



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse III – Paul Sabatier

Discipline ou spécialité : Pathologie, Toxicologie, Génétique & Nutrition

Présentée et soutenue par Viorica BRANISTE
Le 13 janvier 2011

Titre : *La barrière intestinale, une nouvelle cible des oestrogènes
et des xénoestrogènes : le cas du Bisphénol A*

JURY

Pr. Philippe Valet
Dr. Thierry Piche
Dr. Bernard Jégou
Dr. Jean-Paul Lallès
Dr. Jean Fioramonti
Dr. Eric Houdeau

Président du jury
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Directeur de thèse
Directeur de thèse

Ecole doctorale : *Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques, Bioingénieries*
Unité de recherche : *Unité de Neuro-Gastroentérologie & Nutrition*
Directeurs de Thèse : *Dr. Jean Fioramonti et Dr. Eric Houdeau*



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse III – Paul Sabatier
Discipline ou spécialité : Pathologie, Toxicologie, Génétique & Nutrition

Présentée et soutenue par Viorica BRANISTE

Le 13 janvier 2011

Titre : *La barrière intestinale, une nouvelle cible des oestrogènes et des xénoestrogènes : le cas du Bisphénol A*

JURY

Pr. Philippe Valet
Dr. Thierry Piche
Dr. Bernard Jégou
Dr. Jean-Paul Lallès
Dr. Jean Fioramonti
Dr. Eric Houdeau

Président du jury
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Directeur de thèse
Directeur de thèse

Ecole doctorale : *Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques, Bioingénieries*
Unité de recherche : *Unité de Neuro-Gastroentérologie & Nutrition*
Directeurs de Thèse : *Dr. Jean Fioramonti et Dr. Eric Houdeau*

«Peu de choses sont impossibles à qui est assidu et compétent... Les grandes œuvres jaillissent non de la force mais de la persévérance.» **Samuel Johnson**

« Le succès ne consiste pas à ne jamais faire d'erreur mais à ne jamais faire la même erreur deux fois . » **George Bernard Shaw**

« Le courage consiste à choisir le moindre mal, si affreux qu'il soit encore. » **Stendhal**

*Ce travail est dédié à Dumitru qui
m'a toujours encouragé, soutenu et
aidé avec ses conseils très précieux.*

AVANT PROPOS

Les travaux qui font l'objet de ce mémoire ont été réalisés dans l'unité de Neuro-Gastroentérologie et Nutrition de l'INRA de Toulouse dirigée par le Docteur Vassilia Theodorou.

Je remercie vivement Monsieur le Docteur Philippe Valet, Professeur à l'Université Paul Sabatier, qui m'a fait l'honneur de présider ce jury. Je souhaite lui témoigner ma profonde reconnaissance et de mon profond respect.

J'adresse mes sincères remerciements à Monsieur le Docteur Thierry Piche, Gastroenterologue au Centre Hospitalier Universitaire de Nice, et à Monsieur le Docteur Bernard Jégou, Directeur de Recherche à l'unité INSERM 625 de Rennes, pour avoir accepté la lourde tâche d'être rapporteurs de cette thèse. J'exprime ma profonde reconnaissance à Monsieur le Docteur Jean-Paul Lallès, Directeur de Recherche à l'unité INRA 1079 de Rennes, pour sa participation à ce jury.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance et mon profond respect à Monsieur le Docteur Jean Fioramonti, Directeur de recherche à l'INRA de Toulouse, de m'avoir accueilli dans son laboratoire lors de mon stage de master et de m'avoir confié ce sujet. Je vous remercie pour vos conseils avisés, éclairés et très constructifs.

J'adresse mes chaleureux remerciements à Monsieur le Docteur Eric Houdeau, Chargé de Recherche à l'INRA de Toulouse, qui a assuré la direction scientifique de cette thèse et qui a fait naître en moi ce goût pour la recherche. Je te remercie pour ta grande disponibilité, ton encadrement ainsi que les hautes compétences scientifiques qui m'ont été d'une aide très précieuse, me permettant de réaliser ces recherches dans d'excellentes conditions.

Je tiens également à remercier Madame le Docteur Vassilia Theodorou, Enseignant-chercheur à l'Ecole d'Ingénieur de Purpan, pour ses conseils, son soutien et ses encouragements. Je vous remercie pour nos discussions sur la vie et pour votre amitié.

Mes chaleureux remerciements vont également vers Madame le Docteur Hélène Eutamène, Enseignant-chercheur à l'Ecole d'Ingénieur de Purpan, pour ces encouragements et ces conseils ;

vers Monsieur le Docteur Lionel Bueno, Directeur de Recherche à l'INRA de Toulouse, pour vos conseils scientifiques et pour votre connaissance brillante de la physiologie ;

vers Monsieur le Docteur Laurent Ferrier, Chargé de recherche à l'INRA de Toulouse pour ses conseils de quotidien

et vers Monsieur le Docteur Rafael Garcia-Villar pour sa gentillesse.

Je tiens à remercier Madame le Docteur Afifa Ait-Belgnaoui, pour tout son soutien, son aide, son écoute, sa patience, son amitié... Je te remercie énormément pour tes encouragements et pour tes conseils indispensables surtout ces derniers mois.

Je tiens à exprimer mes remerciements à Claire Cenac, pour sa bonne humeur, sa disponibilité, son écoute, son amitié et pour tous les bons moments passés ensemble et pour toutes les huitres... je souhaite plein de bonheur à votre famille...

L'aboutissement de ces travaux n'aurait pas été possible sans le soutien scientifique et technique de nombreuses personnes. Je remercie chaleureusement :

Christel Cartier pour tes compétences remarquables dans le domaine de l'histologie ainsi que pour ta gentillesse et ta disponibilité.

Mathilde Leveque pour m'avoir initié aux techniques de la biochimie ainsi que pour ta gentillesse et pour ton combat éternel pour la protection de l'environnement...

Eric Gaultier pour tes secrets sur le fonctionnement du PowerLab, pour ton esprit critique et tes conseils avisés.

Joelle Le Bret pour tes compétences extraordinaires face à l'administration ainsi que pour les nombreuses discussions sur la vie et un grand merci pour toutes les plantes...

Gilles Chaumaz pour les petites astuces de chambres de Ussing et pour les résultats de culture cellulaire, Bernard Joseph et Patrice Roubly pour m'avoir toujours trouvé les animaux dont j'avais besoin.

Mes remerciements vont également vers Valérie Tondereau et Guylène Lafforgue pour votre amitié, vers Valérie Bezirard, Valérie Bacquie pour votre gentillesse et votre

disponibilité, vers Catherine Beaufrand, Marion Gillet et Celine Arliguie pour votre joie de vivre, vers Isabelle Pinson pour ta gentillesse, vers Vincent Tinard pour ta disponibilité.

Un grand merci à Paquita Rovira pour ta bonne humeur et à Marcel Caussette pour tes conseils, ton accueil, ta gentillesse et bien sur pour le bon souvenir de ma soutenance.

Je remercie tous les collègues scientifiques que j'ai eus durant ces années de thèse : Aurore, Simona, Marta, Anita, Krisztina, Hanna, Lara, Delphine, Isabelle, Marrie Pierre, Nabila, ... pour tous les échanges aussi amicaux que fructueux, qui ont émaillé ces années de thèse.

C'est évident que je n'aurais pas pu réaliser mes travaux sans cette collaboration avec mes collègues du laboratoire de Xénobiotiques et je remercie vivement les Docteurs Daniel Zalko et Jean Pierre Cravedi pour les nombreux conseils et leurs précieuses connaissances sur le Bisphénol A.

Mes remerciements vont également vers les collègues du laboratoire de pharmacologie : Alice, Simon, Pascal, Arnaud, Hervé, Laila, Frédéric, Jean-Luc, Cornelia, Joëlle, Dima, Cécile, Zeina, Ionelia... et bien d'autres encore !

Je ne peux que remercier ma famille de m'avoir toujours soutenue et encouragée pendant ces années d'études. Je souhaite remercier également ma belle famille et plus particulièrement ma belle-mère qui malgré les épreuves de la vie a été d'un immense soutien pour ma dernière ligne droite.

Enfin, je souhaite remercier plus particulièrement Dumitru, qui a toujours eu confiance en mes capacités et qui m'a encouragé à faire de la recherche et à avancer malgré les obstacles. Merci d'avoir été toujours là et de m'avoir soutenu pendant mes moments de doutes, de stress, de colère et de joie. Tu es un des principaux piliers et acteurs dans la réussite de cette thèse. J'ai passé avec toi les meilleurs moments de ma vie.

*Les travaux présentés dans ce mémoire ont donné lieu aux
publications et communications suivantes :*

PUBLICATIONS

V. Braniste, M. Leveque, C. Buisson-Brenac, L. Bueno, J. Fioramonti, E. Houdeau. "Oestradiol decreases paracellular permeability in the female rat colon through occludin up-regulation and oestrogen receptor β in epithelial cells." *J Physiol.* 2009 ; 587:3317-28.

V. Braniste, A. Jouault, E. Gaultier, A. Polizzi, C. Buisson-Brenac, M. Leveque, P.G. Martin, V. Theodorou, J. Fioramonti, E. Houdeau. Impact of oral bisphenol A at reference doses on intestinal barrier function and sex differences after perinatal exposure in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 ; 107(1):448-53.

V. Braniste, M. Audebert, D. Zalko, E. Houdeau. "Bisphenol A in the gut: another break in the wall?" 10^{ème} Colloque Médecine et Recherche de la Fondation Ipsen - Série Endocrinologie: "Multi-System Endocrine Disruption". Paris, 29 novembre 2010.

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

Communications orales :

L. Moussa, C. Grimaldi, F. Paul, **V. Braniste**, V. Tondereau, H. Eutamene, L. Bueno, J. Fioramonti, E. Houdeau, V. Theodorou. "Protective Effect of a Phytoestrogen-Enriched Diet on the Increase in Visceral Sensitivity and Intestinal Permeability Induced by Acute Stress in Female Rats" *Digestive Disease Week*, 1-5 Mai 2010, Nouvelle Orléans, Etats Unis. *Gastroenterology* 2010; 138, (Suppl.1) S27

V. Braniste, M. Leveque, L. Bueno, J. Fioramonti, E. Houdeau. "Effect of chronic oral exposure to the xenoestrogen bisphenol A on epithelial paracellular permeability and inflammatory response in the rat colon" *Digestive Disease Week*, 17-22 Mai 2008, San Diego, Etats Unis. *Gastroenterology* 2008; 134, (Suppl.1) A36

V. Braniste, M. Leveque, L. Bueno, J. Fioramonti, E. Houdeau. "Effects of chronic dietary exposure to the xenestrogens diethylhexyl phthalate (DEHP) and bisphenol A (BPA) on intestinal barrier function and inflammatory response in the rat colon" *United European Gastroenterology Week*, 27-31 Octobre 2007, Paris, France

V. Braniste, M. Leveque, L. Bueno, J. Fioramonti, E. Houdeau. "Evaluation des effets d'exposition chronique aux xénoestrogènes Diéthylhexyl phtalate (DEHP) et Bisphénol A (BPA) sur la fonction de barrière intestinale et les états inflammatoires du côlon." 21^e Réunion du Club Français de Motricité Digestive, 21-22 juin 2007, Louvain, Belgique.

Communications affichées :

L. Moussa, C. Grimaldi, F. Paul, **V. Braniste**, V. Tondereau, H. Eutamene, L. Bueno, J. Fioramonti, E. Houdeau, V. Theodorou. "Effet d'un traitement par un ingrédient végétal riche en phytoestrogènes sur l'hypersensibilité viscérale et l'hyperperméabilité intestinale induites par un stress chez le rat femelle" Les Journées Francophones d'Hépatogastroentérologie et d'Oncologie Digestive (JFHOD), 24-27 Mars 2010, Paris, France.

V. Braniste, E. Gaultier, L. Bueno, J. Fioramonti, E. Houdeau. "Low dose exposure to the environmental endocrine disruptor bisphenol A induces visceral hypersensitivity in rats" *Joint International Neurogastroenterology and Motility Meeting*, 27-30 Août 2009, Chicago, Etats Unis.

V. Braniste, M. Leveque, C. Buisson-Brenac, L. Bueno, J. Fioramonti, E. Houdeau. "The endocrine disruptor bisphenol A (BPA) decreases paracellular permeability in the female rat colon at environmentally relevant doses and increases tight junction protein expression in Caco-2 cells", *5th Copenhagen Workshop on Endocrine Disruptors*, 20-22 Mai 2009, Copenhagen, Danemark.

V. Braniste, E. Gaultier, L. Bueno, J. Fioramonti, E. Houdeau. "Low dose exposure to the environmental endocrine disruptor bisphenol A induces visceral hypersensitivity in rats" *5th Copenhagen Workshop on Endocrine Disruptors*, 20-22 Mai 2009, Copenhagen, Danemark.

V. Braniste, M. Leveque, C. Buisson-Brenac, L. Bueno, J. Fioramonti, E. Houdeau. "The endocrine disruptor bisphenol A (BPA) decreases paracellular permeability in the female rat colon at environmentally relevant doses and increases tight junction protein expression in Caco-2 cells" poster avec mention, *Digestive Disease Week*, 30 Mai - 4 Juin 2009, Chicago, Etats Unis. *Gastroenterology* 2009; 136, (Suppl.1) A411.

V. Braniste, M. Leveque, L. Bueno, J. Fioramonti, E. Houdeau. "Estrogen-induced decrease in colonic paracellular permeability involves up-regulation of occludin and estrogen receptor beta" *United European Gastroenterology Week*, 18-22 Octobre 2008, Vienna, Austria *Gut* 2008; 57 (Suppl II) A221.

