditions de nécrose (138). Les neutrophiles ( $1,25 \times 10^6$ /puit) sont suspendus dans 200 $\mu$ L de tampon de liaison 1X (Binding Buffer, VWR Life Science, Seradigm, Mississauga, ON, Canada) contenant 5 $\mu$ L de FITC-annexine V (VWR Life Science, Seradigm, Mississauga, ON, Canada) pendant 10 min à température ambiante dans l'obscurité. Les cellules sont par la suite lavées avec du tampon de liaison 1X et resuspendues dans 200 $\mu$ L de tampon de liaison 1X contenant 10 $\mu$ L d'iodure de propidium (VWR Life Science, Seradigm, Mississauga, ON, Canada). Les cellules sont transférées dans des tubes pour lecture au cytomètre en flux (FACSCalibur, BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada). Les cellules vivantes (Annexine-V<sup>-</sup>/PI<sup>-</sup>), en apoptose primaire (Annexine-V<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>), en apoptose secondaire (Annexine-V<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>) et en nécrose (Annexine-V<sup>-</sup>/PI<sup>+</sup>) sont exprimées en moyennes de pourcentages +/- SEM (**Figure 17**).

## Apoptose / Nécrose



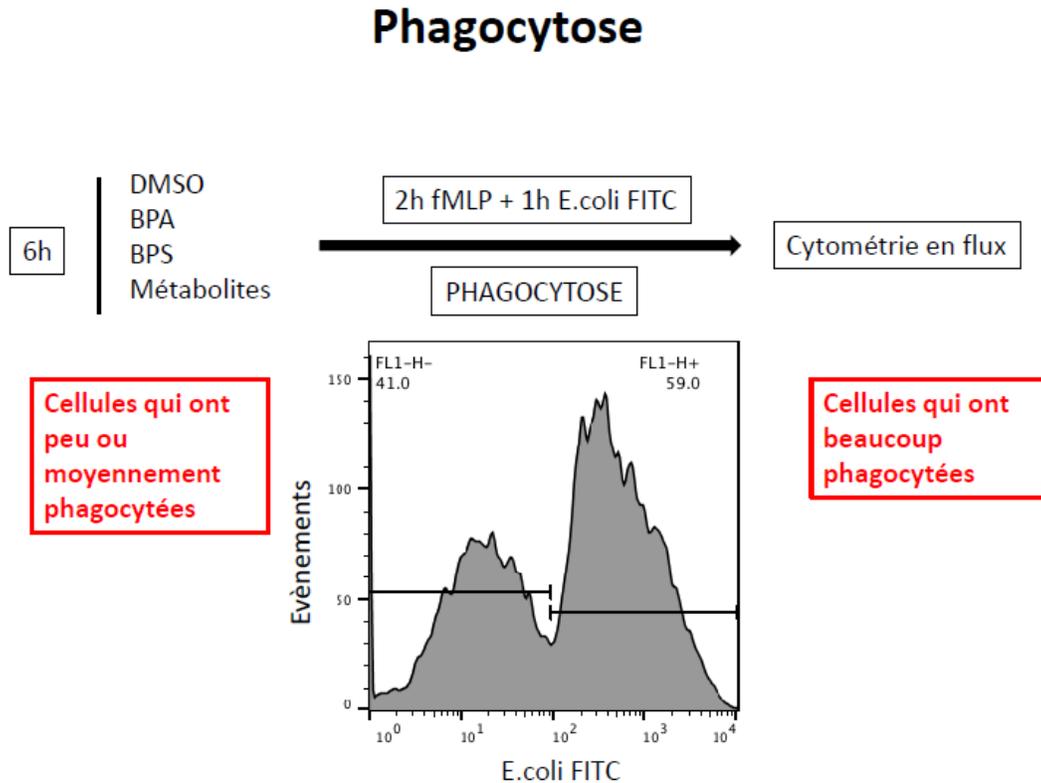
**Figure 17 : Test Annexine V/PI**

En représentation, nous pouvons voir un exemple de marquage Annexin V/PI au FACS pour des neutrophiles exposés au DMSO six heures puis deux heures au fMLP. Nous distinguons quatre populations : les cellules vivantes dans le quadrant inférieur gauche (AnnexineV-/PI-), les cellules en apoptose dans le quadrant inférieur droit (Annexine V+/PI-), les cellules en apoptose secondaire dans le quadrant supérieur droit (Annexine V+/PI+) et enfin les cellules en nécrose dans le quadrant supérieur gauche (Annexine V-/PI+)

### 2.2.5 Test de phagocytose :

Suite à l'incubation de 6 heures en présence ou non des bisphénols, les neutrophiles ( $5 \times 10^6$ /mL) sont lavées avec du milieu solution saline équilibrée de Hank 1X (HBSS, Wisent, St-Bruno, QC, Canada). Le fMLP ( $10^{-7}$ M) ou son témoin négatif est ajouté au milieu HBSS pendant 2 heures à  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ . Les cellules sont centrifugées (300g, 3 min) et suspendues avec 120  $\mu\text{L}$  de milieu HBSS 1X + 30  $\mu\text{L}$  de bioparticules *E.coli* FITC (VWR Life Science, Seradigm, Mississauga, ON, Canada) pendant 1 heure à  $37^\circ\text{C}$ , 5%

CO<sub>2</sub>. Les cellules sont lavées une fois avec du HBSS 1X et transférées dans des tubes appropriés au cytomètre en flux (FACSCalibur) (**Figure 18**). La moyenne géométrique (tendance centrale d'une série de valeurs) d'intensité de fluorescence est exprimée en unités arbitraires +/- SEM.



**Figure 18 : Test de phagocytose**

Dans cette figure, nous pouvons voir le profil de phagocytose de neutrophiles exposés au DMSO pendant six heures, deux heures avec du fMLP et enfin une heure avec *E.coli*. On distingue deux pics, le premier étant les cellules qui phagocytent faiblement (low) et le deuxième étant les cellules qui phagocytent fortement (high). La fluorescence des cellules non marquées est nulle.

#### 2.2.6 Détection et quantification de CXCL8/IL-8 intra et extracellulaire :

Suite à l'incubation de 6 heures en présence ou non des bisphénols, les cellules sont lavées au tampon phosphate saline 1X (PBS, Wisent, St-Bruno, QC, Canada). Du fMLP (10<sup>-7</sup>M) est ajouté à du nouveau milieu d'incubation (RPMI) pendant 2 heures à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Les surnageants sont récupérés après centrifugation et conservés à -30°C jusqu'à la détection du CXCL8/IL-8 extracellulaire par la méthode immuno-enzymatique de

l'ELISA. Les culots cellulaires résultants sont resuspendus dans le tampon de lyse cellulaire précédemment décrit (section 2.1) pendant 30 min à 4°C pour lyser les cellules. Les lysats sont récupérés et conservés à -30°C jusqu'à la détection du CXCL8/IL-8 intracellulaire par ELISA. Le test est effectué selon le protocole du manufacturier (R&D systems Human IL-8/CXCL8 DuoSet ELISA, Minneapolis, MN, USA) dans des plaques 96 puits mi-volume de Corning (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) avec une courbe standard de CXCL8/IL-8 s'échelonnant de 31,3 à 500 pg/mL. Les surnageants cellulaires sont dilués au 1/3 dans du milieu RPMI et les lysats cellulaires au 1/50 dans le tampon de lyse. Les plaques sont analysées à 450 nm à l'aide d'un spectrofluorimètre (VICTOR, PerkinElmer, Connecticut, USA). La quantité de cytokines est exprimée en ratio intra/extracellulaire +/- SEM.

### **2.2.7 Test de la production d'anions superoxydes :**

Suite à l'incubation de 6 heures en présence ou non des bisphénols, les neutrophiles sont dilués ( $1 \times 10^6$  cellules/mL/puit) dans du HBSS 1X contenant 62,5  $\mu$ M de cytochrome-C (Cytochrome-C from equine heart, Millipore Sigma, Oakville, ON, Canada). Une solution de 5  $\mu$ M GM-CSF (VWR Life Science, Seradigm, Mississauga, ON, Canada) est ajoutée au milieu et incubée 25 min à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Suite à cette incubation, du fMLP ( $10^{-7}$ M) est ajouté et l'incubation se poursuit pour 5 min à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Les surnageants sont gardés sur glace jusqu'à la lecture à 550 nm au spectrophotomètre MAGELLAN (Tecan Life Sciences, Männedorf, Suisse). Le pourcentage de la quantité d'anions superoxydes O<sub>2</sub><sup>-</sup> produite est exprimé en pourcentage +/- SEM comparé au témoin (100%).

### **2.2.8 Analyse statistique :**

Un test ANOVA (Test de Dunnett) a été effectué à l'aide du logiciel Prism pour déterminer les différences significatives. Les résultats sont considérés significativement différent si la valeur-p (p-value) est inférieure à 0,05 (\*), 0,01 (\*\*) ou 0,001 (\*\*\*).

## CHAPITRE 3 : RESULTATS

- 1) Une incubation aux bisphénols affecte-t-elle le métabolisme bioénergétique des neutrophiles ?

Dans un premier temps, nous avons voulu déterminer l'effet immédiat d'une exposition aux bisphénols sur le métabolisme bioénergétique des neutrophiles. Les résultats ont été ramenés à 100% avant la première injection afin de pouvoir comparer les expériences entre elles (**Figure 19A, panneau supérieur**). Nous constatons par la suite une augmentation de l'acidification extracellulaire, un témoin indirect de la glycolyse, suite à l'injection de glucose (10 mM), démontrant que nos cellules sont viables et métaboliquement actives. L'ajout du BPA (à  $10^{-7}$  M à titre d'exemple), du BPS (également à  $10^{-7}$  M) ou du véhicule (DMSO) lors de la seconde injection n'induit aucun changement du niveau de glycolyse mesuré dans un laps de temps de 90 minutes. La glycolyse ne diffère pas selon nos conditions de stimulation et diminue légèrement avec le temps, démontrant l'utilisation du glucose du milieu extracellulaire par les neutrophiles. L'injection du peptide bactérien chimiotactique fMLP ( $10^{-7}$  M) induit quant à lui une augmentation immédiate et prononcée de la glycolyse et ce, en présence ou en absence de BPA et BPS. Cette glycolyse induite par le fMLP atteint son apogée (environ 400%) dès les premières minutes suivants l'injection et diminue par la suite, bien que la glycolyse induite demeure plus élevée (environ 200%) que la glycolyse basale. Il n'y a toujours aucune différence significative dans la glycolyse induite par le fMLP en présence ou en absence de BPA et BPS. L'injection en excès de l'inhibiteur compétitif du glucose, le 2-DG (50 mM), mène à une diminution progressive de l'acidification extracellulaire, vers le niveau basal, démontrant que les mesures antérieures d'acidification extracellulaire étaient dues à la glycolyse. Ici encore, il n'y a aucune différence substantielle en présence ou en absence de bisphénols.

En comparant le pourcentage de la valeur maximale de glycolyse induite par le fMLP des différentes concentrations de bisphénols utilisées, nous n'observons aucune différence statistique peu importe les concentrations (allant de  $10^{-12}$  M à  $10^{-5}$  M) et les molécules

utilisées (BPA, BPS ou leurs métabolites glucuronidés BPA-G ou BPS-G) (**Figure 19A, panneau inférieur**).

**Nous pouvons donc conclure qu'une exposition immédiate des neutrophiles aux BPA, BPS et leurs métabolites glucuronidés n'entraîne aucune différence dans la glycolyse basale ni la glycolyse induite par le fMLP aux concentrations testées.**

Dans l'examen du métabolisme bioénergétique suivant l'exposition prolongée (6h) aux bisphénols (**Figure 19B, panneau supérieur**), les résultats ont été ramenés à 100% avant la première injection afin de pouvoir comparer les expériences entre elles. L'ajout de fMLP permet une augmentation nette et prononcée de la glycolyse avec une valeur maximale dès le premier taux d'acidification extracellulaire mesuré. Nous observons une différence dans la valeur maximale de glycolyse induite par le fMLP pour les conditions en présence de bisphénols. Dans l'exemple présenté, une exposition de 6 heures au BPA ( $10^{-8}$  M) et au BPS ( $10^{-8}$  M) atténue la réponse glycolytique induite par le fMLP par rapport au témoin (stimulation des cellules avec du DMSO). Cette diminution se maintient dans le temps. L'ajout du 2-DG diminue ensuite rapidement la glycolyse pour un retour au niveau basal.

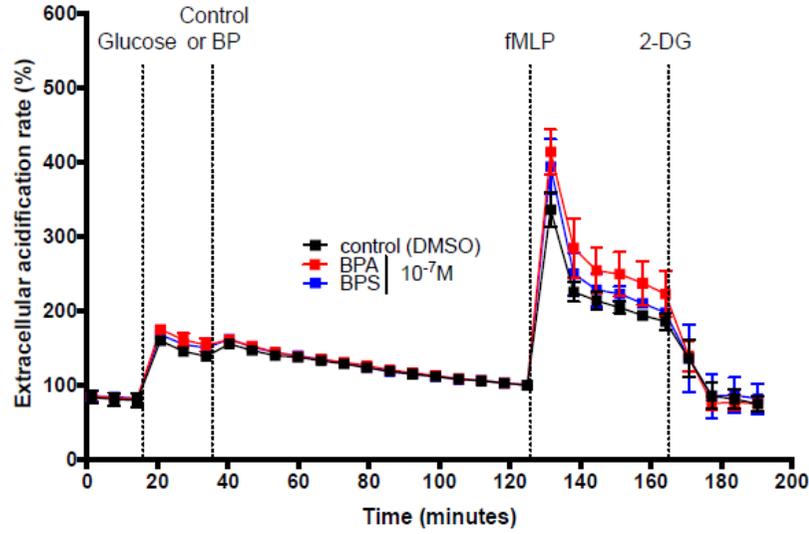
En comparant uniquement le pourcentage de la valeur maximale de glycolyse induite par le fMLP par rapport au témoin (100%) avec les différentes concentrations de bisphénols utilisées (de  $10^{-12}$  M à  $10^{-5}$  M), nous observons un profil de diminution similaire selon les molécules de bisphénol. En effet, une incubation avec de fortes ( $10^{-5}$  M) ou de très faibles concentrations ( $10^{-12}$  M à  $10^{-9}$  M) de bisphénols n'entraîne aucune différence statistique par rapport au témoin alors qu'une incubation avec des concentrations de bisphénols allant de  $10^{-8}$  M à  $10^{-6}$  M entraîne une diminution significative pouvant aller jusqu'à 25% (pour la concentration  $10^{-8}$  M) pour le BPA, BPS et les métabolites glucuronidés (**Figure 19B, panneau inférieur**).

**Nous pouvons conclure qu'une exposition prolongée des neutrophiles aux bisphénols ne module pas la glycolyse de base des neutrophiles, mais entraîne une**

**diminution dans la glycolyse induite par le fMLP à des concentrations variant de  $10^{-8}$  M à  $10^{-6}$  M.**

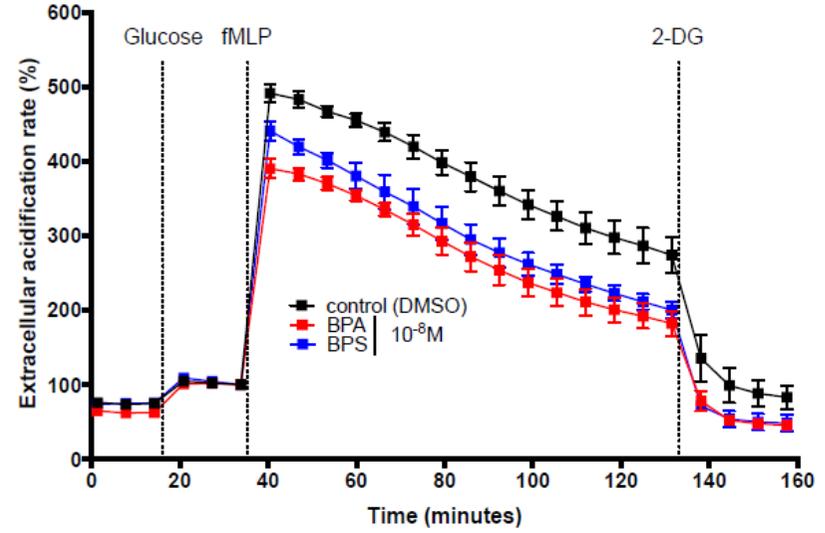
A

Immediate exposure

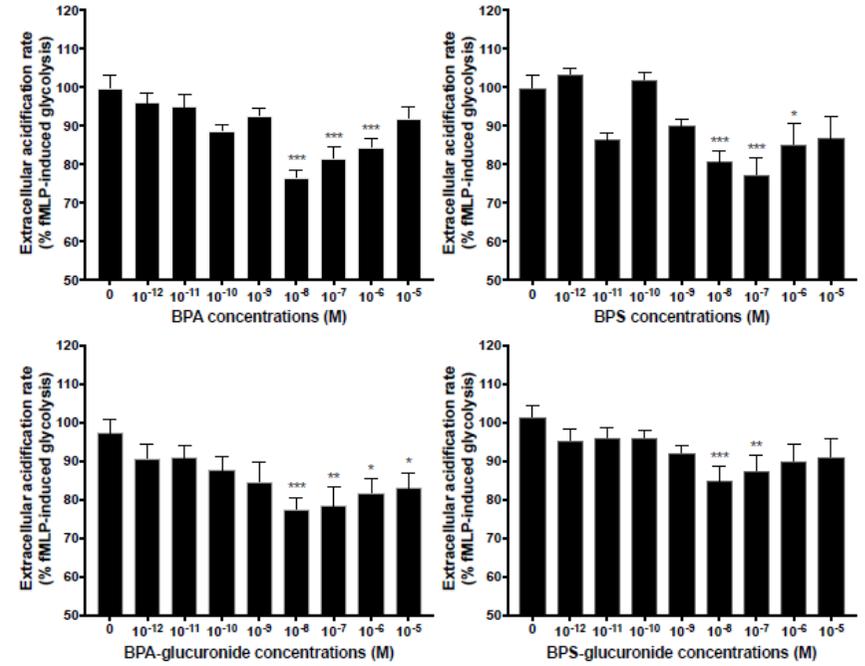
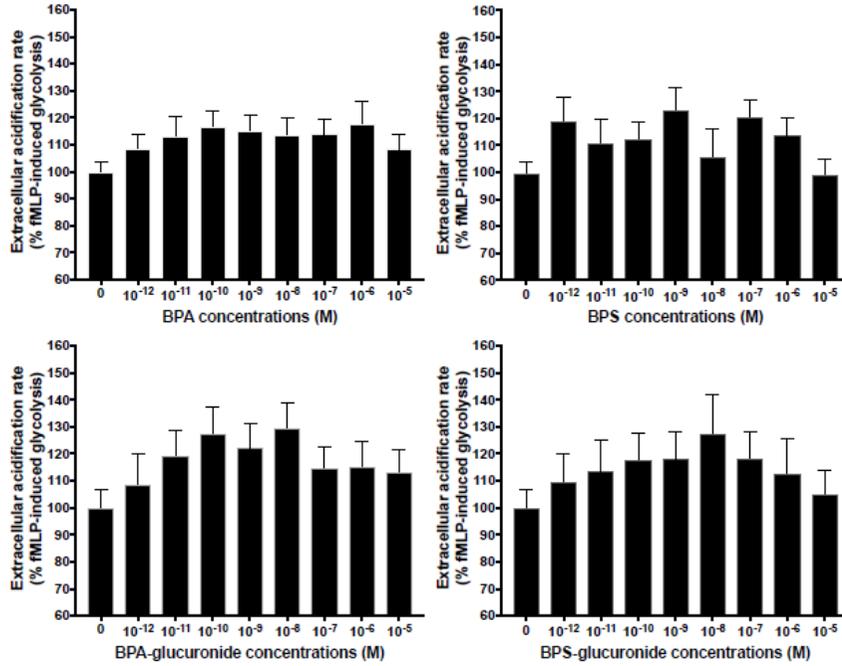


B

Prolonged exposure



57



**Figure 19 : Une exposition prolongée au BPA, BPS et leurs métabolites glucuronidés réduit la glycolyse induite par le fMLP dans les neutrophiles humains.**

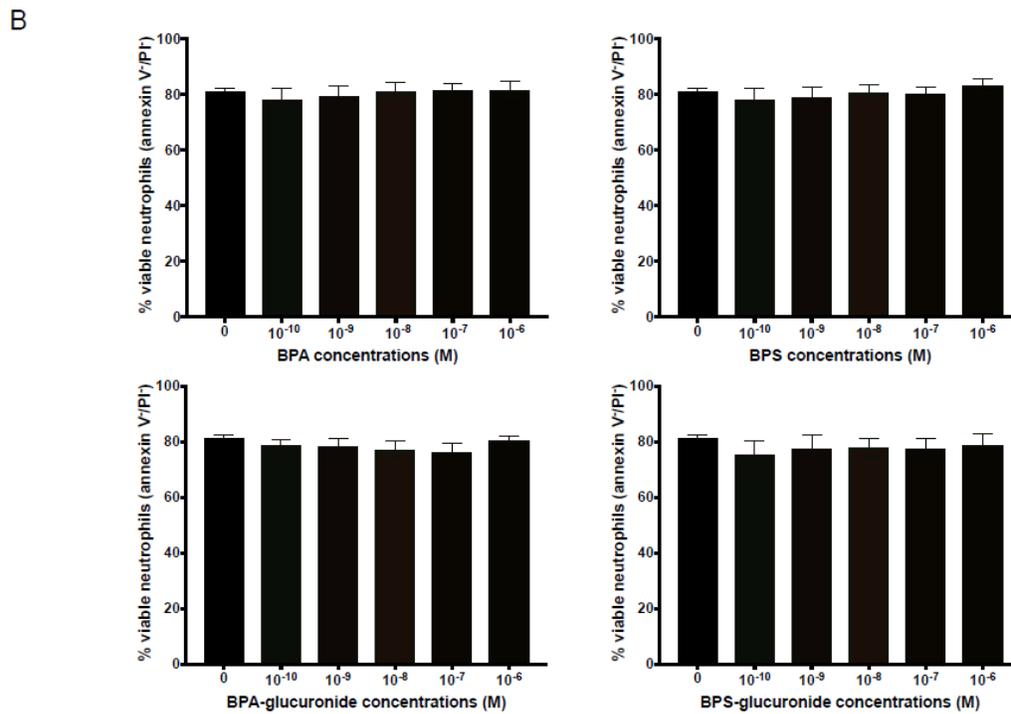
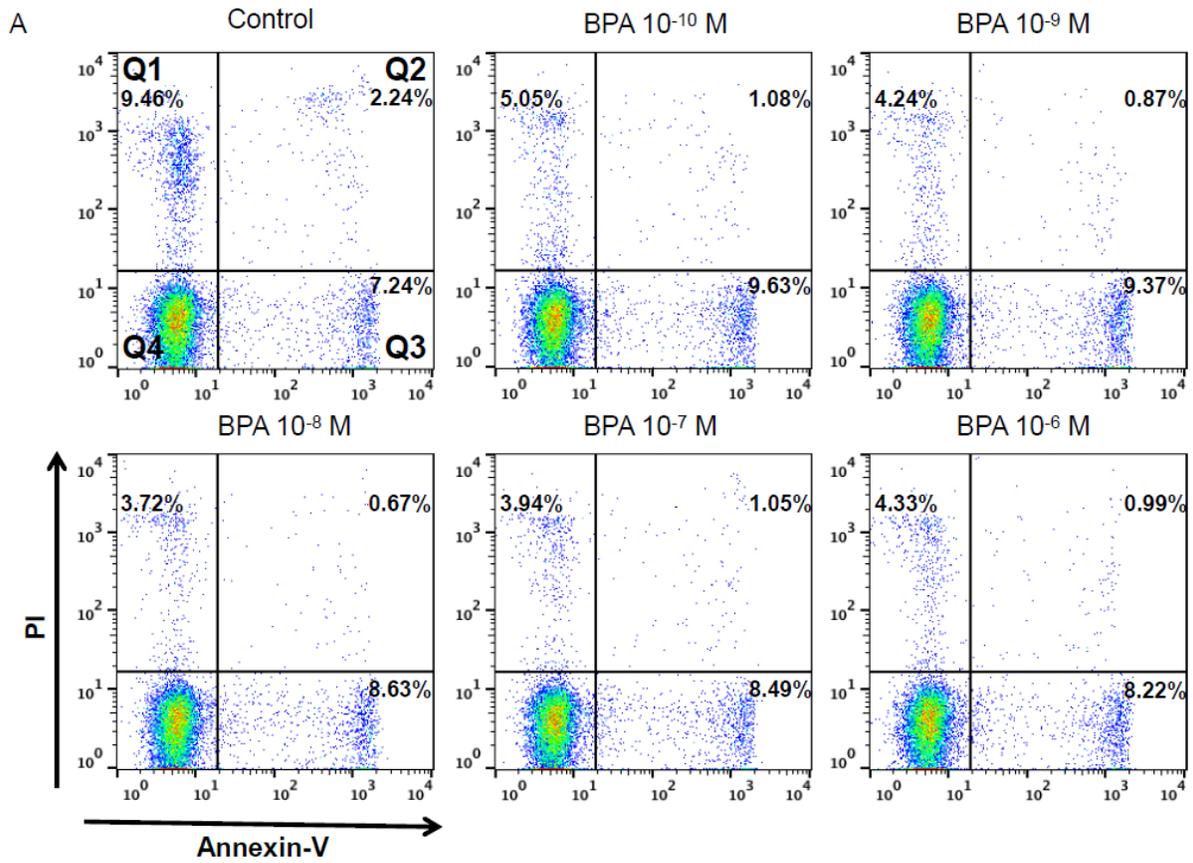
(A) Le taux d'acidification extracellulaire (exprimé en %) a été déterminé dans des neutrophiles de donneurs sains avec un analyseur de flux extracellulaire en suivant une séquence d'injections de glucose (10 mM), de bisphénols ou leur témoin (DMSO), le peptide chimiotactique fMLP ( $10^{-7}$  M) et le 2-deoxyglucose (2-DG – 50 mM), un inhibiteur compétitif du glucose. Une expérience représentative est montrée dans le panneau supérieur ; seule la concentration  $10^{-7}$  M pour le bisphénol A (BPA) et le bisphénol S (BPS) est illustrée pour simplicité. La moyenne des valeurs obtenues pour l'ECAR pour la première lecture après l'injection de fMLP est montrée dans le panneau inférieur pour différentes concentrations de BPA, BPS, BPA mono- $\beta$ -D-glucuronide (BPA-G) et BPS-O- $\beta$ -D-glucuronide (BPS-G) (n=4 ; moyenne +/- SEM). (B) Le taux d'acidification extracellulaire (exprimé en %) est déterminé avec un analyseur de flux extracellulaire dans des neutrophiles de donneurs sains exposés 6 heures aux bisphénols ou leur témoin (DMSO) en suivant une séquence d'injections de glucose (10 mM), le peptide chimiotactique fMLP ( $10^{-7}$  M) et le 2-DG (50 mM). Une expérience représentative est montrée dans le panneau supérieur ; seule la concentration  $10^{-8}$  M pour le BPA et le BPS est illustrée pour simplicité. La moyenne des valeurs obtenues pour l'ECAR pour la première lecture après l'injection de fMLP est montrée dans le panneau inférieur pour différentes concentrations de BPA, BPS, BPA-G et BPS-G (n=4 ; moyenne +/- SEM). \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 par ANOVA (Test de Dunnett).

2) La baisse de métabolisme dans une exposition prolongée aux bisphénols est-elle due à une diminution de la viabilité des neutrophiles ?