E. Houdeau, L. Moussa, **V. Braniste**, M. Leveque, J. Dayde, L. Bueno, J. Fioramonti, H. Eutamene, V. Theodorou. "Beneficial effects of soy germ diet on experimental colitis in a rat model of menopause : involvement of oestrogenic activity" *United European Gastroenterology Week*, 18-22 Octobre 2008, Vienna, Austria *Gut* 2008; 57 (Suppl II) A335.

V. Braniste, L. Bueno, J. Fioramonti, E. Houdeau. "Estrous cycle-dependent variation of colonic epithelial permeability in the female rat: role of estrogen" *Digestive Disease Week*, 19-24 Mai 2007, Washington, Etats Unis, *Gastroenterology* 2007, 132 (Suppl. 2) A406.

RESUME

La barrière intestinale est la plus grande surface de contact entre le milieu extérieur et le milieu intérieur. Elle est également la première surface exposée à tout élément ingéré par voie orale. Outre ses fonctions d'absorption et de maintien de l'équilibre hydrique de l'organisme, elle exerce un rôle important de défense contre les agents délétères (toxines, bactéries) contenus dans la lumière intestinale. En conditions physiologiques, la barrière intestinale assure une perméabilité sélective permettant le passage de petites quantités d'antigènes afin de stimuler le système immunitaire et d'empêcher le développement d'une inflammation (tolérance de la flore commensale et reconnaissance des antigènes alimentaires).

Dans un premier temps, nous avons montré une modulation de la perméabilité de la barrière épithéliale intestinale chez la rate au cours du cycle sexuel. Plus particulièrement, la dominance des œstrogènes plasmatiques en phase folliculaire du cycle s'accompagne d'une réduction de la perméabilité paracellulaire colique. Cette diminution oestrogéno-dépendante du transport paracellulaire implique la voie de signalisation ER β dans les cellules épithéliales et une surexpression d'occludine et de JAM-A, deux protéines transmembranaires des jonctions serrées contrôlant les espaces intercellulaires. Cette propriété des oestrogènes est intéressante à considérer dans les pathologies associées à une hyperperméabilité intestinale, telle que le Syndrome de l'Intestin Irritable ou Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin, où la voie de signalisation ER β peut être envisagée comme cible thérapeutique.

Dans un deuxième temps, nous avons mis en évidence que le BPA, un contaminant oestrogéno-mimétique largement exploité dans l'industrie des emballages alimentaires, affecte la perméabilité de l'épithélium intestinal. Cet effet observé chez l'animal et sur des lignées de cellules épithéliales intestinales humaines passe par l'activation des ERs présents dans les cellules épithéliales. Il en résulte une augmentation de la synthèse d'occludine et de JAM-A, donc le rétrécissement des espaces intercellulaires, limitant les échanges naturels au niveau de la paroi du tube digestif et pouvant favoriser la rétention d'eau dans le corps. Le BPA présente également un impact sur la réponse inflammatoire dans le côlon adulte et rend l'intestin plus sensible à la douleur. Nos résultats ont également montré qu'une exposition *in utero* et pendant l'allaitement au BPA augmentait le risque de développer une inflammation intestinale sévère à l'âge adulte, essentiellement

dans la descendance femelle. Cette fragilité dans la fonction de barrière biologique de l'intestin serait la conséquence d'une maturation imparfaite du système immunitaire associé aux muqueuses intestinales. Nous émettons l'hypothèse que l'exposition périnatale au BPA pourrait freiner le développement des défenses immunitaires intestinales, naïves à la naissance, rendant les muqueuses coliques chez la femelle plus vulnérables face à un stimulus inflammatoire.

ABSTRACT

The intestinal barrier is the largest area of contact between the external and internal environment, and the first surface exposed to orally ingested compounds. In addition to absorption and maintenance of water balance in the body, the intestinal barrier has a key role of defense against noxious agents (toxins, bacteria, xenobiotics) contained in the lumen. The intestinal barrier fulfills multiple complex roles through its interaction with the gut flora and assurance of the selective permeability, by providing a barrier from the exterior and a platform for antigen presentation and immune stimulation.

Initially, we demonstrated a modulation of the epithelial barrier function in the female rat intestine throughout the estrous cycle. More specifically, the dominance of plasma estrogen in the follicular phase of the cycle is accompanied by a reduction in colonic paracellular permeability. The decrease in paracellular passage through the intestinal epithelium by estrogen involves estrogen receptor β signaling pathway and is due to overexpression of transmembrane tight junction proteins that control the intercellular spaces, occludin and JAM-A. This ability of estrogen could be used as a future therapeutic target in pathologies associated with intestinal hyperpermeability, such as Irritable Bowel Syndrome or Chronic Inflammatory Bowel Disease.

In a second step, we demonstrated that the xenoestrogen BPA, widely used in food packaging industry, disrupts the physiology of intestinal barrier in adults, by reducing intestinal epithelial permeability in animals and on human colonic epithelial cell line. An effect that involves the estrogen receptors present in epithelial cells and overexpression of the occludin and JAM-A, narrowing the intercellular spaces, thus limiting the natural exchanges across the gut wall. Moreover, BPA exposure reduces the inflammatory conditions in the colon and induces increased visceral sensitivity. In contrast, exposure to BPA during the perinatal period increases the risk of developing severe intestinal inflammation in adulthood, mainly in the female offspring. This fragility in the biological barrier function of the intestine is likely the result of dysregulation in the maturation process of the immune system associated with the intestinal mucosa. We hypothesize that perinatal exposure to BPA could inhibit the development of intestinal immune system, making the colonic mucosa in females more vulnerable to an inflammatory stimulus.

SOMMAIRE

TABLE DES FIGURES	- 1 -
PRINCIPALES ABREVIATIONS	- 3 -
SITUATION DU SUJET	- 4 -
DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES.....	- 8 -
CHAPITRE I	
L'INTESTIN – ANATOMIE FONCTIONNELLE.....	- 9 -
<i>1.1 Structure pariétale.....</i>	<i>- 9 -</i>
<i>1.2 L'épithélium colique.....</i>	<i>- 10 -</i>
<i>1.3 La barrière intestinale – la structure et les acteurs</i>	<i>- 11 -</i>
<i>1.4 La barrière épithéliale.....</i>	<i>- 12 -</i>
1.4.1 La perméabilité intestinale	- 13 -
1.4.2 Les jonctions intercellulaires.....	- 16 -
1.4.3 Les jonctions serrées	- 17 -
<i>1.5 La barrière immunologique.....</i>	<i>- 22 -</i>
1.5.1 Les organes de l'immunité de l'intestin	- 22 -
1.5.2 Les cellules de l'immunité	- 24 -
CHAPITRE II	
LES OESTROGENES - DE LA SYNTHÈSE A LEUR FONCTION	- 29 -
<i>2.1 La synthèse et le métabolisme des œstrogènes</i>	<i>- 29 -</i>
<i>2.2 Les récepteurs aux œstrogènes.....</i>	<i>- 31 -</i>
2.2.1 Structure des récepteurs nucléaires aux œstrogènes.....	- 31 -
2.2.2 Mécanismes d'action des récepteurs aux œstrogènes	- 33 -
2.2.3 Existe-t-il un troisième récepteur aux œstrogènes ?.....	- 35 -
<i>2.3 Fluctuation des œstrogènes au cours de la vie.....</i>	<i>- 36 -</i>
2.3.1 De la vie fœtale à la puberté.....	- 36 -
2.3.2 La vie adulte – une succession de modifications cycliques	- 37 -
<i>2.4 Le rôle des œstrogènes dans la physiopathologie intestinale</i>	<i>- 41 -</i>
2.4.1 Les œstrogènes et l'intégrité de la barrière intestinale	- 42 -
2.4.2 Les œstrogènes et le système immunitaire intestinal	- 45 -
2.4.3 Les œstrogènes et la douleur viscérale.....	- 50 -

CHAPITRE III

BISPHENOL A – XENOESTROGÈNE ET PERTURBATEUR ENDOCRINIEN... - 57 -

3.1 *L'origine et les sources de production du Bisphénol A*..... - 57 -3.2 *Quelles voies d'exposition pour l'homme ?* - 58 -3.2.1 *L'exposition via l'environnement* - 58 -3.2.2 *L'exposition via l'alimentation* - 59 -3.2.3 *L'exposition cutanée* - 61 -3.3 *Imprégnation des populations* - 61 -3.4 *Mécanismes d'action du Bisphénol A*..... - 63 -3.5 *Métabolisme du Bisphénol A* - 66 -3.6 *Bisphénol A et période périnatale : une fenêtre critique d'exposition*..... - 67 -3.7 *Bisphénol A et risques sanitaires* - 68 -3.7.1 *Etudes animales*..... - 68 -3.7.2 *Etudes épidémiologiques*..... - 72 -3.8 *Position des autorités réglementaires et politiques*..... - 74 -3.8.1 *Législation européenne* - 74 -3.8.2 *Législation REACH* - 76 -3.8.3 *Législation au plan mondial* - 77 -**RESULTATS EXPERIMENTAUX**..... - 80 -I. *Oestradiol decreases colonic permeability through oestrogen receptor β -mediated up-regulation of occludin and junctional adhesion molecule-A in epithelial cells.* - 82 -II. *Impact of oral bisphenol A at reference doses on intestinal barrier function and sex differences after perinatal exposure in rats*..... - 96 -**DISCUSSION GENERALE** - 106 -I. *Influence des oestrogènes sur la perméabilité intestinale : implications physiopathologiques* - 108 -II. *Bisphénol A – quel impact sur la barrière intestinale adulte ?* - 116 -III. *Exposition périnatale au bisphénol A et développement de la fonction de barrière intestinale* - 121 -**CONCLUSION GENERALE**..... - 135 -**REFERENCES** - 138 -

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Schéma d'une coupe transversale de la paroi du tube digestif	9 -
Figure 2: Les voies de transport trans-épithéliales.	13 -
Figure 3: a.Représentation schématique des cellules épithéliales et des jonctions intercellulaires.	17 -
Figure 4: I / Structure moléculaire des jonctions serrées et II/ des protéines de jonction – occludine, claudine et JAM-A.	17 -
Figure 5: Représentation schématique des éléments lymphoïdes du GALT.....	23 -
Figure 6: Voies principales de biosynthèse des œstrogènes.....	30 -
Figure 7: Les domaines fonctionnels des récepteurs aux oestrogènes.	32 -
Figure 8: Mécanismes d'action des récepteurs aux oestrogènes.	33 -
Figure 9: Profil hormonal au cours du cycle menstruel et développement de l'endomètre. ...	39 -
Figure 10: Profil hormonal au cours du cycle oestral chez la rate	40 -
Figure 11: Expression de récepteurs aux oestrogènes au niveau du côlon et dans les lignées cellulaires coliques.	44 -
Figure 12: Relation entre intensité du stimulus douloureux et sensation douloureuse. ..	50 -
Figure 13: Voies de la douleur : faisceaux spinothalamiques latéral et médial.	52 -
Figure 14: Variations de la douleur abdominale au cours du cycle menstruel chez les patientes souffrantes du SII (différents sous-groupes selon les critères de Rome II - constipés, diarrhéiques, alternés).....	55 -
Figure 15: Structure chimique du bisphénol A.....	57 -
Figure 16: Table d'exposition alimentaire totale au Bisphénol A à différents âges.....	60 -
Figure 17: Relation entre structure chimique du Bisphénol A et activité oestrogénique..	64 -
-	
Figure 18 : La corrélation entre les concentrations urinaires de Bisphénol A et la présence de certaines pathologies.....	73 -
Figure 19: Corrélation entre les niveaux circulants des hormones ovariennes et la constipation.....	111 -
Figure 20: Corrélation entre les niveaux circulants des hormones ovariennes et la douleur abdominale chez les femmes souffrant de SII.	113 -

Figure 21: L'influence des oestrogènes et des agonistes d'ER α et β sur la sensibilité viscérale	- 115 -
Figure 22: Effets du BPA sur la perméabilité paracellulaire de cellules coliques humaines T84.....	- 118 -
Figure 23 : Conséquences d'une exposition périnatale au BPA _{NOAEL} sur la réponse inflammatoire dans le côlon des rats adultes.	- 124 -
Figure 24: Evolution d'expression des protéines de jonctions serrées au cours du développement.....	- 126 -
Figure 25: Evolution d'expression colique des récepteurs aux œstrogènes chez la femelle au cours du développement.	- 127 -
Figure 26: Conséquences d'un traitement oestradiol sur la perméabilité intestinale totale chez la rate de 10 jours	- 128 -
Figure 27: Conséquences d'une exposition périnatale au BPA sur la perméabilité paracellulaire intestinale totale (A) et colique (B).....	- 129 -
Figure 28: Modulation d'expression des aquaporines après exposition périnatale au BPA. ...	131 -
Figure 29: Conséquences d'une exposition périnatale au BPA sur la prolifération des cellules épithéliales coliques.	- 134 -