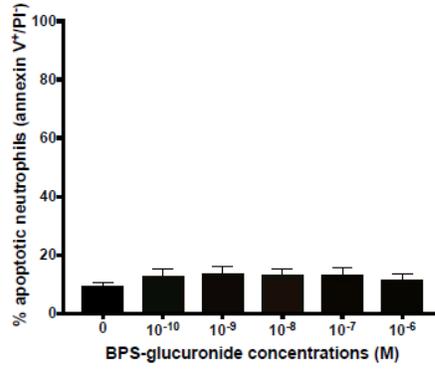
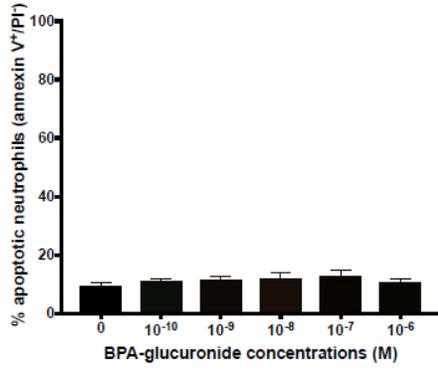
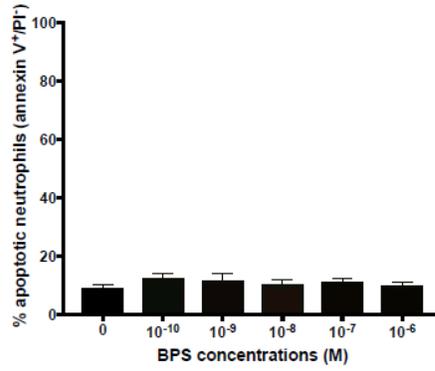
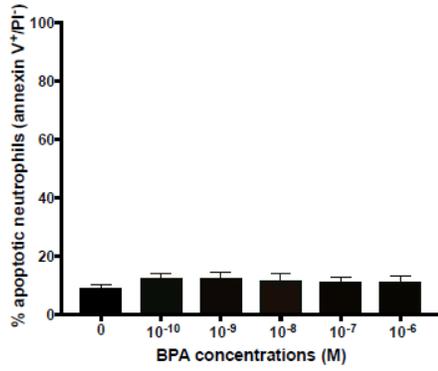
La viabilité cellulaire a été évaluée par cytométrie en flux à l'aide d'annexine-V, une protéine liant la phosphatidylsérine exprimée à la surface des cellules en apoptose, et d'iodure de propidium, un agent intercalant fluorescent permettant de distinguer les cellules en nécrose (138). La **figure 20A** montre une représentation en graphique à points (dot plot) de l'intensité de fluorescence de l'annexine et de l'iodure de propidium suite à l'incubation des neutrophiles en absence (témoin négatif) ou en présence de BPA (concentrations allant de  $10^{-10}$  M à  $10^{-6}$  M) pour une durée de 6 heures, suivi d'une incubation en présence de fMLP ( $10^{-7}$ M) pour une durée supplémentaire de deux heures, comme ce fût le cas dans les expériences

de métabolisme. Il est possible d'observer qu'environ 80% des neutrophiles sont négatifs pour les marqueurs d'annexine-V et d'iodure de propidium, démontrant que le BPA n'induit pas de mortalité chez les neutrophiles. Une minorité de cellules sont en apoptose primaire (annexin-V<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>), en apoptose secondaire (annexin-V<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>) ou en nécrose (annexin-V<sup>-</sup>/PI<sup>+</sup>) et ce, autant en absence qu'en présence de BPA. Nous pouvons d'ailleurs observer qu'aucune des différentes concentrations de BPA testées n'affectent significativement le profil des populations cellulaires. De plus, ni le BPS et ni les métabolites glucuronidés du BPA (BPA-G) et du BPS (BPS-G) n'affectent significativement la viabilité (**Figure 20B**), l'apoptose primaire (**Figure 20C**), l'apoptose secondaire (**Figure 20D**) et la nécrose (**Figure 20E**) des neutrophiles.

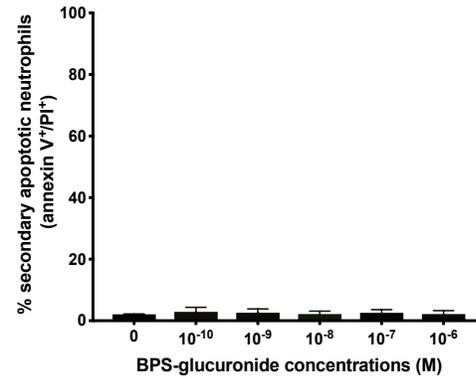
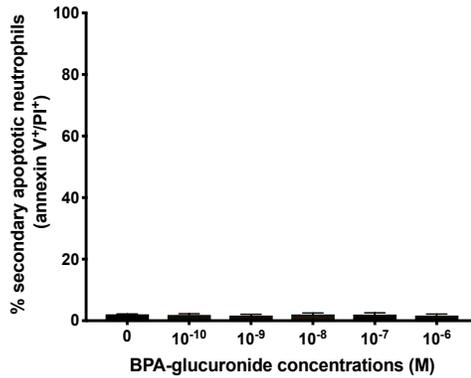
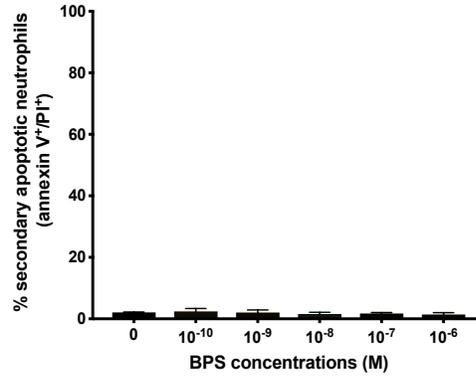
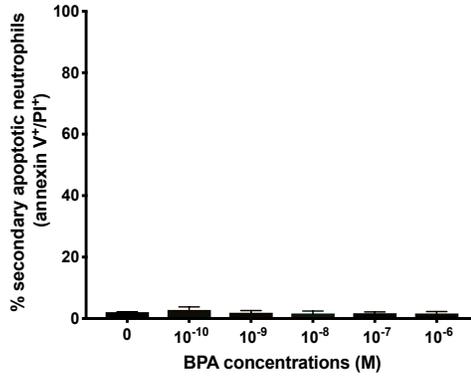
**Nous concluons qu'une exposition prolongée aux bisphénols n'affecte pas la viabilité des neutrophiles humains activés par le fMLP aux concentrations testées et que la baisse de métabolisme n'est donc pas liée à une mort cellulaire.**



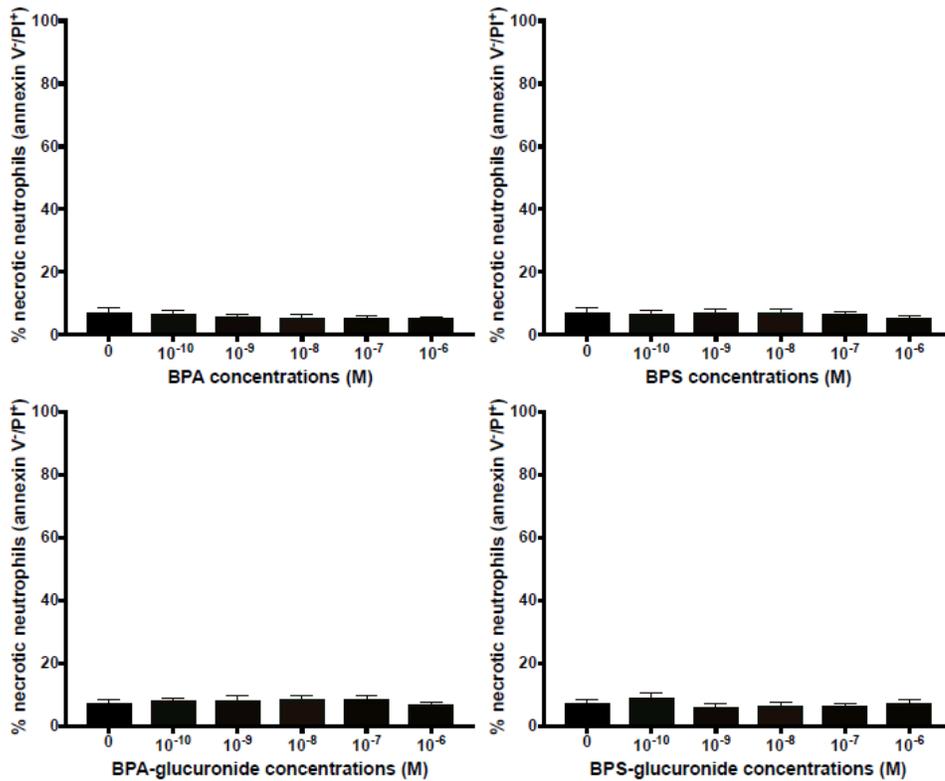
C



D



E



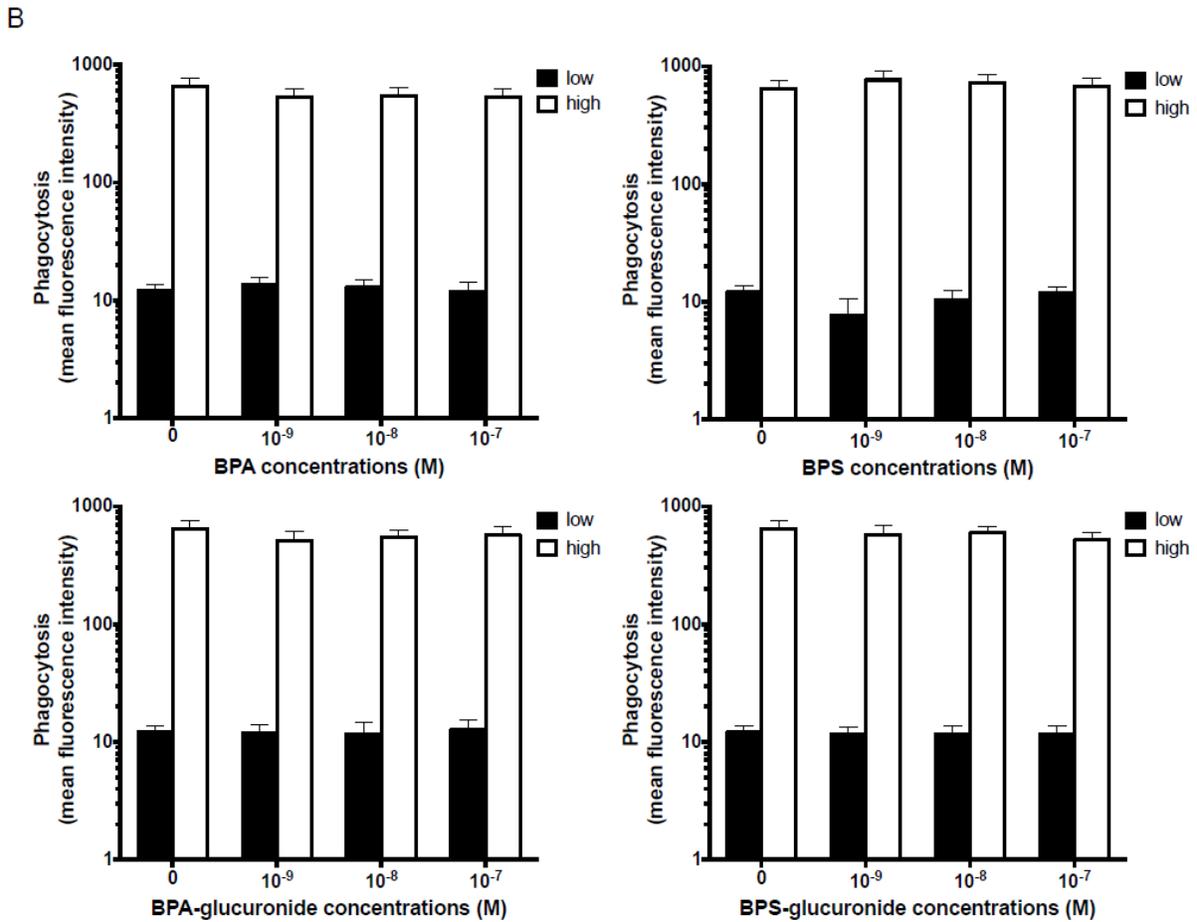
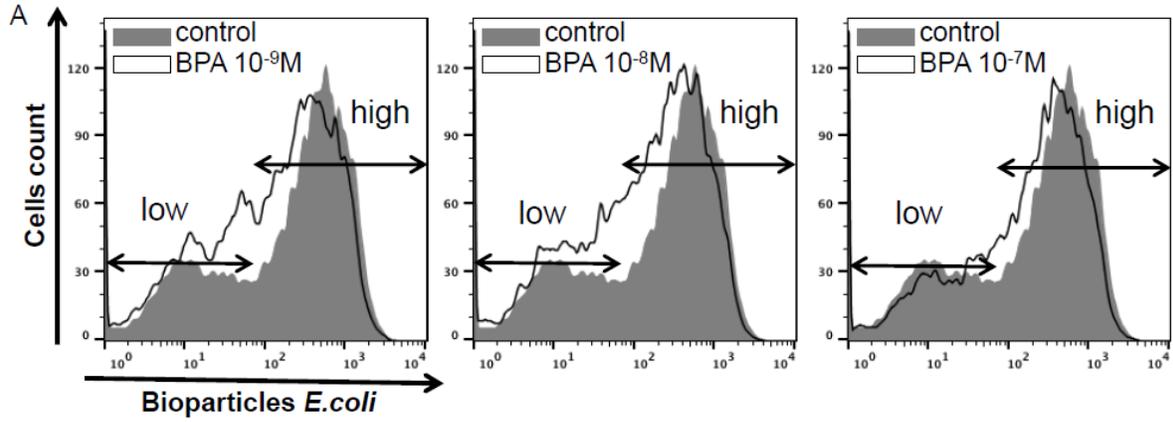
**Figure 20 : Une exposition prolongée au BPA, BPS et leurs métabolites glucuronidés n'affecte pas la viabilité des neutrophiles humains.**

(A) L'apoptose a été évaluée par cytométrie en flux en utilisant de l'annexine-V et de l'iodure de propidium (PI) après 6 heures d'exposition au BPA, BPS, BPA-glucuronide, BPS-glucuronide et leur témoin (DMSO) et suivi d'une incubation de 2 heures avec du fMLP ( $10^{-7}$  M). Il y a 4 quadrants ; Q1 : cellules en nécrose, Q2 : cellules en apoptose secondaire, Q3 : cellules en apoptose, Q4 : cellules viables. (B) Les résultats sont exprimés en pourcentage de neutrophiles viables annexine-V/PI<sup>-</sup> (n=3 ; moyenne +/- SEM). (C) Les résultats sont exprimés en pourcentage de neutrophiles en apoptose primaire annexine-V<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup> (n=3 ; moyenne +/- SEM). (D) Les résultats sont exprimés en pourcentage de neutrophiles en apoptose secondaire annexine-V<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup> (n=3 ; moyenne +/- SEM). (E) Les résultats sont exprimés en pourcentage de neutrophiles en nécrose annexine-V<sup>-</sup>/PI<sup>+</sup> (n=3 ; moyenne +/- SEM). \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 par ANOVA (Test de Dunnett).

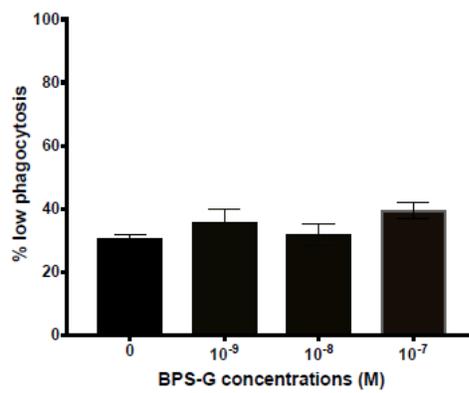
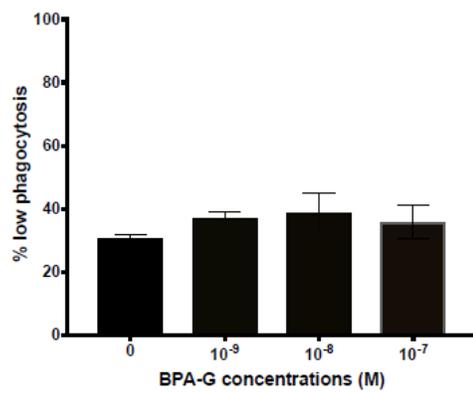
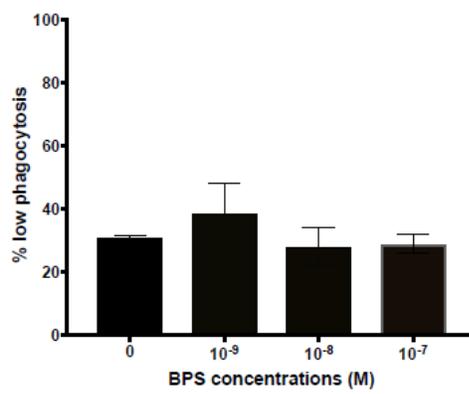
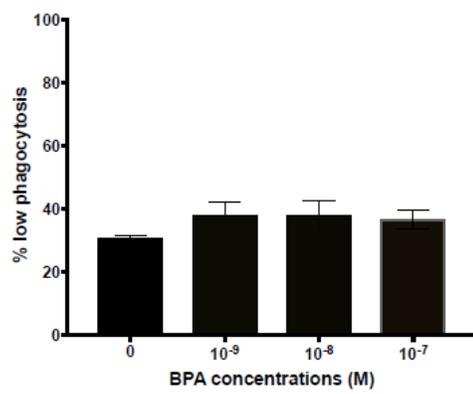
3) Une incubation prolongée aux bisphénols affecte-t-elle la fonction de phagocytose des neutrophiles ?

La phagocytose a été évaluée par cytométrie en flux en utilisant des bioparticules d'*E. coli* fluorescentes où l'intensité de fluorescence mesurée est proportionnelle au nombre de bioparticules ingérées par les neutrophiles. Nous avons déterminé les effets sur la phagocytose de trois concentrations de bisphénols ( $10^{-9}$  M à  $10^{-7}$  M) qui altèrent le métabolisme glycolytique induit par le fMLP chez les neutrophiles. La **figure 21A** montre des histogrammes représentatifs de la phagocytose en absence (témoin négatif) ou en présence de BPA ( $10^{-9}$  M à  $10^{-7}$  M). L'incubation des neutrophiles avec le BPA aux trois concentrations testées influence très peu leur profil de phagocytose ; en ce sens, les populations (low et high) sont similaires en absence et en présence de BPA. Nous avons par la suite déterminé l'intensité moyenne de fluorescence de chacune des populations en absence ou en présence de BPA, BPS et leurs métabolites glucuronidés (**Figure 21B**). Les résultats sont exprimés également en pourcentage de phagocytose faible (low) (**Figure 21C**) et en pourcentage de phagocytose élevée (high) (**Figure 21D**). Ni le BPA, BPS et leurs métabolites glucuronidés à des concentrations allant de  $10^{-9}$  M à  $10^{-7}$  M n'induisent de différences significatives sur l'intensité moyenne de fluorescence des neutrophiles ayant peu phagocytés (low) ou ayant fortement phagocytés (high).

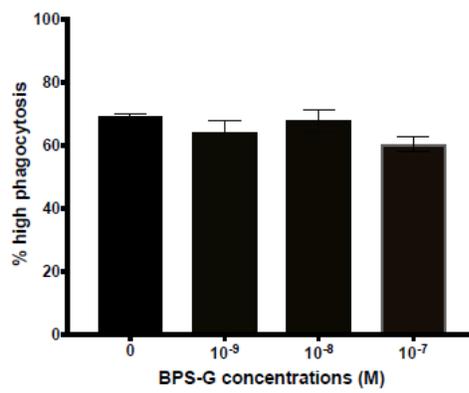
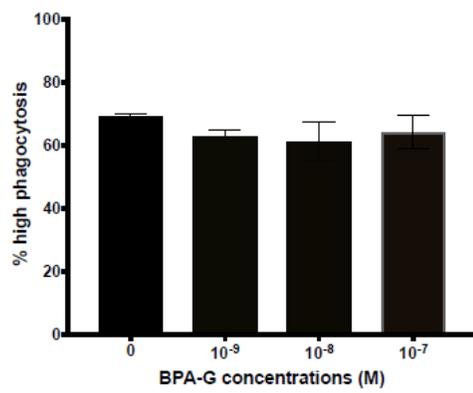
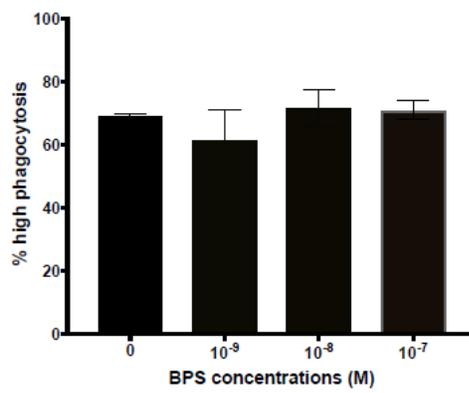
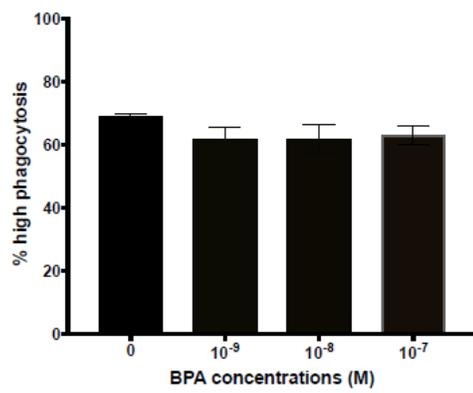
**Nous pouvons conclure qu'une exposition prolongée aux bisphénols n'influence pas la phagocytose des neutrophiles activés aux concentrations testées.**



C



D



## Figure 21 : Une exposition prolongée au BPA, BPS et leurs métabolites glucuronidés n'affecte pas la phagocytose des neutrophiles humains.

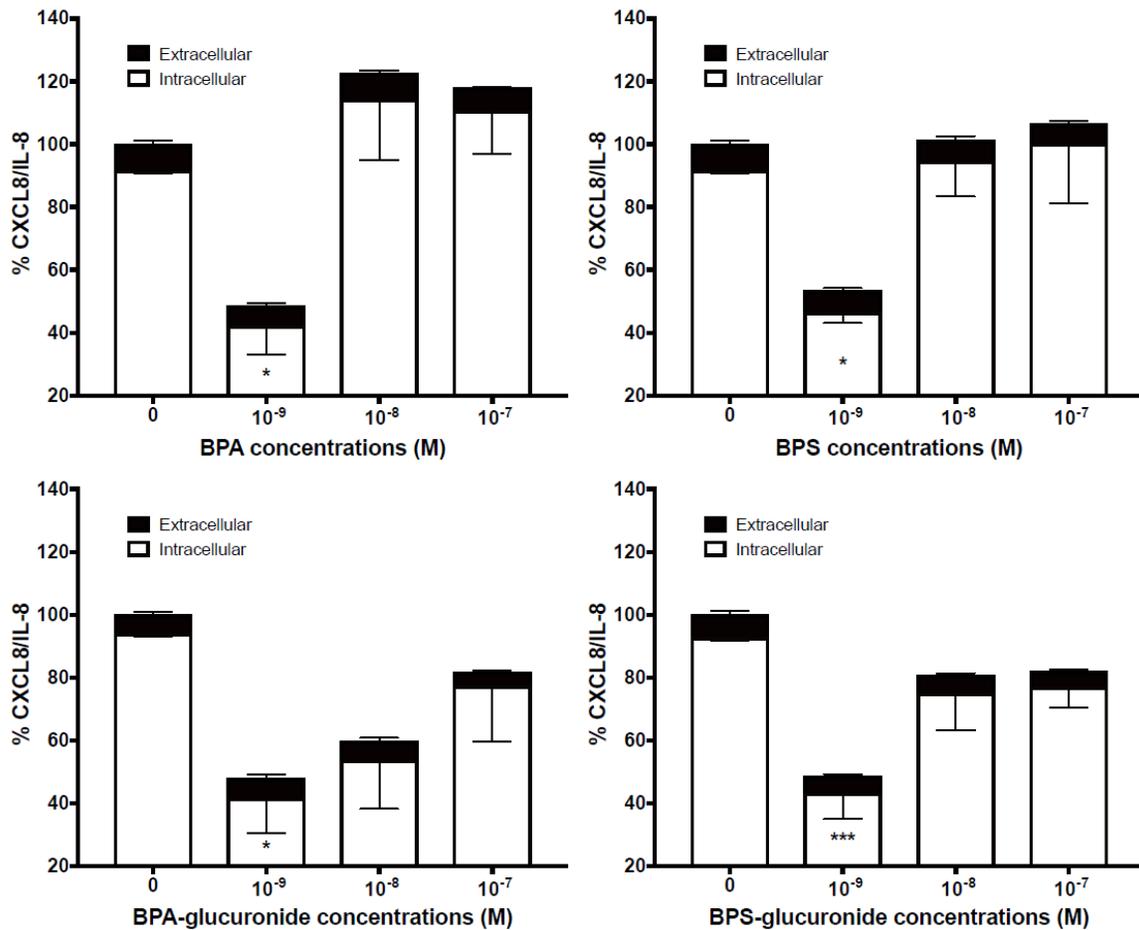
(A) Deux populations de cellules phagocytant peu (low) ou fortement (high) ont été déterminées par cytométrie en flux en utilisant des bioparticules *E.coli*-FITC après 6 heures d'exposition au BPA et son témoin négatif (DMSO) et suivi d'une incubation de 2 heures au fMLP ( $10^{-7}$  M). (B) Les résultats pour le BPA, BPS, BPA-glucuronide et BPS-glucuronide sont exprimés en moyenne d'intensité de fluorescence (unités arbitraires) (n=4 ; moyenne +/- SEM). (C) Le pourcentage de neutrophiles ayant peu phagocytés (low) (n=4 ; moyenne +/- SEM). (D) Le pourcentage de neutrophiles ayant beaucoup phagocytés (high) (n=4 ; moyenne +/- SEM). \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 par ANOVA (Test de Dunnett).

### 4) Une exposition prolongée aux bisphénols affecte-t-elle la production de la chimiokine CXCL8/IL-8 par les neutrophiles ?

Nous avons par la suite déterminé si la diminution du métabolisme par les bisphénols pourrait affecter la production intracellulaire et extracellulaire (e.g. sécrétée par les neutrophiles) de la chimiokine CXCL8/IL-8 induite par le fMLP. Comme précédemment, nous avons examiné les effets de trois concentrations de bisphénols ( $10^{-9}$  M à  $10^{-7}$  M). Comme les concentrations déterminées par ELISA variaient considérablement entre les donneurs, nous avons établi la somme de la portion intracellulaire et de la portion extracellulaire à 100% pour les cellules témoins. Suite à une incubation de 6 heures, la majorité du CXCL8/IL-8 mesuré (~90 %) est intracellulaire alors qu'une petite partie (~10 %) est sécrétée dans la portion extracellulaire pour les cellules incubées en absence de BPA, BPS ou de leurs métabolites glucuronidés (**Figure 22**). La présence de bisphénols n'entraîne aucune différence statistique sur le pourcentage de CXCL8/IL-8 extracellulaire ; par contre une exposition de 6 heures aux bisphénols à une concentration de  $10^{-9}$  M diminue d'environ 50% le pourcentage de CXCL8/IL-8 intracellulaire. Tout comme pour l'effet observé au niveau du métabolisme glycolytique (**Figure 19**), aucune différence statistique n'est observée avec des concentrations plus faibles ou plus élevées. Une diminution du pourcentage de CXCL8/IL-8 intracellulaire est par contre observée à

des concentrations plus élevées ( $10^{-8}$  et  $10^{-9}$  M), mais ces observations ne sont pas statistiquement différentes.