PRINCIPALES ABREVIATIONS

AQP	Aquaporine
BADGE	Bisphénol A Diglycidil Ether
BPA	Bisphénol A
BPA-Gluc	BPA-glucuronide
Caco-2	human epithelial colorectal adenocarcinoma cells
Dextran-FITC	dextran-fluoro-isothiocyanate
DES	diéthylstilbestrol
DJA	Dose Journalière Admissible
DPN	diarylpropionitrile
DSS	Dextran Sulfate de Sodium
EB	17 β -oestradiol
EFSA	European Food Safety Authority
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ER	Estrogen Receptor
ERE	Estrogen Responsive Element
FSH	Follicle-Stimulating Hormone
GALT	Gut-Associated Lymphoid Tissue
GPR30	G Protein coupled Receptor 30
Ig	Immunoglobuline
IFN γ	Interféron γ
IGF	Insulin-like Growth Factor
IL	Interleukine
JAM-A	Junctional Adhesion Molecule – A
KO	Knock out
LH	Luteinizing Hormone
MICI	Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin
MIF	Macrophage Migration Inhibitory Factor
MPO	myélopéroxydase
NK	Natural Killer
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level
OVX	ovariectomisé
PKC	Protéine Kinase C
PPT	Propyl Pyrazole Triol
RCH	Recto-Colite ulcéro-hémorragique
SII	Syndrome de l'Intestin Irritable
TER	Résistance Trans-épithéliale
TGF	Transforming Growth Factor
Th	T helper
TNBS	2,4,6-Trinitrobenzene sulfonic acid
TNFα	Tumor Necrosis Factor α
ZO	Zonula Occludens

SITUATION DU SUJET

Comme pour toute barrière biologique, la barrière intestinale se trouve à l'interface entre l'organisme et le milieu extérieur (contenu luminal). Elle est la première surface exposée à tout élément ingéré par voie orale. Si le terme de « fonction de barrière intestinale » est une notion vaste (incluant motricité, épithélium, immunité, flore commensale et mucus), la perméabilité sélective qu'elle autorise et les défenses de l'hôte en sont les principaux acteurs. Si la fonction *princeps* de l'intestin reste l'absorption de nutriments, tout en contribuant à l'équilibre hydrique du corps en complément du système rénal (absorption et excrétion d'eau), sa fonction de barrière - d'abord physique, puis immunitaire - protège l'organisme d'agents délétères (toxines, bactéries, xénobiotiques) contenus dans la lumière intestinale, et permet la sécrétion d'immunoglobulines vers la lumière. Toute rupture dans cette fonction est impliquée dans la pathogénèse de troubles fonctionnels de l'intestin (syndrome de l'intestin irritable – SII) (Barbara et al. 2002; Geese et al. 2008) et de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI – maladie de Crohn et rectocolite ulcéro-hémorragique) (Zeissig et al. 2007). Chez ces patients, le dimorphisme sexuel observé dans l'évolution des pathologies (prévalence et intensité de la réponse inflammatoire), ou encore la variation de la symptomatologie (douleur abdominale, transit intestinal) selon le statut hormonal (cycle menstruel, grossesse, ménopause) ont récemment posé les bases d'une modulation de la fonction de barrière intestinale par les hormones sexuelles, principalement ovariennes (oestrogènes et progestérone), dont les mécanismes d'action restent à déterminer (Heitkemper et al. 2003; Kane and Reddy 2008; Cain et al. 2009; Heitkemper and Chang 2009).

Des récepteurs aux oestrogènes ont été identifiés dans l'intestin et le côlon, chez l'homme et le rongeur de laboratoire, exprimés principalement au niveau des cellules épithéliales et des cellules immunitaires (Campbell-Thompson et al. 2001; Konstantinopoulos et al. 2003). L'oestradiol joue un rôle essentiel dans l'organisation et la maintenance de la barrière épithéliale digestive, en régulant les processus de prolifération et de différenciation des cellules épithéliales (Wada-Hiraike *et al*, 2006). Les oestrogènes présentent également des propriétés protectrices dans le développement d'adénomes du côlon, en limitant la prolifération des cellules tumorales (Konstantinopoulos et al. 2003), ou encore des effets non-génomiques dans la régulation du transport trans-épithélial d'ions et d'eau (Condliffe et al. 2001). Plus récemment, plusieurs études ont montré que les oestrogènes participaient également au contrôle de la réponse inflammatoire dans le côlon,

en modulant la production des médiateurs de l'inflammation dans les muqueuses affectées, en particulier les cytokines (Verdu et al. 2002; Harnish et al. 2004; Houdeau et al. 2007). Par contre, alors que la perméabilité de nombreux *epithelia* (endothélium, barrière hémato-encéphalique, épithélium utérin) est montrée sous l'influence des oestrogènes circulants (Gorodeski 2001; Ye et al. 2003; Kang et al. 2006a), la question d'un contrôle similaire sur l'épithélium intestinal et sa fonction de barrière physique n'a jamais été abordée.

Le Bisphénol A (BPA) est à la base un œstrogène de synthèse, mais jamais utilisé comme tel chez l'homme du fait de propriétés hormonales jugées insuffisantes. Hasard de la chimie, les propriétés structurales du BPA ont fait qu'il est depuis 40 ans utilisé comme monomère entrant dans la composition des polycarbonates et des résines époxy, deux dérivés plastiques largement exploités dans l'industrie des emballages alimentaires (bouteilles, canettes de boisson, boîtes de conserve ou encore biberons). Or le BPA migre dans les aliments ou les liquides dès les conditions normales d'utilisation (température ambiante), une migration exacerbée lors du chauffage (stérilisation, micro-ondes) ou dans des conditions acides (pH faible de certains légumes et fruits en conserves). L'exposition de la population humaine est attestée par des études relatant leur présence dans le plasma et l'urine (Vandenberg et al. 2007a; Calafat et al. 2008; Calafat et al. 2009). Compte tenu de ses propriétés oestrogéniques, le BPA est classé comme perturbateur endocrinien, capable de se lier aux récepteurs des oestrogènes et ainsi mimer l'activité de l'hormone endogène (Kuiper et al. 1997). De nombreuses études montrent que le BPA peut perturber des fonctions endocrines normales, effets traduits chez l'animal par des anomalies de développement de l'appareil génital (atrophie testiculaire et épидидymaire, hypospadias), une réduction de fertilité (une altération de la qualité du sperme ainsi qu'une atrophie des tubes séminifères) (vom Saal et al. 1998; Timms et al. 2005), des défauts d'ovulation, une altération du cycle œstral (Rubin et al. 2001) ou encore une activité proliférative accrue des cellules épithéliales dans les glandes endométriales ou mammaires (Markey et al. 2001). Ces dernières années, l'inquiétude sur un risque sanitaire pour l'homme est portée par le nombre croissant d'études mettant en évidence la toxicité du BPA pour de faibles expositions quotidiennes, inférieures aux doses seuils jusqu'alors jugées sans effet pour l'homme dans les études de toxicologie réglementaire.

Si la voie orale est la principale voie de contamination au BPA pour l'homme, la barrière intestinale est tout naturellement la première zone exposée au contaminant. Pourtant, aucune étude ne s'est intéressée à l'impact endocrinien du BPA dans l'intestin.

Dans ce travail de thèse, le premier objectif a été de définir les bases physiologiques d'un contrôle hormonal de la perméabilité épithéliale, en particulier chez la femelle où la balance plasmatique oestro-progestative au cours du cycle sexuel est supposée influencer cette fonction de barrière. Ce volet fondamental était nécessaire pour ensuite aborder l'influence d'une exposition *per os* au xénoestrogène BPA, aux doses de références et plus faibles, d'abord sur la physiopathologie de la barrière intestinale chez l'adulte (perméabilité, sensibilité viscérale et états inflammatoires dans le côlon), puis à partir d'une exposition périnatale considérée comme la période critique d'exposition aux perturbateurs endocriniens.

DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES

CHAPITRE I

L'INTESTIN – ANATOMIE FONCTIONNELLE

1.1 Structure pariétale

La paroi de l'ensemble du tube digestif présente une organisation complexe, constituée de quatre tuniques successives de l'extérieur vers l'intérieur : la séreuse, la musculuse, la sous- muqueuse et la muqueuse (Figure 1).

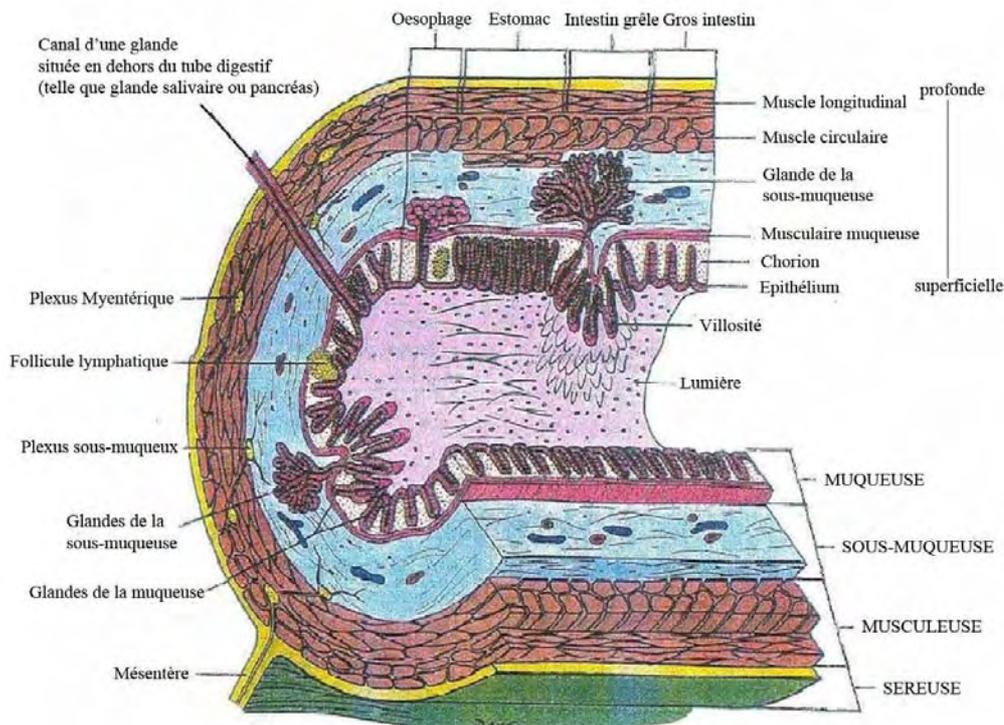


Figure 1 : Schéma d'une coupe transversale de la paroi du tube digestif

La séreuse est une tunique fine, formée de cellules endothéliales en continuité avec le mésentère, recouvrant un tissu lâche, et adhérent de façon intime à la musculuse sur les

faces et le bord libre du conduit. Cette disposition est favorable aux changements de diamètre associés à la motilité intestinale.

La musculuse est constituée de fibres musculaires lisses disposées en deux couches de cellules musculaires : une circulaire interne et une longitudinale externe. Entre ces deux couches se trouve le plexus nerveux myentérique (plexus d'Auerbach).

La sous-muqueuse se compose d'un tissu conjonctif lâche à fibres de collagène et des fibres élastiques, permettant le glissement de la muqueuse par rapport aux couches musculaires. La sous-muqueuse abrite un riche réseau artériel, veineux et lymphatique, ainsi que le plexus nerveux sous-muqueux (plexus de Meissner).

La structure de la **muqueuse** diffère considérablement d'une extrémité à l'autre du tube digestif, reflétant les différences d'activités et de fonctions de chaque segment du tractus. La muqueuse est constituée de trois couches successives : la *muscularis mucosae*, la *lamina propria* et l'épithélium.

- La *muscularis mucosae* est composée de deux couches fines de muscles lisses : longitudinale externe et circulaire interne.
- La *lamina propria* est un tissu conjonctif fin et réticulé très riche en capillaires sanguins et lymphatiques et en leucocytes.
- L'épithélium monostratifié est composé d'une seule assise d'entérocytes, entre lesquels s'intercalent, en nombre plus restreint, les cellules caliciformes à mucus, les cellules entérochromaffines, les cellules endocrines sécrétrices et les cellules de Paneth exocrines.

1.2 L'épithélium colique

L'épithélium colique constitue une barrière cellulaire quasi étanche entre le lumen du côlon et la muqueuse intestinale. L'épithélium présente des invaginations dans la muqueuse, appelées cryptes de Lieberkühn. Ces cryptes contiennent des cellules souches adultes ainsi que les progéniteurs épithéliaux en cours de prolifération, de différenciation et de migration. L'épithélium possède une importante capacité de prolifération et de différenciation. Le renouvellement épithélial s'effectue à partir des cellules souches en 2-3 jours chez les rats et en 4-5 jours chez l'homme.

Les types des cellules retrouvées dans les cryptes Lieberkühn sont les entérocytes, les cellules caliciformes et de rares cellules entéroendocrines.

Les entérocytes ont une fonction absorbante et sont les cellules les plus abondantes de l'épithélium au niveau du côlon. Ces cellules assurent deux fonctions importantes du côlon : la réabsorption de l'eau et des électrolytes, et la digestion et l'absorption des produits alimentaires non dégradés au niveau de l'intestin grêle.

Les cellules caliciformes, également appelées cellules à mucus, produisent une grande quantité de mucines (glycoprotéines) protégeant la surface de l'épithélium intestinal. Ces cellules présentent à leur pôle apical de très nombreux grains de mucus exportés à la surface de l'épithélium pour assurer également l'adhérence de la flore intestinale, tout en permettant la lubrification des parois de l'intestin facilitant l'évacuation des fèces.

Les cellules entéro-endocrines secrètent dans la lumière de l'intestin des peptides et des hormones : entéroglucagon, substance P, somatostatine et polypeptide intestinal vasoactif. Ces cellules sont en nombre très faible au niveau du côlon et siègent essentiellement au fond des cryptes. Ces cellules sont reconnaissables en microscopie électronique par leur petite taille, le cytoplasme clair et la présence d'un grand nombre de granules de sécrétion.

1.3 La barrière intestinale – la structure et les acteurs

Le tractus gastro-intestinal représente la plus grande surface d'échange entre l'organisme et le milieu extérieur. Le tube digestif est également la première surface exposée aux aliments mais aussi aux xénobiotiques (substances étrangères au corps humain) auxquels la population humaine est exposée par voie orale dans la vie quotidienne. Cette capacité de tube digestif souligne l'importance de la barrière intestinale, qui possède un double rôle : 1/ de filtre, avec une perméabilité sélective qui permet le passage des nutriments depuis la lumière intestinale jusqu'à la circulation générale et 2/ de barrière, qui prévient la pénétration dans l'organisme des micro-organismes, des virus, des antigènes et des toxines, contenus en grande quantité dans la lumière intestinale.

Les acteurs impliqués dans la fonction de défense et d'homéostasie de la barrière intestinale sont :

- **la barrière digestive** représenté par les mouvements péristaltiques intestinaux qui empêche la rétention et la prolifération des bactéries dans l'intestin ainsi que leurs absorption à travers la muqueuse intestinale (Nieuwenhuijs et al. 1998).

- **la barrière écologique** qui correspond à la flore intestinale normale qui participe à la mise en place et au maintien de la fonction de la barrière intestinale. Les études menées sur des animaux axéniques montrent que la flore commensale est indispensable pour le développement et la différenciation des cellules épithéliales intestinales (Gordon et al. 1997; Hooper and Gordon 2001). La flore intestinale joue également un rôle important dans la maturation de système immunitaire (Helgeland et al. 2004) et empêche les bactéries potentiellement pathogènes de coloniser et d'envahir la muqueuse intestinale (Cebra et al. 1998).
- **la barrière épithéliale** est composée de l'épithélium qui assure le passage sélectif des molécules et des sécrétions des cellules épithéliales telles que le mucus et les peptides antimicrobiens. Le mucus empêche la pénétration, à travers l'épithélium, des micro-organismes, toxines et autre substances nocives présentes dans la lumière intestinale (Katayama et al. 1997). Les peptides antimicrobiens, comme les β -défensines, exprimées tout au long de l'épithélium colique, ont un rôle protecteur grâce à leur effet lithique sur les bactéries (Salzman et al. 2007).
- **la barrière immunologique** est constituée de cellules immunitaires qui sécrètent des immunoglobulines et des cytokines nécessaires à la mise en place des réponses immunitaires contre les micro-organismes potentiellement dangereux, tout en maintenant une tolérance vis-à-vis des bactéries commensales ou des protéines alimentaires (Spahn and Kucharzik 2004).

1.4 La barrière épithéliale

Une barrière épithéliale définit l'interface entre l'environnement et l'organisme, contribuant à l'homéostasie générale. Par exemple, la barrière épithéliale de la peau (épiderme) est la barrière biologique la plus imperméable du corps ; elle prévient des agressions et de l'infection systémique tout en assurant une homéostasie de la température corporelle (Furuse et al. 2002). La barrière épithéliale rénale maintient l'équilibre entre l'interstitium rénal et la lumière stérile tubulaire; elle assure des transports actifs et passifs de solutés afin de maintenir une composition correcte de l'urine (Simon et al. 1999). La barrière épithéliale intestinale a une charge beaucoup plus difficile : elle doit défendre l'organisme contre un environnement hostile, comme la peau, mais également assurer un transport actif et passif, comme le tubule rénal.

1.4.1 La perméabilité intestinale

Le passage de la barrière épithéliale peut être effectué par 2 voies : transcellulaire et paracellulaire. Les molécules liposolubles et les petites molécules hydrosolubles traversent la barrière épithéliale par voie transcellulaire, tandis que le passage des molécules de moyenne et de grande taille se réalise par voie paracellulaire en impliquant les jonctions serrées et l'espace intercellulaire (Figure 2). Les deux voies de transport ne sont pas complètement indépendantes l'une de l'autre, mais en équilibre permanent.

La voie transcellulaire est la principale voie impliquée dans le transport des molécules de petites tailles et les électrolytes. Le passage des solutés est doublé d'un transport paracellulaire, les deux voies contribuant au maintien de l'équilibre osmotique d'une part et d'autre de l'épithélium. Le passage paracellulaire joue aussi un rôle crucial dans le maintien du transport épithélial continu, en prévenant l'apparition d'un gradient électrochimique susceptible d'arrêter le transport transcellulaire. De plus, le passage paracellulaire peut prendre le relais de la voie trans-, et assurer l'absorption lorsque les transporteurs cellulaires sont saturés (Kapus and Szaszi 2006).

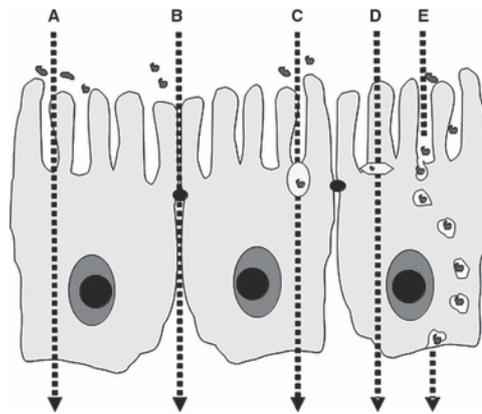


Figure 2: Les voies de transport trans-épithéliales.

A. La voie transcellulaire ; B. La voie paracellulaire ; C. La voie transcellulaire via les aquaporines (pores aqueux à échanges passifs) ; D. Transport actif (nutriments) ; E. Endocytose – transcytose – exocytose (Keita and Soderholm 2010).

Le passage des molécules par **voie transcellulaire** peut être réalisé par diffusion passive *via* les aquaporines (ex. : les molécules hydrophiles de petite taille), par transport actif impliquant des transporteurs (ex. : les aminoacides, vitamines et autres nutriments) ou

par endocytose, transcytose ou exocytose (ex. peptides de grande taille, protéines). Le transport par endocytose- transcytose assure le passage des molécules de grande taille qui ne sont pas capables de traverser l'espace intercellulaire (Keita and Soderholm; 2010).

La **perméabilité paracellulaire** assure le passage des électrolytes et d'eau, mais également le transport sélectif des molécules de grande taille (jusqu'à 10kDa). En condition physiologique, la voie paracellulaire est considérée très peu perméable aux molécules de plus grande taille pour bloquer le passage massif des macromolécules antigéniques. Le passage des molécules par voie paracellulaire est sous le contrôle des jonctions intercellulaires.

Mesure de la perméabilité paracellulaire : La perméabilité paracellulaire peut être établie par la mesure de la résistance transépithéliale ou par l'évaluation du passage de molécules marquées du pôle muqueux au pôle séreux. Ces deux techniques sont complémentaires.

- La **mesure de la résistance transépithéliale** (TER) permet une détection rapide et continue de la perméabilité transépithéliale. La TER résulte de la résistance de la voie transcellulaire corrélée aux résistances de la voie paracellulaire. La résistance transcellulaire est représentée par des résistances en série de la membrane apicale et basolatérale. La résistance paracellulaire est constituée de la résistance au niveau du complexe apical (jonctions serrées) et la résistance de l'espace intercellulaire. Cette dernière étant très faible, est souvent négligée. Tenant compte que les résistances au niveau des membranes sont très élevées, c'est la variation des résistances au niveau des jonctions serrées qui détermine si l'épithélium est lâche ou non. Un épithélium lâche est caractérisé par une TER d'approximativement $100 \Omega \cdot \text{cm}^2$, et un épithélium serré possède une TER supérieure à $100\,000 \Omega \cdot \text{cm}^2$.

La TER varie tout au long du tractus gastro-intestinal, en étant plus faible au niveau de l'intestin grêle, élevée au niveau du côlon et l'antré gastrique et très haute au niveau de l'œsophage et du fundus gastrique. La barrière intestinale au niveau du grêle est lâche pour assurer le transport bidirectionnel des fluides. Par contre au niveau du côlon la TER est élevée pour permettre un passage sélectif de certains électrolytes et d'eau, tout en empêchant le passage accru des antigènes bactériens et toxines. Le désavantage de cette technique est qu'elle fournit des informations seulement concernant le passage des particules chargées et ne peut être utilisée pour des mesures *in vivo*.

▪ La deuxième méthode consiste à suivre **la perméabilité à des macromolécules**, capables essentiellement d'un passage paracellulaire, comme le mannitol, l'inuline, le Dextran 4kD ou l'EDTA marqués par des fluorochromes ou des isotopes radioactifs (^{51}Cr). Cette mesure peut être effectuée tant *in vivo* que *in vitro*.

La **mesure *in vivo*** consiste à mesurer le passage à travers la paroi intestinale d'un marqueur administré par voie orale. Le désavantage est que les résultats peuvent être influencés par des nombreux facteurs comme la vidange gastrique, le transit intestinal et la clearance rénale (pour le dosage dans les urines). En revanche, l'avantage de cette technique est qu'elle peut être utilisée dans les tests cliniques pour déterminer la perméabilité intestinale chez les patients et pour diagnostiquer certaines pathologies accompagnées de syndrome d'hyperperméabilité intestinale. Le bon choix du marqueur est un facteur très important à prendre en compte. Le marqueur idéal doit être hydrophile, inerte, non toxique, non métabolisé ou produit par l'organisme, doit être excrété rapidement dans les urines et dosable facilement. Les marqueurs classiquement utilisés sont divisés en trois groupes :

- les sucres – mannitol, rhamnose, lactulose, cellobiose, inuline
- les isotopes – ^{51}Cr -EDTA, dextran-FITC (fluoro-isothiocyanate)
- polyéthylène glycols (PEG- 400 et PEG -1000)

Les polyéthylène-glycols et les isotopes ne sont ni métabolisés ni produits par l'organisme. Le désavantage des sucres est qu'ils sont dégradés par les bactéries au niveau de l'intestin et induisent la libération endogène de créatinine.

L'évaluation de la perméabilité intestinale est effectuée de manière indirecte par le dosage du marqueur dans les urines collectées pendant 6 ou 24 heures après l'ingestion. Chez l'animal de laboratoire, le dosage du marqueur (ex. dextran-FITC) peut être effectué après 4 heures dans le plasma (Giannone et al. 2006; Laukoetter et al. 2007).

La **mesure *in vitro*** de la perméabilité intestinale est effectuée sur des segments d'intestin isolé ou sur des cellules intestinales en culture (entérocytes ou colonocytes). Parmi ses avantages, cette technique permet de mesurer la perméabilité dans la région d'intérêt, tant en excluant l'influence de certains facteurs comme la motilité intestinale, la présence de certains peptides ou neurotransmetteurs libérés dans la lumière intestinale, ou

par les cellules immunitaires présentes dans le tissu (état basal). Les techniques utilisées sont :

- segment intestinal éversé – permet d'estimer la fonction d'absorption et de sécrétion, offre la possibilité de simuler l'irrigation sanguine mésentérique.
- chambres de Ussing – permettent de mesurer le passage du pôle apical (muqueuse) vers le pôle basolatéral (séreuse) d'une molécule marquée sur une surface et un segment donné. Cette technique permet de caractériser également les canaux Na^+ , Cl^- et K^+ à l'aide d'une stratégie qui combine l'enregistrement par *patch-clamp* de l'activité d'un canal unique et simultanément l'enregistrement des conductances membranaires macroscopiques, les activités ioniques intracellulaires et la mesure du courant au travers d'*epithelia* montés en chambres de Ussing.
- Patch-clamp - permet de détecter les courants ioniques traversant un canal individuel.

1.4.2 Les jonctions intercellulaires

Les cellules épithéliales interagissent fortement entre elles par l'intermédiaire de plusieurs complexes de jonctions intercellulaires, l'ensemble constituant la véritable frontière entre la lumière intestinale et le milieu intérieur. Celles-ci permettent de maintenir une cohérence mécanique et chimique, tout en favorisant la communication entre les cellules. Il existe quatre types de jonctions intercellulaires (Figure 3) :

- **Jonctions serrées** (*tight junctions*) – assurent l'étanchéité des *epithelia* entre deux compartiments tissulaires. Elles jouent un rôle fondamental dans le maintien de la fonction de filtre sélectif de l'épithélium.
- **Jonctions intermédiaires** (*adherens junctions*) – jouent un rôle important dans la cohésion des tissus épithéliaux.
- **Desmosomes** – assurent la solidité mécanique et la répartition des forces dans les épithéliums.
- **Jonctions communicantes** (*Gap junctions*) – permettent la communication entre le cytoplasme de deux cellules voisines et assurent un couplage électrique.

Dans ce manuscrit, nous nous focaliserons essentiellement sur la structure et la fonction des jonctions serrées.

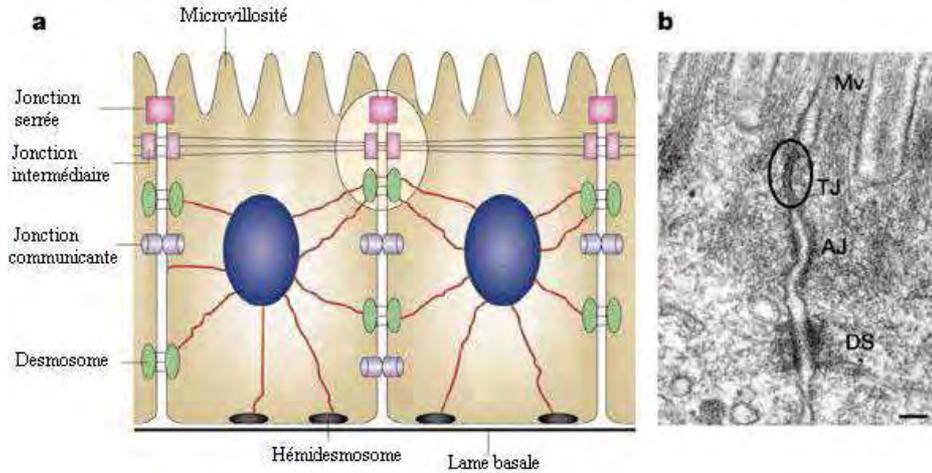


Figure 3: a. Représentation schématique des cellules épithéliales et des jonctions intercellulaires.

b. Image de microscopie électronique des cellules épithéliales intestinales.