**Nous concluons qu'une exposition prolongée aux bisphénols pour une concentration de  $10^{-9}$  M diminue le pourcentage de CXCL8/IL-8 intracellulaire dans les neutrophiles humains activés.**



**Figure 22 : Une exposition prolongée au BPA, BPS et plus particulièrement aux métabolites glucuronidés réduit le pourcentage intracellulaire de CXCL8/IL-8 dans les neutrophiles humains.**

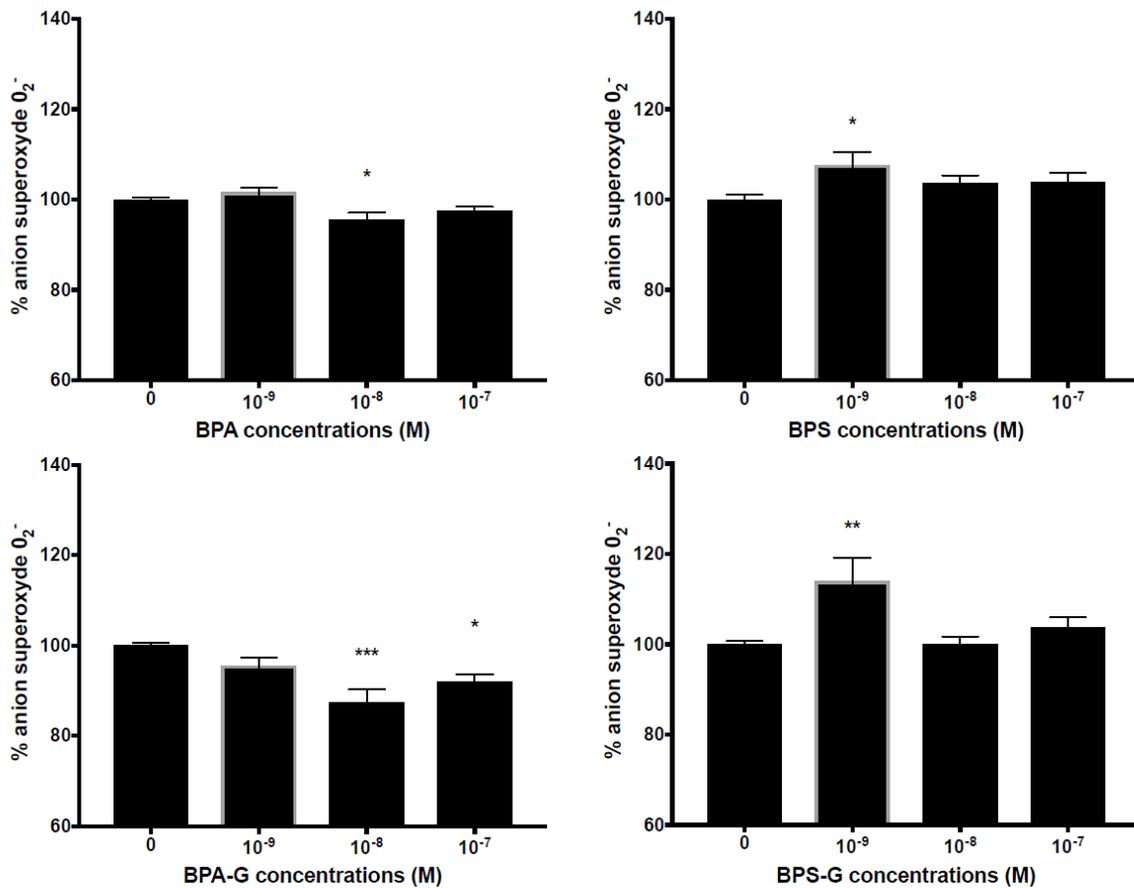
Les concentrations de CXCL8/IL-8 intracellulaire et extracellulaire (exprimées en % comparées au témoin) ont été déterminées par spectrophotométrie en utilisant un test ELISA après 6 heures d'incubation au BPA, BPS, BPA-glucuronide, BPS-glucuronide et leur témoin négatif (DMSO) et suivi par une incubation de 2 heures au fMLP ( $10^{-7}$  M) (n=3 ; moyenne +/- SEM). Les concentrations témoins de CXCL8/IL-8 varient de 4306 à 6276 pg/mL versus 4366 à 6276 pg/mL pour une concentration de BPA  $10^{-9}$  M, de 1690 à 3517 pg/mL pour une concentration de BPS  $10^{-9}$  M, de 254 à 6692 pg/mL pour une concentration de BPA-G  $10^{-9}$  M et de 809 à 7212 pg/mL pour une concentration de BPS-G  $10^{-9}$  M. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 par ANOVA (Test de Dunnett).

5) La production d'anions superoxydes des neutrophiles activés est-elle influencée par une exposition prolongée aux bisphénols ?

En dernier lieu, nous avons voulu déterminer si la diminution du métabolisme par les bisphénols pourrait affecter la production de ROS, plus spécifiquement la production d'anions superoxydes induites par le fMLP. Encore une fois, comme la quantité d'anions superoxydes déterminée par la réduction du ferrocyclochrome c variait considérablement entre les donneurs, allant de 9,68 à 17,84 nmol de superoxyde  $O_2^-$  par  $1 \times 10^6$  de cellules incubées 30 minutes en absence de bisphénols, nous avons établi la quantité d'anions superoxydes à 100% pour les cellules témoins. Comme le démontre la **figure 23**, les bisphénols, à des concentrations variant de  $10^{-9}$  M à  $10^{-7}$  M modulent peu la production d'anions superoxydes et les effets diffèrent selon la classe de bisphénol testée. À une concentration de  $10^{-8}$  M, le BPA et son métabolite glucuronidé diminue légèrement la production de ROS, une diminution également observée pour le BPA-G à  $10^{-9}$  M. En opposition, le BPS et son métabolite glucuronidé augmente légèrement la production de ROS à une concentration de  $10^{-9}$  M. Tout comme pour l'effet observé au niveau du métabolisme

glycolytique (**Figure 19**), aucune différence statistique n'est observée avec des concentrations plus faibles ou plus élevées.

**Nous concluons que pour des concentrations détectables dans le sang humain, une exposition prolongée aux bisphénols perturbe la production de ROS des neutrophiles activés**



**Figure 23 : Une exposition prolongée au BPA, BPS et leurs métabolites glucuronidés perturbe la production d'anions superoxyde par les neutrophiles activés par le fMLP.**

La production d'anions superoxyde  $O_2^-$  a été évaluée par spectrophotométrie en utilisant un test au cytochrome-C après 6 heures d'exposition au BPA, BPS, BPA-glucuronide, BPS-glucuronide et leur témoin négatif (DMSO) et suivi d'une incubation de 2 heures au fMLP ( $10^{-7}$  M) (n=3 ; moyenne +/- SEM). Les résultats sont exprimés en pourcentage comparés au témoin (100%). Les concentrations de superoxyde  $O_2^-$  par  $1 \times 10^6$  de cellules varient de 11,08 à 17,84 nmol (témoin BPA) versus 11,15 à 14,04 nmol (BPA  $10^{-8}$  M) ; de 10,56 à 11,77 nmol (témoin BPS) versus 10,59 à 17,13 nmol (BPS  $10^{-9}$  M) ; de 13,64 à 15,57 nmol (témoin BPA-G) versus 10,59 à 17,13 nmol (témoin BPA-G  $10^{-8}$  M) ; de 9,68 à 12,81 nmol (témoin BPS-G) versus 11,31 à 14,28 nmol (BPS-G  $10^{-9}$  M). \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 par ANOVA (Test de Dunnett).

## CHAPITRE 4 : DISCUSSION

Les résultats présentés dans ce mémoire montrent quelques conséquences d'une exposition prolongée avec des concentrations de bisphénols retrouvées dans le sang sur les neutrophiles humains. Nous avons observé une réduction du métabolisme glycolytique induit par le fMLP (environ 25%) sans affecter la viabilité cellulaire, l'apoptose et la nécrose. Comme les fonctions cellulaires dépendent de l'énergie principalement produite par la glycolyse chez les neutrophiles, nous avons examiné des réponses dirigées contre les bactéries : phagocytose, production de CXCL8/IL-8 et production de ROS. Nous n'avons observé aucun effet sur la phagocytose alors que la production de CXCL8/IL-8 est diminuée par la présence des bisphénols. Des résultats contraires (diminution pour le BPA, augmentation pour le BPS) ont été observés quant à la production de ROS. Ceci démontre que certaines fonctions des neutrophiles sont bel et bien affectées lors d'une réduction métabolique induite par les bisphénols.

Le CXCL8/IL-8 est une chimiokine particulièrement puissante produite par les neutrophiles quand ils sont activés pour recruter d'autres cellules afin d'engendrer une réponse inflammatoire (139). Dans notre étude, nous avons observé que la concentration de CXCL8/IL-8 intracellulaire est légèrement atténuée dans les neutrophiles activés lors d'une incubation à de faibles doses de bisphénols. Ces résultats sont en accord avec ceux d'une étude effectuée sur le poisson-zèbre démontrant qu'une exposition avec du BPA entraîne une diminution de l'expression de CXCL8/IL-8 et donc une diminution dans le recrutement cellulaire (140). Une diminution de CXCL8/IL-8 est associée avec une diminution du recrutement des neutrophiles sur les foyers d'infection (141). Par ailleurs, une baisse du nombre de neutrophiles augmente la susceptibilité aux infections (142). Ceci suggère donc qu'une exposition chronique au BPA ou à son substitut, le BPS, peut jouer un rôle dans l'augmentation de la susceptibilité aux infections en diminuant l'expression de CXCL8/IL-8 et du recrutement de neutrophiles.

Plusieurs études ont montré que le BPA était associé avec une augmentation de la production de ROS, ce qui n'est pas le cas dans notre étude (143,144). Dans notre étude, ce serait plutôt le BPS qui induirait une augmentation de la production de ROS. Seule une étude montre que le BPA entraîne une diminution de la production de ROS en réponse au LPS bactérien (137). Le fait d'utiliser une seule molécule, ici le fMLP, est une limite de notre étude et il serait important de vérifier si nous obtenons des résultats similaires en réponse à d'autres agents bactériens, comme le LPS. Néanmoins, cette perturbation de production de ROS peut très bien être mise en relation avec différentes études décrivant un lien entre bisphénols et auto-immunité ou alors des incapacités à répondre de façon optimale à des pathogènes (145,146).

Nos expériences sur la production de ROS en réponse à une incubation aux bisphénols témoignent également d'une certaine variabilité de réponses envers le BPA ou le BPS. Jusque-là, les réponses étaient très similaires entre ces deux molécules mais, dans cette expérience, il semblerait que le BPA et son métabolite induisent une diminution de la production de ROS en réponse au fMLP contrairement au BPS et son métabolite qui, eux, provoquent une augmentation de ROS. Bien que surprenant, il est connu dans la littérature que les effets du BPA et de ses substituts peuvent être opposés (147). Ces différences pourraient être liées au fait qu'on ne connaît toujours pas exactement les voies empruntées par les bisphénols au contact des cellules. Il se pourrait que le BPA et ses différents analogues empruntent des voies de signalisation différentes, permettant ainsi d'expliquer leurs différentes actions. Il a été montré que la production de ROS induite par le BPA est presque totalement inhibée par l'ajout de PHTPP, un antagoniste des récepteurs ER $\beta$  (148). Il serait donc intéressant de vérifier si la production de ROS induite par le BPS, telle que nous l'avons observé, peut également être inhibée par l'ajout de PHTPP. Les neutrophiles expriment non seulement les récepteurs des œstrogènes ER $\alpha$  et ER $\beta$ , mais également des récepteurs GPER qui seraient impliqués dans ses fonctions cellulaires (149). Ce nouveau récepteur découvert dans les années 2000 pourrait être la porte d'entrée des perturbateurs endocriniens.

Il serait donc intéressant de pouvoir travailler avec des agonistes et des antagonistes de ces récepteurs pour voir si nous pouvons retrouver les effets observés ou au contraire les atténuer. Nous pourrions donc répéter nos expériences en présence de G-1 (agoniste des récepteurs GPER), G-36 (antagoniste des récepteurs GPER), PHTPP (antagoniste des récepteurs ER $\beta$ ) et du méthylpipéridinipyrazole (antagoniste des récepteurs ER $\alpha$  (150,151).

Les bisphénols comme d'autres perturbateurs endocriniens ou des pesticides possèdent des doses-réponse originales ; en effet, ils présentent une courbe de réponse en U inversé ou en « cloche ». C'est-à-dire qu'à de très faibles comme à de fortes concentrations, nous n'observons aucun effet mais une petite étendue de concentrations faibles provoque une réponse biologique. Cette sorte de courbe non monotone est retrouvée dans notre étude du métabolisme glycolytique. Ces courbes dites non monotones ont révolutionnées ce que l'on pensait de la toxicologie. Une explication possible vient du fait que les perturbateurs endocriniens se fixent sur une large gamme de récepteurs. En effet, des études ont montré qu'à faibles doses, les molécules peuvent se fixer sur les récepteurs où elles expriment le plus d'affinité mais à fortes doses, les molécules se trouvent obligées de se fixer également sur des récepteurs différents pour combler la place (152,153). Ces courbes non monotones sont retrouvées avec de nombreuses hormones comme les œstrogènes ou encore les perturbateurs endocriniens comme les bisphénols (154–156).

Les études sur les liens entre le métabolisme et le BPA mettent en évidence que le BPA module autant le métabolisme glycolytique que lipidique (157,158). De ces études, ressort le fait que le BPA dérégule le métabolisme des mammifères, mais aussi celui des poissons ce qui témoigne du large spectre d'action des bisphénols (159). Nous avons axé nos recherches sur la glycolyse, puisque les neutrophiles font très peu de respiration mitochondriale (160). Depuis que Otto Warburg a découvert dans les années 30 le métabolisme des cellules cancéreuses, nous savons maintenant que la glycolyse fournit la grande majorité de l'énergie et des ressources nécessaires aux cellules cancéreuses pour se développer rapidement.

De par son impact sur le métabolisme glycolytique, nous pouvons comprendre pourquoi la majorité des études se concentrent sur le rôle du BPA dans le cancer (161,162). Aucune étude à l'heure actuelle démontre que le BPA diminue la glycolyse en condition infectieuse, mais certaines études démontrent la diminution de certains transporteurs du glucose (GLUT-2, GLUT-4 et GLUT-8) ou encore la diminution de certaines enzymes de la glycolyse (glucokinase) (163,164). Comme les neutrophiles humains expriment GLUT-1, GLUT-3, GLUT-4 et la glucokinase (165,166), il serait donc important de vérifier si la diminution du métabolisme glycolytique induit par le fMLP par les bisphénols est due à la diminution de ces transporteurs du glucose ou encore de la glucokinase.

En soi, notre étude est innovante, de par l'étude des effets du substitut du BPA, le BPS, mais surtout de l'étude des effets des métabolites glucuronidés du BPA et du BPS. En effet, très peu d'articles scientifiques mentionnent le nom des métabolites des molécules-mères comme le BPA ou le BPS. Ils sont souvent considérés comme inactifs et donc dénués d'intérêt scientifique (167), même si ces métabolites glucuronidés se retrouvent dans le sang et les tissus (168). Notre étude montre que non seulement le BPA et le BPS mais bien également les métabolites ont une activité biologique sur les cellules de l'immunité, plus particulièrement les neutrophiles. En effet, comme pour les molécules-mères, nous avons observé que le BPA-G et le BPS-G modulent le métabolisme glycolytique, la production de CXCL8/IL-8 et la production de ROS. Bien que nous ayons limité notre étude à l'utilisation du BPA, BPS et de leur métabolites glucuronidés, il serait pertinent d'examiner les effets des autres substituts du BPA, comme le BPE et BPF, ainsi que leurs métabolites glucuronidés ou sulfatés. Malgré tout, il ne faut pas négliger le fait que même si nous utilisons des concentrations précises de bisphénols dans nos expériences, plus de 95% des canadiens sont déjà exposés avec du bisphénol avant même l'ajout de nos composés (169). Il est donc possible que cette pré-exposition aux bisphénols affecte le métabolisme et les fonctions des neutrophiles. Il serait donc pertinent de comparer les résultats que nous avons obtenus avec les

neutrophiles humains avec des neutrophiles provenant de souris, rats ou encore des macaques qui n'ont jamais été exposés aux bisphénols.

Depuis le scandale du BPA dans les biberons en 2008, de nombreuses compagnies cherchent à trouver des substituts. Les industriels cherchent des molécules semblables au BPA pouvant apporter les mêmes qualités physico-chimiques au plastique. Hormis le BPS ou encore le BPF, la compagnie Eastman Chemical a commercialisé une nouvelle marque de polyester, le Tritan qui ne contient ni BPA ni BPS et autres membres de la famille des bisphénols. Il contient pourtant trois molécules, le téréphtalate de diméthyle (DMT), le 2,2,4,4-Tétraméthyl-1,3-cyclobutanediol (CBDO) et le 1,4-cyclohexanediméthanol (170). Comme le di-éthylhexyl phtalate ou le dibutyl phtalate sont connus pour moduler les fonctions cellulaires, notamment en induisant une production accrue de ROS (143,171), il serait intéressant d'examiner les effets de ces nouvelles molécules, et éventuellement toutes autres molécules utilisées pour remplacer les bisphénols, dans notre système pour voir si nous obtenons des réponses similaires aux bisphénols. Il reste donc encore beaucoup de travail (et surtout de recherches) avant d'obtenir du plastique « propre » et sécuritaire n'ayant pas d'effets sur les systèmes endocriniens, reproducteurs et immunitaires.

# CONCLUSION

Nous avons montré qu'une exposition prolongée au BPA et son substitut majoritaire le BPS entraîne une diminution de l'ordre de 25% de la glycolyse induite par le fMLP à de très faibles concentrations détectables actuellement dans le sang humain. Les métabolites des bisphénols, réputés inactifs, possèdent une activité biologique semblable aux molécules-mères de bisphénols. Les bisphénols et leurs métabolites glucuronidés n'affectent pas la viabilité cellulaire et la phagocytose aux concentrations utilisées. Par contre, une diminution du pourcentage CXCL8/IL-8 intracellulaire est observée pour les bisphénols et leurs métabolites. D'une manière intéressante, le BPA et son métabolite induisent une réduction de la production de superoxyde  $O_2^-$  alors que le BPS et son métabolite ont une réponse inverse et induisent une augmentation de la production de superoxyde  $O_2^-$ . La diminution du métabolisme induit par les agents bactériens, entraînant une dérégulation de certaines fonctions cellulaires des neutrophiles, pourrait ainsi contribuer au développement de pathologies ou augmenter la susceptibilité aux infections.

Nous espérons que nos travaux avec les recherches de plus en plus actives d'autres chercheurs pourront mener à de nouvelles réglementations concernant l'utilisation des bisphénols dans nos sociétés.

# BIBLIOGRAPHIE

1. Fox CJ, Hammerman PS, Thompson CB. Fuel feeds function: energy metabolism and the T-cell response. *Nat Rev Immunol*. 2005 Nov;5(11):844–52.
2. Caldwell MD, Jonsson HT, Othersen HB. Essential fatty acid deficiency in an infant receiving prolonged parenteral alimentation. *J Pediatr*. 1972 Nov;81(5):894–8.
3. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. The Metabolism of Glucose 6-Phosphate by the Pentose Phosphate Pathway Is Coordinated with Glycolysis. *Biochem 5th Ed* [Internet]. 2002 [cited 2018 Aug 5]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22590/>
4. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Glycolysis Is an Energy-Conversion Pathway in Many Organisms. *Biochem 5th Ed* [Internet]. 2002 [cited 2018 Jul 24]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22593/>
5. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. Oxidation of Glucose and Fatty Acids to CO<sub>2</sub>. *Mol Cell Biol 4th Ed* [Internet]. 2000 [cited 2018 Jul 24]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21624/>
6. Guo X, Li H, Xu H, Woo S-L, Dong H, Lu F, et al. Glycolysis in the control of blood glucose homeostasis. *Acta Pharm Sin B*. 2012 Aug 1;2:358–367.
7. Barrientos A, Fontanesi F, Díaz F. Evaluation of the Mitochondrial Respiratory Chain and Oxidative Phosphorylation System using Polarography and Spectrophotometric Enzyme Assays. *Curr Protoc Hum Genet* Editor Board Jonathan Haines Al. 2009 Oct;CHAPTER:Unit19.3.
8. Xu T, Pagadala V, Mueller DM. Understanding structure, function, and mutations in the mitochondrial ATP synthase. *Microb Cell*. 2(4):105–25.
9. Munnich A. Casting an eye on the Krebs cycle. *Nat Genet*. 2008 Oct;40(10):1148–9.
10. Barron JT, Gu L, Parrillo JE. Malate-aspartate shuttle, cytoplasmic NADH redox potential, and energetics in vascular smooth muscle. *J Mol Cell Cardiol*. 1998 Aug;30(8):1571–9.
11. Hatefi Y. The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annu Rev Biochem*. 1985;54:1015–69.
12. Sousa JS, D’Imprima E, Vonck J. Mitochondrial Respiratory Chain Complexes. *Subcell Biochem*. 2018;87:167–227.

13. Gorman GS, Chinnery PF, DiMauro S, Hirano M, Koga Y, McFarland R, et al. Mitochondrial diseases. *Nat Rev Dis Primer*. 2016 20;2:16080.
14. Mason EF, Rathmell JC. Cell metabolism: an essential link between cell growth and apoptosis. *Biochim Biophys Acta*. 2011 Apr;1813(4):645–54.
15. Stienstra R, Netea-Maier RT, Riksen NP, Joosten LAB, Netea MG. Specific and Complex Reprogramming of Cellular Metabolism in Myeloid Cells during Innate Immune Responses. *Cell Metab*. 2017 Jul 5;26(1):142–56.
16. Tang C-Y, Mauro C. Similarities in the Metabolic Reprogramming of Immune System and Endothelium. *Front Immunol* [Internet]. 2017 Jul 21 [cited 2018 Jul 24];8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5519526/>
17. Yoon BR, Oh Y-J, Kang SW, Lee EB, Lee W-W. Role of SLC7A5 in Metabolic Reprogramming of Human Monocyte/Macrophage Immune Responses. *Front Immunol* [Internet]. 2018 Jan 25 [cited 2018 Jul 24];9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5788887/>
18. Courtney R, Ngo DC, Malik N, Ververis K, Tortorella SM, Karagiannis TC. Cancer metabolism and the Warburg effect: the role of HIF-1 and PI3K. *Mol Biol Rep*. 2015 Apr;42(4):841–51.
19. Tannahill GM, Curtis AM, Adamik J, Palsson-McDermott EM, McGettrick AF, Goel G, et al. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 $\beta$  through HIF-1 $\alpha$ . *Nature*. 2013 Apr 11;496(7444):238–42.
20. van der Windt GJW, Pearce EL. Metabolic switching and fuel choice during T-cell differentiation and memory development. *Immunol Rev*. 2012 Sep;249(1):27–42.
21. Rubin BS, Soto AM. Bisphenol A: Perinatal exposure and body weight. *Mol Cell Endocrinol*. 2009 May 25;304(1–2):55.
22. Reed CE, Fenton SE. Exposure to Diethylstilbestrol during Sensitive Life Stages: A legacy of heritable health effects. *Birth Defects Res Part C Embryo Today Rev* [Internet]. 2013 Jun [cited 2018 Apr 14];99(2). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3817964/>
23. Beausoleil C, Emond C, Cravedi JP, Antignac JP, Applanat M, Appenzeller BMR, et al. Regulatory identification of BPA as an endocrine disruptor: Context and methodology. *Mol Cell Endocrinol*. 2018 Feb 6;

24. Vogel SA. The Politics of Plastics: The Making and Unmaking of Bisphenol A “Safety.” *Am J Public Health*. 2009 Nov;99(Suppl 3):S559–66.
25. Xu J, Huang G, Guo TL. Developmental Bisphenol A Exposure Modulates Immune-Related Diseases. *Toxics* [Internet]. 2016 Sep 26 [cited 2018 Apr 14];4(4). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5606650/>
26. Vandenberg LN, Hauser R, Marcus M, Olea N, Welshons WV. Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reprod Toxicol Elmsford N*. 2007 Sep;24(2):139–77.
27. Lim DS, Kwack SJ, Kim K-B, Kim HS, Lee BM. Potential risk of bisphenol A migration from polycarbonate containers after heating, boiling, and microwaving. *J Toxicol Environ Health A*. 2009;72(21–22):1285–91.
28. Ndaw S, Remy A, Jargot D, Robert A. Occupational exposure of cashiers to Bisphenol A via thermal paper: urinary biomonitoring study. *Int Arch Occup Environ Health*. 2016;89:935–46.
29. Bushnik T, Haines D, Levallois P, Levesque J, Van Oostdam J, Viau C. Lead and bisphenol A concentrations in the Canadian population. *Health Rep*. 2010 Sep;21(3):7–18.
30. Cobellis L, Colacurci N, Trabucco E, Carpentiero C, Grumetto L. Measurement of bisphenol A and bisphenol B levels in human blood sera from healthy and endometriotic women. *Biomed Chromatogr BMC*. 2009 Nov;23(11):1186–90.
31. Arbuckle TE, Marro L, Davis K, Fisher M, Ayotte P, Bélanger P, et al. Exposure to Free and Conjugated Forms of Bisphenol A and Triclosan among Pregnant Women in the MIREC Cohort. *Environ Health Perspect*. 2015 Apr;123(4):277–84.
32. Rubin BS. Bisphenol A: an endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2011 Oct;127(1–2):27–34.
33. Nilsson S, Mäkelä S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, et al. Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev*. 2001 Oct;81(4):1535–65.
34. Straub RH, Bijlsma JWJ, Masi A, Cutolo M. Role of neuroendocrine and neuroimmune mechanisms in chronic inflammatory rheumatic diseases--the 10-year update. *Semin Arthritis Rheum*. 2013 Dec;43(3):392–404.
35. Environmental estrogen bisphenol A and autoimmunity - I Jochmanová, Z Lazúrová, M Rudnay, I Bačová, M Mareková, I Lazúrová, 2015. *Lupus* [Internet]. [cited 2018 Mar 11]; Available from:

<http://journals.sagepub.com/acces.bibl.ulaval.ca/doi/abs/10.1177/0961203314560205>

36. Arase S, Ishii K, Igarashi K, Aisaki K, Yoshio Y, Matsushima A, et al. Endocrine disrupter bisphenol A increases in situ estrogen production in the mouse urogenital sinus. *Biol Reprod.* 2011 Apr;84(4):734–42.
37. Acconcia F, Pallottini V, Marino M. Molecular Mechanisms of Action of BPA. Dose-Response [Internet]. 2015 Oct 7 [cited 2018 Mar 11];13(4). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4679188/>
38. Wozniak AL, Bulayeva NN, Watson CS. Xenoestrogens at Picomolar to Nanomolar Concentrations Trigger Membrane Estrogen Receptor- $\alpha$ -Mediated  $Ca^{2+}$  Fluxes and Prolactin Release in GH3/B6 Pituitary Tumor Cells. *Environ Health Perspect.* 2005 Apr;113(4):431–9.
39. Marino M, Pellegrini M, La Rosa P, Acconcia F. Susceptibility of estrogen receptor rapid responses to xenoestrogens: Physiological outcomes. *Steroids.* 2012 Aug;77(10):910–7.
40. Wang Z, Liu H, Liu S. Low-Dose Bisphenol A Exposure: A Seemingly Instigating Carcinogenic Effect on Breast Cancer. *Adv Sci Weinh Baden-Wurt Ger.* 2017 Feb;4(2):1600248.
41. Teng C, Goodwin B, Shockley K, Xia M, Huang R, Norris J, et al. Bisphenol A affects androgen receptor function via multiple mechanisms. *Chem Biol Interact.* 2013 May 25;203(3):556–64.
42. Wang C, Zhang J, Li Q, Zhang T, Deng Z, Lian J, et al. Low concentration of BPA induces mice spermatocytes apoptosis via GPR30. *Oncotarget.* 2017 Apr 7;8(30):49005–15.
43. Dong S, Terasaka S, Kiyama R. Bisphenol A induces a rapid activation of Erk1/2 through GPR30 in human breast cancer cells. *Environ Pollut Barking Essex 1987.* 2011 Jan;159(1):212–8.
44. Sheng Z-G, Huang W, Liu Y-X, Zhu B-Z. Bisphenol A at a low concentration boosts mouse spermatogonial cell proliferation by inducing the G protein-coupled receptor 30 expression. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013 Feb 15;267(1):88–94.
45. Thomas P, Dong J. Binding and activation of the seven-transmembrane estrogen receptor GPR30 by environmental estrogens: a potential novel mechanism of endocrine disruption. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2006 Dec;102(1–5):175–9.