La jonction serrée est cerclée. (Mv, microvili ; TJ, jonctions serrées ; AJ, jonctions intermédiaires ; DS, desmosomes). (Tsukita et al. 2001)

1.4.3 Les jonctions serrées

Les jonctions serrées délimitent une bande circonférentielle au pôle apical des cellules épithéliales. Elles marquent ainsi une frontière entre la membrane apicale et la membrane basolatérale de ces mêmes cellules (Figure 4 I). Au plan moléculaire, les jonctions serrées sont composées de protéines transmembranaires (occludine, claudines et JAM-A, *Junctional Adhesion Molecule*) auxquelles se fixent les protéines intracellulaires (ZO, *Zonula Occludens*), ces dernières assurant la liaison avec les protéines du cytosquelette (les filaments d'actine).

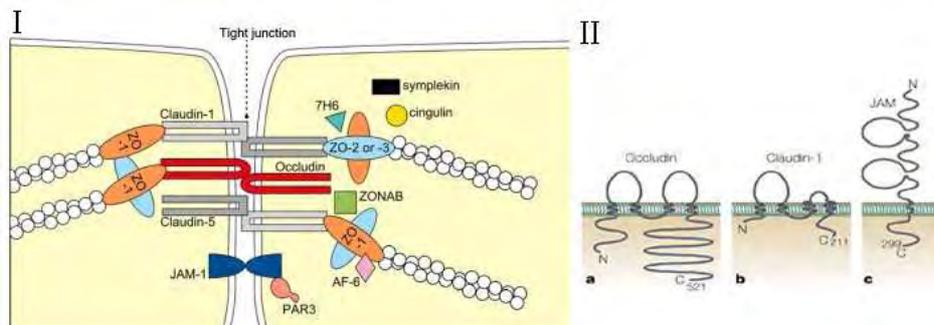


Figure 4: I / Structure moléculaire des jonctions serrées et II / des protéines de jonction – occludine, claudine et JAM-A.

Les protéines transmembranaires de jonctions serrées

L'**occludine** est la première protéine transmembranaire identifiée (Furuse et al. 1993). L'occludine est une protéine de 65 kDa avec quatre domaines transmembranaires qui forment deux boucles extracellulaires et deux domaines terminaux cytoplasmiques N-terminal plus court et carboxy-terminal (figure 4 II). Ce dernier domaine est nécessaire pour l'assemblage et le fonctionnement correct des jonctions serrées. Il existe deux isoformes qui résultent d'un épissage alternatif de son ARN messenger. La première isoforme est privée du quatrième domaine transmembranaire et de la région adjacente C-terminale (TM4⁻). Cette isoforme est présente dans toutes les cellules épithéliales humaines et possède un poids moléculaire de 58kDa (Ghassemifar et al. 2002). Les auteurs suggèrent que cette isoforme pourrait jouer un rôle dans l'adhésion intercellulaire. La deuxième isoforme (Occludine 1B) possédant une région N-terminale plus longue a été mise en évidence dans la lignée cellulaire humaine colique T84 et dans l'intestin murin (Muresan et al. 2000). La co-expression de l'occludine et de l'occludine 1B a été observée dans des nombreux tissus épithéliaux, suggérant un rôle pour ce binôme dans la modulation de la fonction de la barrière épithéliale.

L'occludine est une des protéines clé des jonctions serrées qui participe à l'adhésion cellulaire et au passage sélectif des molécules entre le pôle apical et basolatéral. La surexpression d'occludine induit l'augmentation de la TER dans des cellules épithéliales rénales MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) (Balda et al. 1996). En plus, des études sur des fibroblastes transfectés avec l'occludine soulignent son importance dans la formation même des jonctions serrées (Furuse et al. 1998). En pathologie, la perturbation de la barrière épithéliale intestinale observée chez les patients atteints de Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI – la Maladie de Crohn et la Rectocolite Hémorragique) est associée à une diminution considérable de l'expression d'occludine (Gassler et al. 2001). Malgré ces observations, la fonction exacte de l'occludine reste parfois contestable étant donné que les souris déficientes (KO) pour cette protéine ne présentent pas d'altérations de la barrière intestinale. Cependant chez ces souris des modifications sont observées dans la muqueuse gastrique, traduites par des problèmes de différenciation cellulaire, la perte des cellules pariétales et l'hyperplasie des cellules à mucus, ce qui suggère un rôle dans la différenciation cellulaire (Schulzke et al. 2005).

La fonction de l'occludine est régulée principalement par la phosphorylation des résidus sérine/thréonine situés sur les boucles extracellulaires. Cependant la fonction de

cette protéine est également sous le contrôle de différents facteurs exogènes ou endogènes, comme la microflore ou les enzymes digestives sécrétées dans la lumière.

Les claudines présentent quatre domaines transmembranaires, deux boucles extracellulaires et deux régions terminales intracellulaires (figure 4 II) (Furuse et al. 1998). La famille des claudines est constituée de 24 protéines avec un poids moléculaire qui varie de 20 à 34 kDa. Ces protéines sont exprimées dans les tissus épithéliaux et endothéliaux tout au long du développement et de la vie adulte. Plusieurs types de claudines peuvent être exprimés dans un même tissu. Certaines claudines sont capables de renforcer la barrière épithéliale, d'autre participent à la formation de pores qui permettent une diffusion sélective des ions et des molécules à travers l'espace paracellulaire, ou de tout autre type de transports encore méconnus. Pour cette raison, certains auteurs ont divisé l'ensemble des claudines en trois groupes par rapport à leur fonction : 1/ celles qui participent au renforcement de la barrière (formatrice de la barrière) ; 2/ celles qui forment des pores et 3/ les claudines présentant des fonctions ambiguës (Amasheh et al. 2010).

1. Les *claudines formatrices de la barrière* (les claudines -1, -3, -4, -5, -8, -11, -14 et -19) renforcent la barrière épithéliale et de fait sont responsables de la diminution de la perméabilité paracellulaire (Will et al. 2008). Des études sur des souris KO pour les claudines ou sur des lignées cellulaires ont montré leur importance dans le transport d'eau dans l'épiderme mais également dans l'épithélium intestinal (Claudine-1) (Furuse et al. 2002), le passage des cations et également d'ammonium et d'ions bicarbonates (Claudin-3, -4, -8) (Van Itallie et al. 2001). La transfection de la lignée épithéliale colique Caco-2 avec la claudine-5 induit un resserrement de la barrière épithéliale (Amasheh et al. 2005).

Les *claudines formatrices des pores* (les claudines -2, -10) augmentent la perméabilité intestinale de manière charge - sélective. La claudine-2 forme des pores paracellulaires qui assurent une perméabilité sélective pour les cations de petites tailles, mais qui est pratiquement imperméable pour tous les anions et solutés neutres (Amasheh et al. 2002). De plus, il a été montré que la claudine-2 forme des pores paracellulaires capables de moduler le transport hydrique dans une barrière épithéliale lâche (Rosenthal et al. 2010).

Les *claudines avec des fonctions ambiguës* (les claudines -7, -12, -15, -16) possèdent une fonction tissu-dépendante. Par exemple la claudine-7 augmente la perméabilité paracellulaire pour les cations, mais la diminue pour les anions (Alexandre et

al. 2005). Les souris déficientes en claudine-15 présentent une hyperprolifération cellulaire au niveau de cryptes intestinales, suggérant un rôle dans la morphogénèse de l'intestin (Tamura et al. 2008).

Les claudines détectées dans l'intestin de rats sont les claudines -1, -2, -3, -4, -5, -7, -8, et -12 (Rahner et al. 2001; Markov et al. 2010). Les études sur des biopsies humaines de l'intestin montrent la présence des claudines -1, -2, -3, -4, -5, -7, et -8 dans le côlon (Zeissig et al. 2007). L'expression des claudines se corrèle avec les caractéristiques de la barrière épithéliale le long de l'intestin, autrement dit une forte expression de claudines formatrices de la barrière au niveau du l'épithélium colique (claudine-1, -3, -4,-5, et -8) où une plus grande étanchéité est requise (Markov et al. 2010).

La molécule d'adhésion jonctionnelle-A (JAM-A) fait partie de la superfamille des immunoglobulines. La famille de JAM est constituée de 5 membres : JAM-A, JAM-B, JAM-C, JAM-4 et JAM-like. Tous les membres sont situés à l'espace intercellulaire des cellules endothéliales et épithéliales, et *via* des interactions homophiliques participent dans assemblage et la maintenance de jonctions. Les JAM sont des protéines transmembranaires constituées d'un peptide signal N-terminal, d'un domaine extracellulaire, d'un domaine unique intra-membranaire et d'une courte queue cytoplasmique (40 acides aminés pour JAM - A) (figure 4 II).

JAM-A est la première protéine de la famille JAM identifiée. JAM-A participe à la formation des jonctions serrées des cellules épithéliales et endothéliales, mais également est exprimée dans les thrombocytes, monocytes, lymphocytes, neutrophiles, cellules dendritiques et dans les spermatozoïdes. JAM-A est également capable de former des liaisons hétérophiles avec d'autres protéines d'adhésion, comme les intégrines afin de participer à la transmigration des leucocytes (vers le foyer inflammatoire) et à l'agrégation plaquettaire. Des études récentes ont montré que la protéine JAM-A jouait un rôle fondamental dans le maintien de l'intégrité de la barrière intestinale (Laukoetter et al. 2007; Vetrano et al. 2008; Vetrano and Danese 2009). Laukoetter et collaborateurs ont observé que les souris KO pour JAM-A présentaient un défaut de la barrière intestinale traduit par une augmentation de la perméabilité paracellulaire colique, une surexpression des claudines formatrices des pores (les claudines -10, -15) ainsi qu'une infiltration neutrophilaire massive et une prolifération cellulaire accrue rendant l'intestin plus susceptible à une inflammation (Laukoetter et al. 2007). De plus, la déplétion de la

protéine JAM-A chez les souris s'accompagne également d'une surproduction des cytokines proinflammatoires, *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF α) et interféron γ (IFN γ) (Vetrano et al. 2008). L'importance de JAM-A dans la fonction de la barrière intestinale a été mise en évidence également sur des biopsies humaines de côlon (Vetrano et al. 2008). La diminution d'expression de JAM-A observée chez les patients atteints de MICI induit un relâchement de la barrière épithéliale qui participe à l'augmentation de la perméabilité intestinale.

L'interface entre les protéines transmembranaires et les composantes cytoplasmique est formée par un échafaudage protéique reposant sur de multiples domaines PDZ. Ces domaines sont des modules se liant aux protéines qui reconnaissent une séquence cible à l'extrémité carboxy-terminale des protéines transmembranaire. Les protéines PDZ des jonctions serrées incluent les protéines de la famille ZO : ZO-1, ZO-2 et ZO-3.

Les protéines cytoplasmiques de jonctions serrées : la famille des zonula occludens (ZO). Les protéines ZO-1, ZO-2 et ZO-3 sont membres de la famille de MAGUK (*Membrane Associated Guanylate Kinase Homologs*) possédant un domaine de liaison aux protéines de jonctions adhérentes et serrées ainsi qu'au cytosquelette d'actine. La structure des protéines ZO se caractérise par 3 domaines PDZ (*PDS 95 : Post Synaptic Density 95, Dig : disc large, ZO*), un domaine SH-3 (*sequence homology 3*) et un domaine GUK (*guanylate kinase-like*). Le domaine PDZ se lie à des séquences de quatre acides aminés se terminant par une valine. A l'exception de la claudine 12, toutes les claudines possèdent au niveau de leur extrémité carboxy-terminale une séquence valine et peuvent se lier au domaine PDZ présent sur les protéines ZO (Furuse et al. 1994; Morita et al. 1999). Ainsi, ZO-1, ZO-2 et ZO-3 se lient directement aux claudines par l'intermédiaire de leur domaine PDZ1. Elles se lient également à l'occludine, mais ni leur domaine GUK, ni leur domaine PDZ ne sont impliqués dans cette interaction (Furuse et al. 1994; Fanning et al. 1998; Itoh et al. 1999). Les ZO sont recrutées au niveau des jonctions serrées chez des souris déficientes pour le gène codant pour l'occludine suggérant que la liaison avec l'occludine n'est pas essentielle pour leur localisation péri-jonctionnelle (Itoh et al. 1999; Ebnet et al. 2000; Saitou et al. 2000). Les JAM concentrées en périphérie des plages jonctionnelles peuvent également se lier aux protéines ZO (Bazzoni et al. 2000; Ebnet et al. 2000) et à d'autres molécules possédant un domaine PDZ. Comme les filaments d'actine se lient à la portion C-terminale de ZO-1 et de ZO-2, ce complexe permet de relier le

cytosquelette aux jonctions serrées, cette interaction à un rôle prépondérant dans la régulation des jonctions serrées.

1.5 La barrière immunologique

Tous les acteurs de la barrière épithéliale restent à eux seuls insuffisants pour s'opposer au passage de bactéries et de leurs toxines. Même en situation physiologique, quelques bactéries réussissent à pénétrer l'épithélium et à coloniser la *lamina propria*. À ce niveau, une ultime barrière représentée par les tissus lymphoïdes s'oppose à la diffusion des bactéries et de leurs toxines dans l'organisme. Le tissu lymphoïde associé à la muqueuse digestive est appelé GALT (*Gut-Associated Lymphoid Tissue*). Le GALT peut-être divisé en sites inducteurs et effecteurs diffus, incluant la *lamina propria* et les lymphocytes intra-épithéliaux, et des structures plus organisées comme les ganglions lymphatiques mésentériques, les plaques de Peyer, les follicules lymphoïdes isolés et les plaques des cryptes (Figure 5). Le GALT est le plus grand organe de l'immunité, à lui seul il contient plus de 80% des cellules immunitaires de l'organisme.

1.5.1 Les organes de l'immunité de l'intestin

Les **crypto-plaques** (CPs) sont des structures peu organisées situées à la base des cryptes épithéliales. Les CPs sont essentiellement composées de cellules souches lymphohématopoïétiques, de cellules dendritiques et de cellules stromales. Les lymphocytes T et les lymphocytes B matures sont quasiment absents et ne représentent qu'une population mineure (<2%) des CPs. Les CPs sont des organes lymphoïdes secondaires indispensables à la génération des populations de lymphocytes intra-épithéliaux (Pabst et al. 2005).

Les **lymphocytes isolés** sont très largement distribués dans la *lamina propria* tout le long du tractus intestinal et peuvent être de type B ou T. Les lymphocytes B forment une population essentiellement représentée par les plasmocytes qui sécrètent les immunoglobulines (IgA, IgM et IgG). Les lymphocytes T forment une population hétérogène comprenant une minorité de lymphocytes CD4+ (lymphocytes auxiliaires ou helper) et une population majeure de lymphocytes CD3+/CD8+ (lymphocytes cytotoxiques

suppresseurs) localisés au niveau de l'épithélium et également nommés **lymphocytes intra-épithéliaux**.

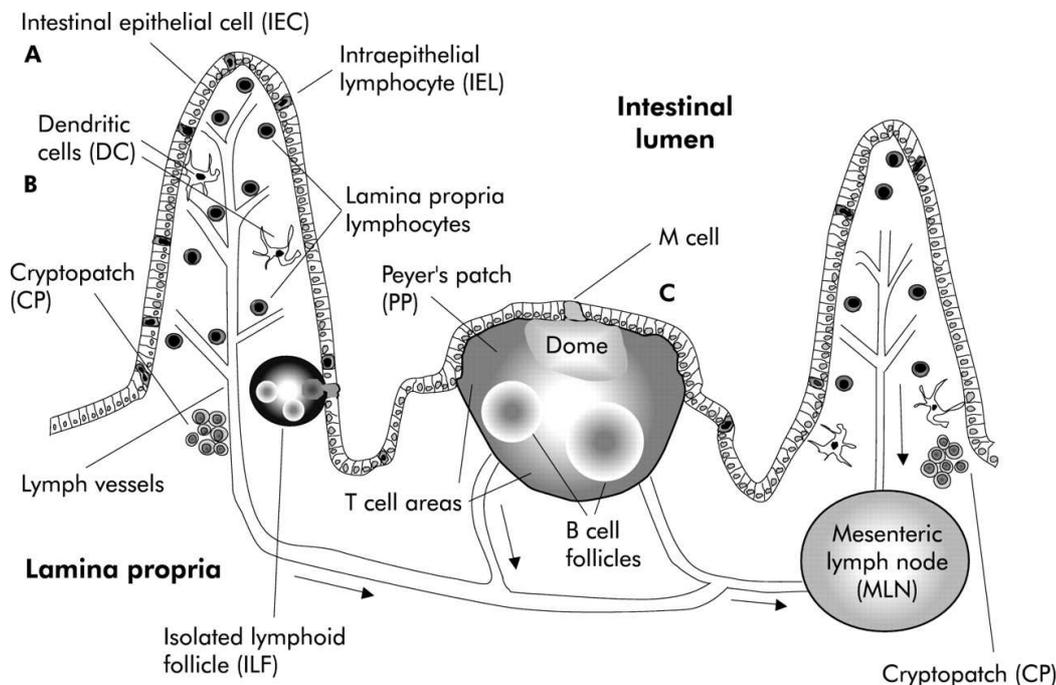


Figure 5: Représentation schématique des éléments lymphoïdes du GALT

CP : crypto-plaques; *IEL* : lymphocytes intra-épithéliaux; *PP* : plaques de Peyer; *MLN* : ganglions lymphatiques mésentériques; *ILF* : follicules lymphoïdes. Les antigènes de la lumière intestinale sont captés par 4 voies principales : directement par les entérocytes : IEC (A), par les cellules dendritiques : DC (B), par les cellules M (C) ou par une voie paracellulaire non représentée sur le schéma (D). (Spahn and Kucharzik 2004).

Les **plaques de Peyer** représentent le principal site d'induction des réactions immunitaires intestinales et joue un rôle prépondérant dans le maintien de la tolérance immunitaire vis-à-vis des antigènes de la lumière intestinale. Ce sont des agrégats de follicules lymphoïdes répartis dans la *lamina propria* de l'intestin grêle et présentant une structure équivalente à celle des ganglions lymphatiques périphériques. Les plaques de Peyer sont organisées en trois zones fonctionnellement spécialisées :

- Le **dôme** est recouvert d'un épithélium spécialisé formé d'entérocytes entre lesquels s'intercalent des cellules à micro puits ou **cellules M**. Les cellules M sont beaucoup moins grandes que les entérocytes, elles n'ont pas de glycocalyx et ne

sécrètent pas de mucus ; elles sont donc particulièrement adaptées à une interaction directe avec les microorganismes et autres antigènes de la lumière intestinale.

- La **zone inter-folliculaire**, ou zone T dépendante, est le site privilégié de prolifération des lymphocytes T CD4+ et CD8+ mais également des macrophages.
- Le **follicule lymphoïde** est composé d'un centre germinatif très riche en lymphocytes B et contient également des lymphocytes T auxiliaires.

Les **follicules lymphoïdes isolés** sont anatomiquement comparables aux follicules lymphoïdes des plaques de Peyer, ils sont présents aussi bien dans l'intestin grêle que dans le côlon. Les follicules lymphoïdes jouent les mêmes fonctions que les plaques de Peyer.

1.5.2 Les cellules de l'immunité

Les lymphocytes

Fonctionnellement, on distingue les lymphocytes B, impliqués dans les réponses immunitaires humorales, et les lymphocytes T, responsables de l'immunité cellulaire. Ces deux lignées cellulaires sont caractérisées par une différenciation cellulaire en deux phases :

- la phase centrale - est irréversible et faiblement dépendante de l'environnement en général. Elle a lieu dans le thymus pour les lymphocytes T et dans la moelle osseuse pour les lymphocytes B et aboutit à l'expression membranaire d'un récepteur pour l'antigène (TcR pour les lymphocytes T, ou BcR pour les lymphocytes B).
- la phase périphérique – a lieu dans les organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions lymphatiques, amygdales, tissu lymphoïde diffus : plaques de Peyer) ou migrent les lymphocytes après leur maturation. Cette phase dépend d'un signal induit par l'interaction du TcR avec un peptide associé à une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité et du BcR avec l'épitope de l'antigène.

Les lymphocytes T

Les lymphocytes T sont à la base des réponses cellulaires du système immunitaire adaptatif, mais interviennent également dans la régulation de la fonction des cellules B. Les lymphocytes T sont classés en trois types de population par rapport à la présence des

déterminants de surface, à caractère antigénique et récepteur. Ces molécules jouent un rôle essentiel et coopératif dans les processus de reconnaissance de l'antigène.

1. **Lymphocytes T cytotoxiques** (CD8+) - détruisent les cellules tumorales et les cellules hôtes infectées par des pathogènes intracellulaires.
2. **Lymphocytes T suppresseurs** (CD8+) - ont pour rôle d'inhiber les réponses des lymphocytes B et T.
3. **Lymphocytes T auxiliaire** (T helper) (CD4+) - produisent des cytokines ou lymphokines, et stimulent la prolifération et la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes producteurs d'anticorps.

La balance Th1/Th2

L'activation des cellules T CD4⁺ peut conduire à différentes sous-populations T CD4⁺ effectrices, dont les cellules T CD4⁺ de type Th1 ou de type Th2, définies par leur profil de cytokines et pouvant mutuellement se réguler. Ainsi les lymphocytes Th1, producteurs de cytokines pro-inflammatoires (IL-12, IFN- γ) sont impliqués dans l'immunité à médiation cellulaire et diminuent, *via* l'IFN- γ , l'expansion des lymphocytes Th2 et/ou leur production de cytokines (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 et IL-13) qui favorise la réponse humorale. L'IL-4 et l'IL-10 produites par les Th2 sont, en retour, capables d'inhiber la réponse immunitaire à médiation cellulaire et l'expansion des lymphocytes de type Th1.

L'orientation des réponses immunitaires est sous le contrôle d'un équilibre entre les voies Th1 et Th2 et un déséquilibre vers l'une de ces deux voies est donc susceptible d'affecter le développement de la réponse immunitaire protectrice.

Les lymphocytes B

La différenciation des cellules B matures nécessite un signal délivré par l'antigène grâce à l'interaction d'une cellule interdigitée et d'un lymphocyte T CD4⁺. Cette interaction entraîne l'activation du lymphocyte B et sa différenciation finale en plasmocyte sécrétant dans un premier temps des IgM, puis ensuite des IgG, IgA ou IgE (phénomène de commutation). Tous les lymphocytes B stimulés par l'antigène ne se transforment pas en plasmocytes sécrétants, mais certains deviennent, après commutation, des cellules B mémoires à IgG, IgA ou IgE de surface. Les immunoglobulines ainsi sécrétées permettent

l'élimination d'agents étrangers par des réactions d'agglutination ou par lyse avec le concours du complément.

Les cellules dendritiques sont issues des cellules souches de la moelle osseuse et jouent un rôle primordial dans la mise en place et la régulation des réponses immunitaires faces à des antigènes. Les cellules dendritiques immatures sont retrouvées au niveau de tissus périphérique ou elles sont en renouvellement permanent à partir des précurseurs issus de la moelle osseuse. La maturation et la migration des cellules dendritiques sont assurées par des signaux issus du drainage lymphatique, telle que les produits microbiens ou certaines cytokines. Les cellules dendritiques matures contrôlent la prolifération des lymphocytes T, mais également la différenciation et la polarisation de la réponse immunitaire (Grewal and Flavell 1998). Ainsi, les cellules dendritiques produisent différents types d'interleukines comme IL-12, IL-18, IFN γ ou IL-23 orientant ainsi la réponse vers un profil de type Th1, ou alors produire de IL-4 et de IL-10 orientant vers un profil de type Th2 (Coombes and Powrie 2008).

Les cellules dendritiques sont présentes au niveau des plaques de Peyer, des ganglions lymphatiques mésentériques, de la *lamina propria*, des follicules lymphoïdes associés à l'épithélium et certainement au niveau de l'épithélium intestinal. Elles sont décrites pour jouer un rôle primordial dans la régulation des différentes fonctions du système immunitaire intestinal : la tolérance aux antigènes alimentaires et de la flore commensale, ainsi que la régulation de l'inflammation intestinale. Les prolongements des cellules dendritiques possèdent la capacité de traverser l'épithélium intestinal par les jonctions serrées pour capter les bactéries lumineales. Ce processus s'accompagne d'une stimulation de la synthèse protéique d'occludine et ZO-1 et le maintien de l'étanchéité de l'épithélium (Rescigno et al. 2001).

Les polynucléaires ou granulocytes sont divisés en trois classes sur la base de l'apparence histologique de leurs granules après coloration : les neutrophiles, les éosinophiles et les basophiles. Le recrutement des neutrophiles au niveau du site inflammatoire représente la première ligne de défense de l'hôte en cas d'infection. Les neutrophiles sont de puissants phagocytes, ils représentent 50 à 75% des leucocytes du sang. Sous l'influence de facteurs chimiotactiques variés, les neutrophiles marginés

migrent jusqu'au foyer inflammatoire, où, grâce à des récepteurs membranaires spécifiques, ils vont fixer et phagocyter les particules étrangères opsonisées (C3 et IgG).

Le pouvoir lytique des neutrophiles vis-à-vis des microorganismes pathogènes est lié à la présence dans leurs granules sécrétoires de nombreuses enzymes dont certaines participent à la dégradation de la particule phagocytée, alors que d'autres génèrent des radicaux libres oxygénés toxiques pour de nombreux pathogènes (bactéries, virus, parasites). À tout cela s'ajoute un assortiment de substances antimicrobiennes et un pool important de récepteurs cytoplasmiques membranaires.

Les macrophages sont des cellules qui proviennent des monocytes circulants qui se sont infiltrés dans les tissus. Le tractus gastro-intestinal contient le plus large réservoir de macrophages de l'organisme. Les macrophages contribuent à l'homéostasie tissulaire en retirant les cellules mortes et les autres débris. Les macrophages intestinaux résidant possèdent un phénotype différent des monocytes circulants. En fait, en condition non-inflammatoire les macrophages intestinaux résidants expriment très faiblement le récepteur CD14, un récepteur permettant la détection de bactéries Gram-négative (Smith et al. 2005; Rescigno et al. 2008). Ceci permet de contrôler la tolérance immunitaire requise dans ce tissu important, riche en flore bactérienne inoffensive. Localisé dans *lamina propria* à proximité des bactéries du lumen intestinal et des stimuli antigéniques, les macrophages intestinaux jouent un rôle important dans la défense de l'hôte par la reconnaissance, la phagocytose et la destruction des bactéries pathogènes (Platt and Mowat 2008). Après la digestion du pathogène le macrophage peut se comporter comme une cellule présentatrice d'antigène et qu'induit l'activation de lymphocytes Th1 ou Th2.