46. Liang H, Xu W, Chen J, Shi H, Zhu J, Liu X, et al. The Association between Exposure to Environmental Bisphenol A and Gonadotropic Hormone Levels among Men. PLoS ONE [Internet]. 2017 Jan 13 [cited 2018 Mar 12];12(1). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5234835/>
47. Sánchez P, Castro B, Torres JM, Olmo A, del Moral RG, Ortega E. Bisphenol A Modifies the Regulation Exerted by Testosterone on 5 $\alpha$ -Reductase Isozymes in Ventral Prostate of Adult Rats. BioMed Res Int [Internet]. 2013 [cited 2018 Mar 12];2013. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3741927/>
48. Moriyama K, Tagami T, Akamizu T, Usui T, Saijo M, Kanamoto N, et al. Thyroid hormone action is disrupted by bisphenol A as an antagonist. J Clin Endocrinol Metab. 2002 Nov;87(11):5185–90.
49. Hoepner LA, Whyatt RM, Just AC, Calafat AM, Perera FP, Rundle AG. Urinary Concentrations of Bisphenol A in an Urban Minority Birth Cohort in New York City, Prenatal Through Age 7 Years. Environ Res. 2013 Apr;122:38–44.
50. Nagel SC, vom Saal FS, Thayer KA, Dhar MG, Boechler M, Welshons WV. Relative binding affinity-serum modified access (RBA-SMA) assay predicts the relative in vivo bioactivity of the xenoestrogens bisphenol A and octylphenol. Environ Health Perspect. 1997 Jan;105(1):70–6.
51. Kinch CD, Ibhazehiebo K, Jeong J-H, Habibi HR, Kurrasch DM. Low-dose exposure to bisphenol A and replacement bisphenol S induces precocious hypothalamic neurogenesis in embryonic zebrafish. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015 Feb 3;112(5):1475–80.
52. Vandenberg LN. Non-monotonic dose responses in studies of endocrine disrupting chemicals: bisphenol a as a case study. Dose-Response Publ Int Hormesis Soc. 2014 May;12(2):259–76.
53. Chen W-Y, Shen Y-P, Chen S-C. Assessing bisphenol A (BPA) exposure risk from long-term dietary intakes in Taiwan. Sci Total Environ. 2016 Feb 1;543(Pt A):140–6.
54. vom Saal FS, Akingbemi BT, Belcher SM, Birnbaum LS, Crain DA, Eriksen M, et al. Chapel Hill bisphenol A expert panel consensus statement: Integration of mechanisms, effects in animals and potential to impact human health at current levels of exposure. Reprod Toxicol Elmsford N. 2007;24(2):131–8.
55. Niu Y, Zhang J, Duan H, Wu Y, Shao B. Bisphenol A and nonylphenol in foodstuffs:

Chinese dietary exposure from the 2007 total diet study and infant health risk from formulas. *Food Chem.* 2015 Jan 15;167:320–5.

56. Erler C, Novak J. Bisphenol a exposure: human risk and health policy. *J Pediatr Nurs.* 2010 Oct;25(5):400–7.

57. Jing P, Zhang X, Wu Z, Bao L, Xu Y, Liang C, et al. Electrochemical sensing of bisphenol A by graphene-1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate modified electrode. *Talanta.* 2015 Aug 15;141:41–6.

58. Fenichel P, Chevalier N, Brucker-Davis F. Bisphenol A: an endocrine and metabolic disruptor. *Ann Endocrinol.* 2013 Jul;74(3):211–20.

59. Myers JP, vom Saal FS, Akingbemi BT, Arizono K, Belcher S, Colborn T, et al. Why Public Health Agencies Cannot Depend on Good Laboratory Practices as a Criterion for Selecting Data: The Case of Bisphenol A. *Environ Health Perspect.* 2009 Mar;117(3):309–15.

60. Repossì A, Farabegoli F, Gazzotti T, Zironi E, Pagliuca G. Bisphenol A in Edible Part of Seafood. *Ital J Food Saf [Internet].* 2016 May 2 [cited 2018 Mar 15];5(2). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5076740/>

61. Hessel EVS, Ezendam J, van Broekhuizen FA, Hakkert B, DeWitt J, Granum B, et al. Assessment of recent developmental immunotoxicity studies with bisphenol A in the context of the 2015 EFSA t-TDI. *Reprod Toxicol Elmsford N.* 2016 Oct;65:448–56.

62. Shelnutt S, Kind J, Allaben W. Bisphenol A: Update on newly developed data and how they address NTP’s 2008 finding of “Some Concern.” *Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc.* 2013 Jul;57:284–95.

63. Eladak S, Grisin T, Moison D, Guerquin M-J, N’Tumba-Byn T, Pozzi-Gaudin S, et al. A new chapter in the bisphenol A story: bisphenol S and bisphenol F are not safe alternatives to this compound. *Fertil Steril.* 2015 Jan;103(1):11–21.

64. Kang J-H, Kondo F, Katayama Y. Human exposure to bisphenol A. *Toxicology.* 2006 Sep 21;226(2–3):79–89.

65. Biedermann S, Tschudin P, Grob K. Transfer of bisphenol A from thermal printer paper to the skin. *Anal Bioanal Chem.* 2010 Sep;398(1):571–6.

66. Pivnenko K, Pedersen GA, Eriksson E, Astrup TF. Bisphenol A and its structural analogues in household waste paper. *Waste Manag.* 2015 Oct;44:39–47.

67. Žalmanová T, Hošková K, Nevorál J, Prokešová Š, Zámostná K, Kott T, et al. Bisphenol S instead of bisphenol A: a story of reproductive disruption by regrettable substitution – a review. *Czech J Anim Sci.* 2016 Oct 24;61 (2016)(No. 10):433–49.
68. Viñas P, Campillo N, Martínez-Castillo N, Hernández-Córdoba M. Comparison of two derivatization-based methods for solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometric determination of bisphenol A, bisphenol S and biphenol migrated from food cans. *Anal Bioanal Chem.* 2010 May;397(1):115–25.
69. Héliès-Toussaint C, Peyre L, Costanzo C, Chagnon M-C, Rahmani R. Is bisphenol S a safe substitute for bisphenol A in terms of metabolic function? An in vitro study. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2014 Oct 15;280(2):224–35.
70. Rosenmai AK, Dybdahl M, Pedersen M, Alice van Vugt-Lussenburg BM, Wedeby EB, Taxvig C, et al. Are structural analogues to bisphenol a safe alternatives? *Toxicol Sci Off J Soc Toxicol.* 2014 May;139(1):35–47.
71. Street CM, Zhu Z, Finel M, Court MH. Bisphenol-A glucuronidation in human liver and breast: Identification of UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) and influence of genetic polymorphisms. *Xenobiotica Fate Foreign Compd Biol Syst.* 2017 Jan;47(1):1–10.
72. Boucher JG, Boudreau A, Ahmed S, Atlas E. In Vitro Effects of Bisphenol A  $\beta$ -D-Glucuronide (BPA-G) on Adipogenesis in Human and Murine Preadipocytes. *Environ Health Perspect.* 2015 Dec;123(12):1287–93.
73. Skledar DG, Schmidt J, Fic A, Klopčič I, Trontelj J, Dolenc MS, et al. Influence of metabolism on endocrine activities of bisphenol S. *Chemosphere.* 2016 Aug;157:152–9.
74. Konieczna A, Rutkowska A, Rachoń D. Health risk of exposure to Bisphenol A (BPA). *Rocz Panstw Zakl Hig.* 2015;66(1):5–11.
75. Mínguez-Alarcón L, Hauser R, Gaskins AJ. Effects of bisphenol A on male and couple reproductive health: A review. *Fertil Steril.* 2016 Sep 15;106(4):864–70.
76. Manfo FPT, Jubendradass R, Nantia EA, Moundipa PF, Mathur PP. Adverse effects of bisphenol A on male reproductive function. *Rev Environ Contam Toxicol.* 2014;228:57–82.
77. Huo X, Chen D, He Y, Zhu W, Zhou W, Zhang J. Bisphenol-A and Female Infertility: A Possible Role of Gene-Environment Interactions. *Int J Environ Res Public Health.* 2015 Sep;12(9):11101–16.

78. Soto AM, Vandenberg LN, Maffini MV, Sonnenschein C. Does Breast Cancer Start in the Womb? *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2008 Feb;102(2):125.
79. Tarapore P, Ying J, Ouyang B, Burke B, Bracken B, Ho S-M. Exposure to Bisphenol A Correlates with Early-Onset Prostate Cancer and Promotes Centrosome Amplification and Anchorage-Independent Growth In Vitro. *PLoS ONE* [Internet]. 2014 Mar 3 [cited 2018 Jul 26];9(3). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3940879/>
80. Liu Y, Mei C, Liu H, Wang H, Zeng G, Lin J, et al. Modulation of cytokine expression in human macrophages by endocrine-disrupting chemical Bisphenol-A. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 Sep 5;451(4):592–8.
81. Couleau N, Falla J, Beillerot A, Battaglia E, D’Innocenzo M, Plançon S, et al. Effects of Endocrine Disruptor Compounds, Alone or in Combination, on Human Macrophage-Like THP-1 Cell Response. *PloS One*. 2015;10(7):e0131428.
82. Rogers JA, Metz L, Yong VW. Review: Endocrine disrupting chemicals and immune responses: a focus on bisphenol-A and its potential mechanisms. *Mol Immunol*. 2013 Apr;53(4):421–30.
83. Rosales C, Demareux N, Lowell CA, Uribe-Querol E. Neutrophils: Their Role in Innate and Adaptive Immunity. *J Immunol Res* [Internet]. 2016 [cited 2018 Feb 19];2016. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4783580/>
84. Summers C, Rankin SM, Condliffe AM, Singh N, Peters AM, Chilvers ER. Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol*. 2010 Aug;31(8):318–24.
85. Murphy G, Reynolds JJ, Bretz U, Baggiolini M. Collagenase is a component of the specific granules of human neutrophil leucocytes. *Biochem J*. 1977 Jan 15;162(1):195–7.
86. Bao Y, Ledderose C, Seier T, Graf AF, Brix B, Chong E, et al. Mitochondria Regulate Neutrophil Activation by Generating ATP for Autocrine Purinergic Signaling. *J Biol Chem*. 2014 Sep 26;289(39):26794–803.
87. Zarbock A, Ley K. Mechanisms and Consequences of Neutrophil Interaction with the Endothelium. *Am J Pathol*. 2008 Jan;172(1):1–7.
88. Futosi K, Fodor S, Mócsai A. Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *Int Immunopharmacol*. 2013 Nov;17(3):638–50.
89. Kaplan MJ. Role of neutrophils in systemic autoimmune diseases. *Arthritis Res Ther*. 2013;15(5):219.

90. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Innate Immunity. *Mol Biol Cell* 4th Ed [Internet]. 2002 [cited 2018 Aug 5]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26846/>
91. Jang J-H, Shin HW, Lee JM, Lee H-W, Kim E-C, Park SH. An Overview of Pathogen Recognition Receptors for Innate Immunity in Dental Pulp. *Mediators Inflamm* [Internet]. 2015 [cited 2018 Feb 19];2015. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4630409/>
92. Kawai T, Akira S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int Immunol*. 2009 Apr;21(4):317–37.
93. Theoharides TC, Alysandratos K-D, Angelidou A, Delivanis D-A, Sismanopoulos N, Zhang B, et al. Mast cells and inflammation. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Jan;1822(1):21–33.
94. Zhao X, Liu L, Hegazy AM, Wang H, Li J, Zheng F, et al. Mannose receptor mediated phagocytosis of bacteria in macrophages of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) in a Ca(2+)-dependent manner. *Fish Shellfish Immunol*. 2015 Apr;43(2):357–63.
95. Iwanaszko M, Kimmel M. NF- $\kappa$ B and IRF pathways: cross-regulation on target genes promoter level. *BMC Genomics* [Internet]. 2015 Apr 17 [cited 2018 Feb 19];16(1). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4430024/>
96. Luheshi G, Rothwell N. Cytokines and fever. *Int Arch Allergy Immunol*. 1996 Apr;109(4):301–7.
97. Mayadas TN, Cullere X, Lowell CA. The Multifaceted Functions of Neutrophils. *Annu Rev Pathol*. 2014;9:181–218.
98. Bogatcheva NV, Sergeeva MG, Dudek SM, Verin AD. Arachidonic acid cascade in endothelial pathobiology. *Microvasc Res*. 2005 May;69(3):107–27.
99. Rackham A, Ford-Hutchinson AW. Inflammation and pain sensitivity: effects of leukotrienes D<sub>4</sub>, B<sub>4</sub> and prostaglandin E<sub>1</sub> in the rat paw. *Prostaglandins*. 1983 Feb;25(2):193–203.
100. Golias C, Charalabopoulos A, Stagikas D, Charalabopoulos K, Batistatou A. The kinin system - bradykinin: biological effects and clinical implications. Multiple role of the kinin system - bradykinin. *Hippokratia*. 2007;11(3):124–8.
101. Zarbock A, Ley K. Neutrophil adhesion and activation under flow. *Microcirc N Y N*

1994. 2009 Jan;16(1):31–42.
102. Lawrence MB, Springer TA. Neutrophils roll on E-selectin. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1993 Dec 1;151(11):6338–46.
103. Wright HL, Moots RJ, Edwards SW. The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2014 Oct;10(10):593–601.
104. Wagner JG, Roth RA. Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. *Pharmacol Rev*. 2000 Sep;52(3):349–74.
105. Filippi M-D. Mechanism of Diapedesis: Importance of the Transcellular Route. *Adv Immunol*. 2016;129:25–53.
106. van Kessel KPM, Bestebroer J, van Strijp JAG. Neutrophil-Mediated Phagocytosis of *Staphylococcus aureus*. *Front Immunol* [Internet]. 2014 Sep 26 [cited 2018 Mar 8];5. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4176147/>
107. Flannagan RS, Jaumouillé V, Grinstein S. The cell biology of phagocytosis. *Annu Rev Pathol*. 2012;7:61–98.
108. Allen LA, Aderem A. Mechanisms of phagocytosis. *Curr Opin Immunol*. 1996 Feb;8(1):36–40.
109. Boxer LA, Hedley-Whyte ET, Stossel TP. Neutrophil actin dysfunction and abnormal neutrophil behavior. *N Engl J Med*. 1974 21;291(21):1093–9.
110. Cohn ZA, Hirsch JG. THE INFLUENCE OF PHAGOCYTOSIS ON THE INTRACELLULAR DISTRIBUTION OF GRANULE-ASSOCIATED COMPONENTS OF POLYMORPHONUCLEAR LEUCOCYTES. *J Exp Med*. 1960 Nov 30;112(6):1015–22.
111. Delgado-Rizo V, Martínez-Guzmán MA, Iñiguez-Gutierrez L, García-Orozco A, Alvarado-Navarro A, Fafutis-Morris M. Neutrophil Extracellular Traps and Its Implications in Inflammation: An Overview. *Front Immunol*. 2017;8:81.
112. Altstaedt J, Kirchner H, Rink L. Cytokine production of neutrophils is limited to interleukin-8. *Immunology*. 1996 Dec;89(4):563–8.
113. Lee WL, Harrison RE, Grinstein S. Phagocytosis by neutrophils. *Microbes Infect*. 2003 Nov;5(14):1299–306.
114. Chanock SJ, el Benna J, Smith RM, Babior BM. The respiratory burst oxidase. *J Biol Chem*. 1994 Oct 7;269(40):24519–22.