Les mastocytes sont des cellules produites dans la moelle osseuse à partir des cellules souches pluripotentes. Ils expriment très précocement des récepteurs membranaires pour les immunoglobulines de haute affinité tels que les récepteurs Fc γ RI, Fc γ RII/III, avant même la maturation de leurs granules sécrétoires. Leur croissance et leur différenciation sont sous l'influence de diverses cytokines telles que l'IL-3, le Stem Cell Factor, l'IL-4, IL-9, IL-10 et le NGF (*Nerve Growth Factor*) (Metcalf et al. 1997). Dans les conditions normales, les mastocytes sont localisés au niveau des tissus en contact étroit avec les organismes pathogènes (la peau, les poumons, le tractus uro-génital et le tractus gastro-intestinal). A ce niveau, les mastocytes sont le plus souvent retrouvés agrégés autour

des nerfs, des vaisseaux sanguins et des vaisseaux lymphatiques, et constituent ainsi une importante première ligne de défense contre les pathogènes.

Les mastocytes possèdent des granules sécrétoires qui libèrent leur contenu suite à leur activation. Les mastocytes peuvent sécréter une large variété de médiateurs : des médiateurs préformés associés aux granules sécrétoires (histamine, sérotonine, TNF α , facteurs chimiotactiques hydrolases et tryptase) et des médiateurs néo-formés comme certains métabolites de l'acide arachidonique et des cytokines.

CHAPITRE II

LES OESTROGENES - DE LA SYNTHÈSE A LEUR FONCTION

2.1 La synthèse et le métabolisme des œstrogènes

La synthèse des œstrogènes commence à partir du précurseur commun pour toutes les hormones stéroïdes, le cholestérol. Les besoins de la cellule en cholestérol stéroïdogène sont assurés par les esters du cholestérol véhiculés par les lipoprotéines de basse densité (LDL). Les étapes de la synthèse stéroïdienne se situent dans les mitochondries et le réticulum endoplasmique. La première étape de la stéroïdogénèse est la production de pregnénolone à partir du cholestérol, une réaction catalysée par le cytochrome P450_{sc} (*side chain cleavage*, coupure de la chaîne latérale) (Figure 6). La pregnénolone est alors modifiée par différentes étapes enzymatiques :

- conversion en progestérone par le complexe enzymatique 3 β -hydroxystéroïde oxydoréductase- $\Delta^{4,5}$ - isomérase
- alternativement, hydroxylation en position 17 α , sous l'action catalytique de la 17 α -hydroxylase (17 α OH) produisant la 17 α -hydroxypregnénolone.
- Le cytochrome P450₁₇ (17-20 desmolase) assure la coupure de la chaîne latérale de la 17 α -hydroxypregnénolone et la conversion en déhydroépiandrostérone (DHEA).

A son tour le DHEA est converti par le complexe enzymatique 3 β -OH-déshydrogénase en androsténone et ce dernier est transformé en testostérone sous l'action de la 17 β -OH-déshydrogénase. La testostérone est ensuite aromatisée en œstradiol par le cytochrome P450_{aro} (aromatase).

Alternativement, le DHEA peut être converti par la 17 β -OH-déshydrogénase en androsténone et par la suite transformé en testostérone.

Chez les primates, les surrénales sécrètent des quantités importantes de DHEA et son métabolite sulfate (DHEA-S). Ces stéroïdes servent de précurseurs aux androgènes et œstrogènes dans les tissus périphériques.

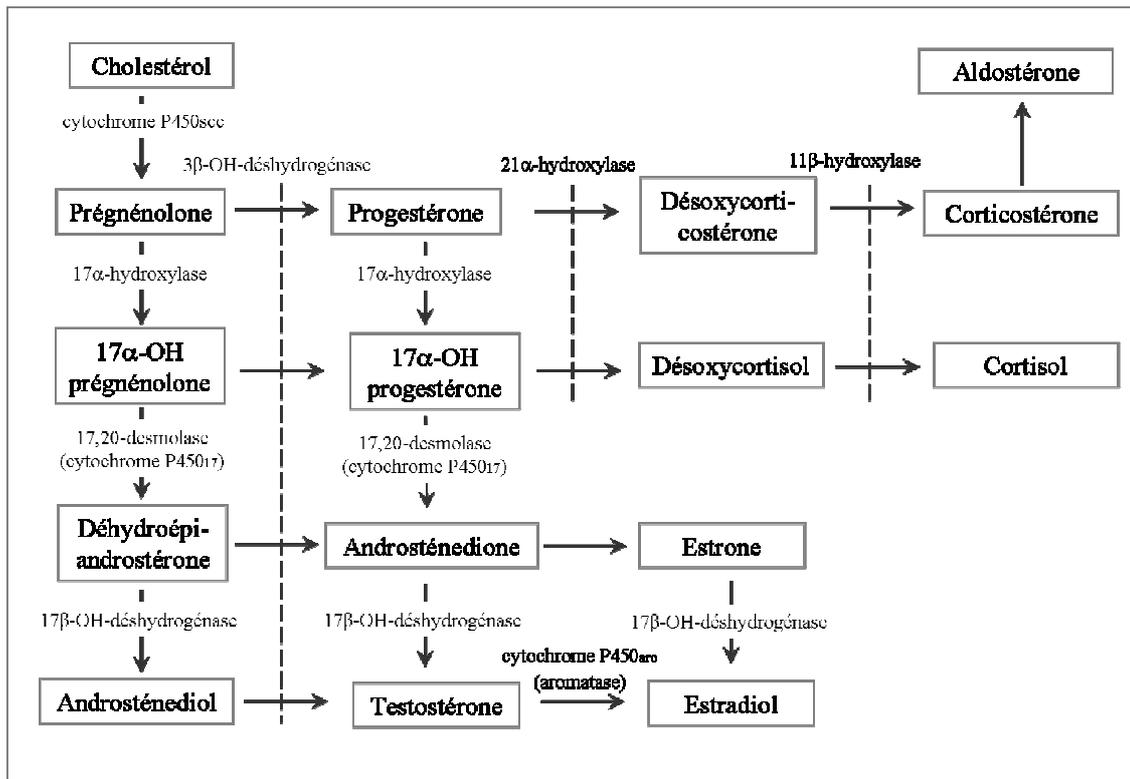


Figure 6: Voies principales de biosynthèse des œstrogènes

Les principales hormones produites dans les testicules sont la testostérone et l'androsténone, bien que la production de l'œstradiol par les cellules Leydig est aussi bien connue (Hess 2003).

Chez la femme, les ovaires produisent des œstrogènes et des androgènes. Après l'activation par l'hormone lutéinisante (LH) des cellules thécales, qui expriment de hauts niveaux cytochrome P450₁₇, les ovaires transforment le cholestérol en testostérone. Après stimulation par l'hormone folliculo-stimulante (FSH), la testostérone est ensuite aromatisée en œstradiol dans les cellules de la granulosa des follicules en croissance. Après l'expulsion de l'ovocyte de l'ovaire, le follicule devient corps jaune (*corpus luteum*) et produit de la progestérone. De faibles quantités d'œstrogènes sont également produites par les glandes surrénales. Au cours de la grossesse, des quantités importantes d'œstrogènes sont formées dans le placenta. En période de post-ménopause, la production considérablement réduite d'œstrogènes est partiellement compensée par la conversion de l'androsténone dans les tissus non ovariens (surrénales, foie, tissus adipeux, muscles squelettiques, reins et cerveau) (Lievertz 1987).

2.2 Les récepteurs aux œstrogènes

Depuis les années 1950, l'implication de l'œstradiol dans la croissance des organes génitaux et la physiologie de la reproduction chez la femme est bien connue. Par contre, les processus biochimiques mis en jeu ont été identifiés beaucoup plus tard. Dans les années 1960, Jensen et Jacobson ont démontré que l'œstradiol ne subit pas de modification chimique et qu'il était retenu au niveau des tissus du tractus génital chez la rate (Jensen and Jacobson 1962). Ces résultats ont permis à Jensen d'envisager l'existence d'une molécule fixant l'œstradiol dans ces organes, qu'il a appelé récepteur aux oestrogènes (ER). L'équipe du Pr. Chambon en 1985 a séquencé pour la première fois l'ADNc du récepteur aux oestrogènes à partir de cellules épithéliales mammaires cancéreuses de la lignée MCF-7, aujourd'hui appelé ER α (Walter et al. 1985). La découverte en 1996 d'un second récepteur dans la prostate du rat, noté ER β (Kuiper et al. 1996), a permis de rendre compte d'une action des oestrogènes dans d'autres tissus considérés auparavant comme «non sensibles aux oestrogènes».

2.2.1 Structure des récepteurs nucléaires aux oestrogènes

A présent, il est bien connu que les oestrogènes jouent un rôle important dans la régulation de différents processus physiologiques tels que la croissance et la différenciation cellulaire, tout en assurant le contrôle de la fonction de reproduction, le développement du système nerveux central, l'homéostasie du squelette, du système cardio-vasculaire et du tractus gastro-intestinal. Les effets des oestrogènes sur les tissus cibles sont déterminés par différents facteurs : le type de ER exprimé (ER α et/ou β); la balance entre les co-répresseurs et les co-activateurs; la conformation adoptée par le récepteur après la fixation du ligand; l'interaction du complexe récepteur - ligand avec le promoteur des gènes cibles (*estrogen responsive element* ou ERE).

Les deux types de récepteurs, ER α et ER β , font partie de la superfamille des récepteurs nucléaires. Ils possèdent une organisation modulaire commune: une région N-terminale (domaine A/B) hautement variable en taille et en homologie de séquences, un domaine de fixation à l'ADN hautement conservé – C, une région charnière – D, un domaine de fixation du ligand – E, et le domaine C-terminal – F (Figure 7) (Kumar et al. 1987).

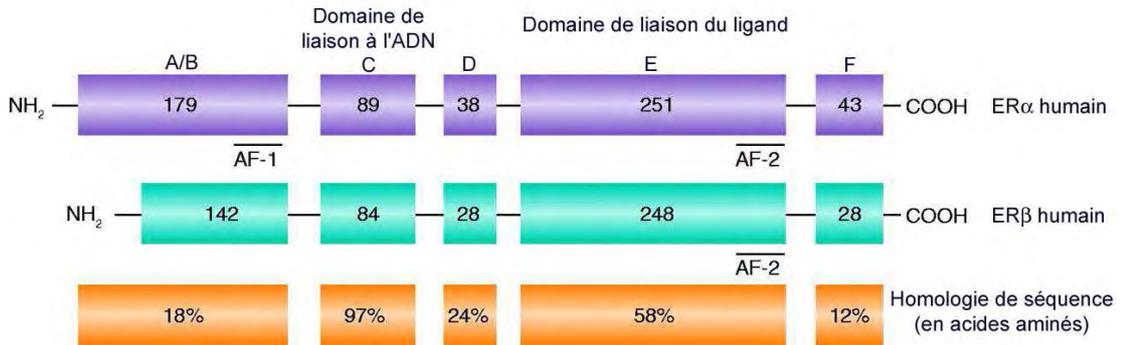


Figure 7: Les domaines fonctionnels des récepteurs aux oestrogènes.

Les ER α et ER β possèdent un domaine de liaison à l'ADN hautement conservé et des domaines N- et C-terminaux assez peu conservés. Les activités transcriptionnelles ligand-dépendantes des ERs sont médiées par la fonction de transactivation AF-2. ER α contient un domaine constitutif AF-1, tandis qu'ER β ne possède pas de domaine AF-1. Les rectangles représentent le nombre de résidus dans chaque séquence. Modifié d'après (Hall and McDonnell 2005) .

- **Le domaine A/B** est impliqué dans les interactions avec les co-régulateurs pour contrôler la transcription. Ce domaine présente seulement 18% d'homologie de séquence entre ER α et ER β , ce qui pourrait expliquer les différences de réponse entre les deux récepteurs selon le promoteur, le type cellulaire ou le ligand.
- **Le domaine C** est responsable de la liaison à l'ADN et est également impliqué dans la dimérisation des récepteurs nucléaires. Ce domaine présente 97% d'homologie de séquences entre ER α et ER β .
- **La région charnière D** assure une importante flexibilité à la structure tridimensionnelle du récepteur entre les domaines E et C. Ce domaine est également impliqué dans le passage du récepteur au travers de l'enveloppe nucléaire (Picard and Yamamoto 1987).
- **Le domaine de fixation du ligand – E** est le second domaine le plus conservé entre les deux types ERs (58% d'homologie de séquence). Ce domaine joue un rôle important dans la fixation du ligand, la dimérisation des récepteurs, la localisation nucléaire et l'interaction avec les co-régulateurs.
- **Le domaine F** diminue la capacité de dimérisation du récepteur et par conséquent diminue son activité transcriptionnelle (Peters and Khan 1999). Ce domaine possède une séquence fortement variable.

2.2.2 Mécanismes d'action des récepteurs aux œstrogènes

Les études montrent que les mécanismes d'actions dans les effets biologiques des oestrogènes sur les tissus cibles sont multiples. Ces voies d'activation se déclenchent soit après la fixation du ligand (ex. oestradiol) au récepteur (ligand – dépendant) ou en absence d'hormone (ligand – indépendant). Les voies de signalisation ligand – dépendantes peuvent se réaliser par la voie génomique ou impliquer un mécanisme non-génomique (Heldring et al. 2007) (Figure 8).