115. Chen Y, Junger WG. Measurement of Oxidative Burst in Neutrophils. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2012;844:115–24.
116. Shah D, Mahajan N, Sah S, Nath SK, Paudyal B. Oxidative stress and its biomarkers in systemic lupus erythematosus. *J Biomed Sci*. 2014 Mar 17;21(1):23.
117. Tecchio C, Micheletti A, Cassatella MA. Neutrophil-derived cytokines: facts beyond expression. *Front Immunol*. 2014;5:508.
118. Clark RA. Activation of the neutrophil respiratory burst oxidase. *J Infect Dis*. 1999 Mar;179 Suppl 2:S309-317.
119. Opferman JT, Korsmeyer SJ. Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. *Nat Immunol*. 2003 May;4(5):410–5.
120. Spets H, Strömberg T, Georgii-Hemming P, Siljason J, Nilsson K, Jernberg-Wiklund H. Expression of the bcl-2 family of pro- and anti-apoptotic genes in multiple myeloma and normal plasma cells: regulation during interleukin-6(IL-6)-induced growth and survival. *Eur J Haematol*. 2002 Aug;69(2):76–89.
121. Chipuk JE, Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Droin NM, Newmeyer DD, Schuler M, et al. Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science*. 2004 Feb 13;303(5660):1010–4.
122. Chen C, Cui J, Lu H, Wang R, Zhang S, Shen P. Modeling of the Role of a Bax-Activation Switch in the Mitochondrial Apoptosis Decision. *Biophys J*. 2007 Jun 15;92(12):4304–15.
123. Bratton SB, Salvesen GS. Regulation of the Apaf-1–caspase-9 apoptosome. *J Cell Sci*. 2010 Oct 1;123(19):3209–14.
124. Polster BM, Fiskum G. Mitochondrial mechanisms of neural cell apoptosis. *J Neurochem*. 2004 Sep;90(6):1281–9.
125. Brentnall M, Rodriguez-Menocal L, De Guevara RL, Cepero E, Boise LH. Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. *BMC Cell Biol*. 2013 Jul 9;14:32.
126. Svandova EB, Vesela B, Lesot H, Poliard A, Matalova E. Expression of Fas, FasL, caspase-8 and other factors of the extrinsic apoptotic pathway during the onset of interdigital tissue elimination. *Histochem Cell Biol*. 2017 Apr;147(4):497–510.
127. Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM. FADD, a novel death domain-

containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell*. 1995 May 19;81(4):505–12.

128. Reed JC. Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol*. 2000 Nov;157(5):1415–30.

129. Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*. 1998 Aug 21;94(4):491–501.

130. Savill J, Haslett C. Granulocyte clearance by apoptosis in the resolution of inflammation. *Semin Cell Biol*. 1995 Dec;6(6):385–93.

131. Lodge KM, Thompson AAR, Chilvers ER, Condliffe AM. Hypoxic regulation of neutrophil function and consequences for *Staphylococcus aureus* infection. *Microbes Infect*. 2017 Mar;19(3):166–76.

132. Elbim C, Estaquier J. Cytokines modulate neutrophil death. *Eur Cytokine Netw*. 2010 Mar;21(1):1–6.

133. Ortega-Gómez A, Perretti M, Soehnlein O. Resolution of inflammation: an integrated view. *EMBO Mol Med*. 2013 May;5(5):661–74.

134. Xu J, Huang G, Guo TL. Developmental Bisphenol A Exposure Modulates Immune-Related Diseases. *Toxics*. 2016 Sep 26;4(4).

135. Xu H, Zhang X, Li H, Li C, Huo X-J, Hou L-P, et al. Immune response induced by major environmental pollutants through altering neutrophils in zebrafish larvae. *Aquat Toxicol Amst Neth*. 2018 Aug;201:99–108.

136. Balistrieri A, Hobohm L, Srivastava T, Meier A, Corriden R. Alterations in human neutrophil function by Bisphenol A. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2018 Aug 8;

137. Ratajczak-Wrona W, Nowak K, Garley M, Tynecka M, Jablonska E. Sex-specific differences in the regulation of inducible nitric oxide synthase by bisphenol A in neutrophils. *Hum Exp Toxicol*. 2018 Aug 16;960327118793188.

138. Schutte B, Nuydens R, Geerts H, Ramaekers F. Annexin V binding assay as a tool to measure apoptosis in differentiated neuronal cells. *J Neurosci Methods*. 1998 Dec 31;86(1):63–9.

139. Singer M, Sansonetti PJ. IL-8 is a key chemokine regulating neutrophil recruitment in a new mouse model of *Shigella*-induced colitis. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2004 Sep 15;173(6):4197–206.

140. Carson S, Ohashi S, Gerber D, Tieu T, Walser-Kuntz E, Walser-Kuntz D. Bisphenol-

A diminishes neutrophil recruitment in zebrafish. *J Immunol*. 2018 May 1;200(1 Supplement):49.19-49.19.

141. Kunkel SL, Standiford T, Kasahara K, Strieter RM. Interleukin-8 (IL-8): The Major Neutrophil Chemotactic Factor in the Lung. *Exp Lung Res*. 1991 Jan 1;17(1):17–23.

142. Bliss SK, Gavrilescu LC, Alcaraz A, Denkers EY. Neutrophil Depletion during *Toxoplasma gondii* Infection Leads to Impaired Immunity and Lethal Systemic Pathology. *Infect Immun*. 2001 Aug;69(8):4898–905.

143. Erkekoğlu P, Rachidi W, Yüzügüllü OG, Giray B, Oztürk M, Favier A, et al. Induction of ROS, p53, p21 in DEHP- and MEHP-exposed LNCaP cells-protection by selenium compounds. *Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc*. 2011 Jul;49(7):1565–71.

144. Gassman NR. Induction of oxidative stress by bisphenol A and its pleiotropic effects. *Environ Mol Mutagen*. 2017 Mar;58(2):60–71.

145. Jochmanová I, Lazúrová Z, Rudnay M, Bačová I, Mareková M, Lazúrová I. Environmental estrogen bisphenol A and autoimmunity. *Lupus*. 2015 Apr;24(4–5):392–9.

146. Xu J, Huang G, Guo TL. Developmental Bisphenol A Exposure Modulates Immune-Related Diseases. *Toxics*. 2016 Sep 26;4(4).

147. Meng Z, Wang D, Yan S, Li R, Yan J, Teng M, et al. Effects of perinatal exposure to BPA and its alternatives (BPS, BPF and BPAF) on hepatic lipid and glucose homeostasis in female mice adolescent offspring. *Chemosphere*. 2018 Dec;212:297–306.

148. Balistrieri A, Hobohm L, Srivastava T, Meier A, Corriden R. Alterations in human neutrophil function by Bisphenol A. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2018 Aug 8;

149. Cabas I, Rodenas MC, Abellán E, Meseguer J, Mulero V, García-Ayala A. Estrogen signaling through the G protein-coupled estrogen receptor regulates granulocyte activation in fish. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2013 Nov 1;191(9):4628–39.

150. Rodenas MC, Tamassia N, Cabas I, Calzetti F, Meseguer J, Cassatella MA, et al. G Protein-Coupled Estrogen Receptor 1 Regulates Human Neutrophil Functions. *Biomed Hub*. 2017;2(1):2–2.

151. Sun J, Huang YR, Harrington WR, Sheng S, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS. Antagonists selective for estrogen receptor alpha. *Endocrinology*. 2002 Mar;143(3):941–7.

152. Vandenberg LN. Non-monotonic dose responses in studies of endocrine disrupting chemicals: bisphenol a as a case study. *Dose-Response Publ Int Hormesis Soc.* 2014 May;12(2):259–76.
153. Lagarde F, Beausoleil C, Belcher SM, Belzunces LP, Emond C, Guerbet M, et al. Non-monotonic dose-response relationships and endocrine disruptors: a qualitative method of assessment. *Environ Health [Internet]*. 2015 Feb 11 [cited 2018 Jul 29];14. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4429934/>
154. Vandenberg LN. Non-monotonic dose responses in studies of endocrine disrupting chemicals: bisphenol a as a case study. *Dose-Response Publ Int Hormesis Soc.* 2014 May;12(2):259–76.
155. Lagarde F, Beausoleil C, Belcher SM, Belzunces LP, Emond C, Guerbet M, et al. Non-monotonic dose-response relationships and endocrine disruptors: a qualitative method of assessment. *Environ Health [Internet]*. 2015 Feb 11 [cited 2018 Jul 29];14. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4429934/>
156. Hill CE, Myers JP, Vandenberg LN. Nonmonotonic Dose–Response Curves Occur in Dose Ranges That Are Relevant to Regulatory Decision-Making. *Dose-Response [Internet]*. 2018 Sep 13 [cited 2019 Jan 5];16(3). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6137554/>
157. Wang T, Li M, Chen B, Xu M, Xu Y, Huang Y, et al. Urinary Bisphenol A (BPA) Concentration Associates with Obesity and Insulin Resistance. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012 Feb 1;97(2):E223–7.
158. Minh T. D, Vicky C. C, Michelle A. M, Margaret de G. Urinary bisphenol A and obesity in adults: results from the Canadian Health Measures Survey. *Health Promot Chronic Dis Prev Can Res Policy Pract.* 2017 Dec;37(12):403–12.
159. Biodegradation or metabolism of bisphenol A: From microorganisms to mammals - ScienceDirect [Internet]. [cited 2019 Jan 5]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300483X0500497X>
160. Maianski NA, Geissler J, Srinivasula SM, Alnemri ES, Roos D, Kuijpers TW. Functional characterization of mitochondria in neutrophils: a role restricted to apoptosis. *Cell Death Differ.* 2004 Feb;11(2):143–53.
161. Soto AM, Sonnenschein C. Environmental causes of cancer: endocrine disruptors as

- carcinogens. *Nat Rev Endocrinol*. 2010 Jul;6(7):363–70.
162. Razungles J, Cavallès V, Jalaguier S, Teyssier C. [The Warburg effect: from theory to therapeutic applications in cancer]. *Med Sci MS*. 2013 Nov;29(11):1026–33.
163. D’Cruz SC, Jubendradass R, Jayakanthan M, Rani SJA, Mathur PP. Bisphenol A impairs insulin signaling and glucose homeostasis and decreases steroidogenesis in rat testis: An in vivo and in silico study. *Food Chem Toxicol*. 2012 Mar 1;50(3):1124–33.
164. Alonso-Magdalena P, Quesada I, Nadal Á. Prenatal Exposure to BPA and Offspring Outcomes: The Diabesogenic Behavior of BPA. *Dose-Response Publ Int Hormesis Soc*. 2015 Jun;13(2):1559325815590395.
165. Maratou E, Dimitriadis G, Kollias A, Boutati E, Lambadiari V, Mitrou P, et al. Glucose transporter expression on the plasma membrane of resting and activated white blood cells. *Eur J Clin Invest*. 2007 Apr;37(4):282–90.
166. Federzoni EA, Valk PJM, Torbett BE, Haferlach T, Löwenberg B, Fey MF, et al. PU.1 is linking the glycolytic enzyme HK3 in neutrophil differentiation and survival of APL cells. *Blood*. 2012 May 24;119(21):4963–70.
167. Nachman RM, Hartle JC, Lees PSJ, Groopman JD. Early Life Metabolism of Bisphenol A: A Systematic Review of the Literature. *Curr Environ Health Rep*. 2014 Mar;1(1):90–100.
168. Ho K-L, Yuen K-K, Yau M-S, Murphy MB, Wan Y, Fong BM-W, et al. Glucuronide and Sulfate Conjugates of Bisphenol A: Chemical Synthesis and Correlation Between Their Urinary Levels and Plasma Bisphenol A Content in Voluntary Human Donors. *Arch Environ Contam Toxicol*. 2017 Oct;73(3):410–20.
169. Buka I, Osornio-Vargas A, Walker R. Canada declares bisphenol A a ‘dangerous substance’: Questioning the safety of plastics. *Paediatr Child Health*. 2009 Jan;14(1):11–3.
170. Jang S, Ji K. Effect of chronic exposure to two components of Tritan copolyester on *Daphnia magna*, *Moina macrocopa*, and *Oryzias latipes*, and potential mechanisms of endocrine disruption using H295R cells. *Ecotoxicol Lond Engl*. 2015 Nov;24(9):1906–14.
171. Couleau N, Falla J, Beillerot A, Battaglia E, D’Innocenzo M, Plançon S, et al. Effects of Endocrine Disruptor Compounds, Alone or in Combination, on Human Macrophage-Like THP-1 Cell Response. *PLoS One*. 2015;10(7):e0131428.