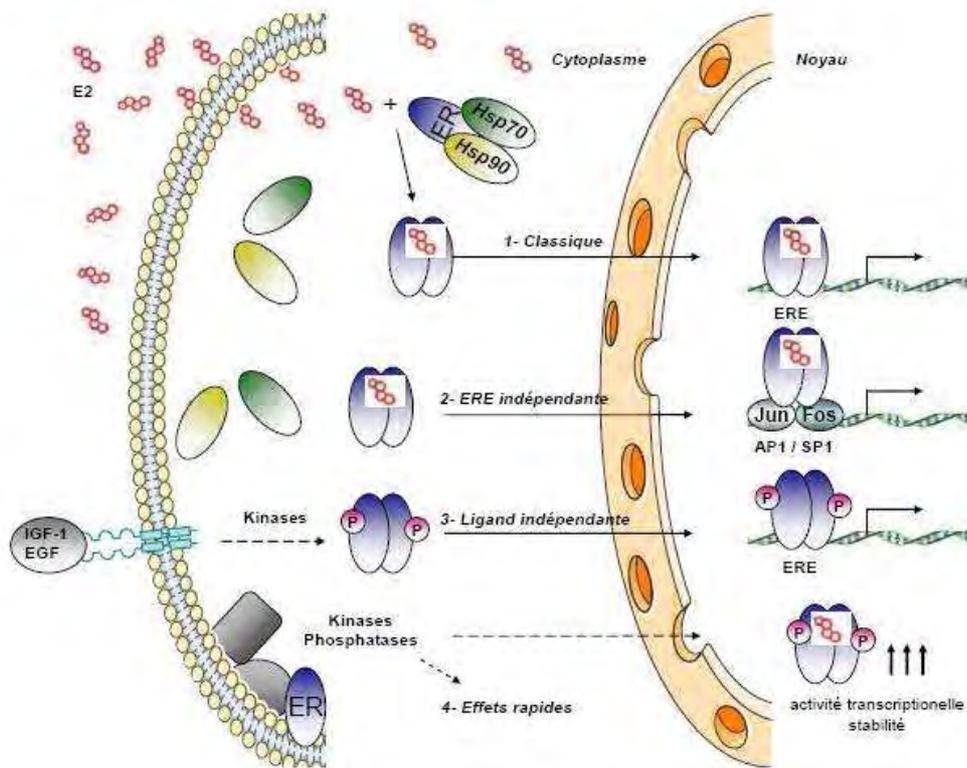


Figure 8: Mécanismes d'action des récepteurs aux oestrogènes.
(Heldring et al. 2007) (explication dans le texte)

2.2.2.1 Mécanisme d'action génomique

Les voies de signalisation génomiques permettent de réguler la transcription des gènes cibles par le biais de la fixation du récepteur intracellulaire à son élément de réponse aux oestrogènes (ERE) au sein du promoteur de gènes cibles (voie classique) ou par des

interactions protéines – protéines avec d'autres facteurs de transcriptions (voie ERE – indépendante).

Activité transcriptionnelle génomique ERE-dépendante (classique) : Le récepteur en l'absence d'oestradiol est retrouvé sous forme d'un hétérocomplexe (complexe transitoire) formé par les protéines chaperonnes telles que les protéines de choc thermique Hsp (*Heat shock protein*) et les immunophilines (Ylikomi et al. 1998). La fixation du ligand induit la dissociation du complexe, la modification de conformation et la dimérisation des ERs (Hall et al. 2001). Les dimères ainsi formés se fixent sur les séquences d'ADN – ERE et entraînent le recrutement des co-régulateurs et de facteurs de transcription sur les régions promotrices initiant l'activation de l'ARN polymérase II et la synthèse de nouveaux ARNm. En fonction du type cellulaire et des promoteurs mis en jeu, le récepteur peut alors exercer une activité stimulatrice ou inhibitrice vis-à-vis de l'expression des gènes cibles.

Activité transcriptionnelle génomique ERE-indépendante : Certains gènes régulés via les ERs ne présentent pas, dans leur région promotrice, de séquence d'ADN similaire aux ERE. Dans ce cas le domaine C (responsable de la liaison à l'ADN) des ERs ne se fixe pas sur l'ADN, mais interagit avec les facteurs de transcription et autres protéines régulatrices pour induire l'expression des gènes. Le récepteur s'associe souvent avec la protéine Sp1 (*Stimulating protein 1*) formant le complexe ER-Sp1. Ce complexe se fixe sur la séquence régulatrice spécifique, riche en GC, de la région promotrice du gène pour induire la transcription du gène (Hall et al. 2001). Les ERs peuvent également interagir avec les facteurs de transcription c-Fos et c-Jun. Le complexe ainsi formé AP-1 (*Activator Proteine-1*) peut se fixer sur des sites nucléotidiques et moduler l'expression génique. Cette voie de signalisation est impliquée dans la transcription de gènes tels qu'IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor-1*).

Activité transcriptionnelle indépendante du ligand : En parallèle d'une activation hormono-dépendante, ER peut être modulé par des signaux extracellulaires, en absence d'oestradiol. Ce mécanisme se réalise grâce à l'habileté de certains facteurs de croissance telle que EGF (*Epidermal Growth Factor*), IGF et TGF α (*Transforming Growth Factor*) d'activer les ERs et d'induire l'expression des gènes cibles.

2.2.2.2 Mécanisme d'action non génomique

Le mécanisme non-génomique implique des ERs autres que les récepteurs nucléaires classiques, dont la structure exacte suscite encore des nombreux débats. Ces effets des œstrogènes sont également appelés « effets rapides ». L'œstradiol se fixe sur des récepteurs non-nucléaires ce qui entraîne une activation de plusieurs voies de signalisation cellulaire telles que l'activation des MAP kinases, des phosphatidyl-inositol 3-kinases (PI3K), de la phospholipase C (PLC), de la protéine kinase C (PKC), de la NO synthase endothéliale (eNOS), ou encore de la voie de l'EGFR (Epidermal growth factor receptor).

2.2.3 Existe-t-il un troisième récepteur aux œstrogènes ?

De plus en plus d'études mettent en évidence la capacité de l'œstradiol à induire des effets physiologiques trop rapides (de l'ordre de quelques secondes à la minute) pour que les récepteurs nucléaires soient impliqués. L'existence d'un troisième type de ER est aujourd'hui bien acceptée, mais sa structure exacte et sa localisation cellulaire ne sont pas encore connus et incitent plusieurs controverses (Losel et al. 2003).

Une première hypothèse suggère que ce récepteur est localisé dans la membrane plasmatique, possède une structure similaire à celle des récepteurs nucléaires ER α ou β et les effets rapides sont bloqués par l'antagoniste pur des ERs, le ICI 182,780. Les adeptes de cette hypothèse soutiennent qu'approximativement 5-10% des tous les ERs ont une localisation plasmatique qui est variable d'un type cellulaire à l'autre. Cette capacité des ERs à s'associer à la membrane est due à une modification post-traductionnelle (palmitoylation, méthylation), vu que les ERs ne possèdent pas de domaine transmembranaire (Acconcia et al. 2005; Le Romancer et al. 2008). Les études menées sur des souris DERKO, knock-out pour les gènes codant pour les ER α et β montrent une perte des tous les effets œstrogène-dépendants, génomiques et non-génomiques (rapides) (Pedram et al. 2006). De plus, ces mêmes études montrent une incapacité du 17 β -œstradiol à induire des effets rapides sur la lignée cellulaire de cancer du sein MCF7 rendues « silencieuses » par siRNA pour ER α ou ER β .

Une autre hypothèse invoquée est que l'œstradiol se fixe sur un récepteur couplé à la protéine G (GPR30 – *G Protein coupled Receptor 30*) pour induire les effets rapides. Des études effectuées sur la lignée cellulaire humaine de cancer du sein SKBR3 qui n'exprime pas les ERs nucléaires classiques montrent que l'administration d'œstradiol

induit des effets rapides telles que la régulation du flux de calcium, l'activation des canaux potassiques, des phosphorylations (Filardo and Thomas 2005). L'implication de GPR30 dans les effets rapides des oestrogènes est également confirmée sur la lignée cellulaire MCF7. Les études montrent une perte des effets rapides sur la lignée invalidée par siRNA pour GPR30, mais aucune modification sur la lignée non-modifiée et sur la lignée invalidée par siRNA pour ER α (Ariazi et al. 2010). Des études récentes effectuées sur des souris GPR30-déficientes invoquent l'implication de ce récepteur dans d'autres effets connus des oestrogènes, tel que le métabolisme glucidique, la croissance osseuse, la libération d'insuline des cellules β -pancréatiques (Martensson et al. 2009). En revanche, d'autres études également sur des souris GPR30-déficientes n'ont montré aucune modification dans le métabolisme glucidique (Isensee et al. 2009), ce qui suggère une variabilité de phénotype chez ces souris d'un groupe de recherche à l'autre, et provoquant des nombreux débats sur le rôle exacte de ce récepteur.

Une étude récente évoque l'hypothèse que le GPR30 s'associe avec le récepteur membranaire ER α pour moduler les voies de signalisation des kinases (Vivacqua et al. 2006).

2.3 Fluctuation des oestrogènes au cours de la vie

Les oestrogènes sont les principales hormones sexuelles chez la femme, bien qu'on les retrouve également chez les hommes, en quantité moins importante et produits par les cellules de Leydig. Trois types de oestrogènes existent : l'oestradiol, l'oestriol et l'estrone. L'oestradiol est l'oestrogène dominant et possède la plus forte activité hormonale sur les ERs.

2.3.1 De la vie fœtale à la puberté

Chez le nouveau-né femelle, les ovaires commencent à sécréter des oestrogènes vers 10-12 jours post-partum et les concentrations plasmatiques augmentent progressivement jusqu'à l'installation de la puberté (30-33 jours chez les rats). En effet, les études chez l'animal ont montré qu'en période fœtale, puis dans la première semaine de vie néonatale, les ovaires ne possèdent pas tout l'équipement enzymatique nécessaire à la production d'oestradiol. L'aromatase ovarienne responsable de la conversion de la testostérone en

œstradiol n'est acquise en quantité suffisante qu'à partir de la deuxième semaine (faible niveau détecté dès le 6^{ème} jour postnatal), exprimée par les cellules de la granulosa des premiers follicules en développement (Mazaud Guittot et al. 2006). Par ailleurs, le foie fœtal synthétise une protéine, appelée α -foetoprotéine, capable de complexer les œstrogènes circulants d'origine maternelle, pour protéger le fœtus en développement d'une exposition trop précoce à l'œstradiol et ses dérivés (Bakker et al. 2006). Ainsi en fin de gestation, Montano et collaborateurs ont détecté chez le fœtus femelle des niveaux circulants d'œstradiol équivalents à ceux des femelles adultes en diestrus, avec un pic de concentration équivalente à celles d'une femelle adulte en proestrus à 4h post-partum, qui diminue rapidement jusqu'à des concentrations non détectables dans les 48 heures qui suivent la naissance (Montano et al. 1995). Ces œstrogènes circulants sont bien d'origine maternelle, étant donné que le pic d'œstradiol à 4 h post-partum a également été retrouvé chez les nouveaux-nés mâles par les mêmes auteurs.

Chez l'homme, les données sont plus limitées. En période fœtale les œstrogènes sont également complexés par l' α -foetoprotéine. Dans les premiers 12-24 mois de vie, des niveaux plasmatiques élevés en œstrogènes sont détectés (Grumbach 2002), mais leur origine n'est pas expliquée. Ensuite, la courbe de sécrétion des œstrogènes est semblable à la progression observée chez les animaux de laboratoire : un début de sécrétion par les ovaires à partir de 6-7 ans et des concentrations plasmatiques croissantes jusqu'à la puberté (Grumbach 2002). L'apparition de la puberté est caractérisée entre autre par la mise en place des variations cycliques des taux circulants de stéroïdes sexuels, accompagnées de modifications morphologiques au niveau utérin (développement cyclique de l'endomètre) et ovarien (de la croissance folliculaire au développement du corps jaune).

2.3.2 La vie adulte – une succession de modifications cycliques

De la puberté à la ménopause, les variations en concentrations circulantes d'hormones sexuelles (œstrogènes et progestérone) sont le résultat d'une cyclicité de l'activité ovarienne, nécessaire à la fonction de reproduction, et résultant en l'apparition périodique soit d'un comportement d'œstrus chez l'animal (cycle oestral), soit d'un saignement utérin (ou menstruation) chez la femme (cycle menstruel). Ces événements se répètent avec une grande régularité quand l'ovulation n'est pas suivie de fécondation. Le

cycle sexuel, qu'il soit oestral ou menstruel, est constituée de deux périodes consécutives : la phase folliculaire et la phase lutéale. La phase folliculaire correspond à la période de recrutement des follicules primordiaux – sélection – dominance du(es) follicule(s) préovulatoire(s) jusqu'à l'émission de l'ovule (ovocyte). La phase lutéale débute après l'ovulation et se finalisent avec la régression fonctionnelle du corps jaune.

Le cycle menstruel chez les femmes dure en moyenne 28 jours, avec une ovulation apparaissant vers la 14^{ème} journée du cycle. Au début de la phase folliculaire, les niveaux plasmatiques d'oestrogènes et de progestérone sont très faibles. A ce moment la sécrétion de FSH par l'hypophyse stimule le développement des follicules primaires (préantraux) et secondaires (antraux). La production d'oestrogènes augmente graduellement au fur et à mesure qu'ils sont sécrétés par la granulosa et les cellules de la thèque des follicules en croissance. Vers la 12^{ème} journée du cycle, la concentration d'oestrogènes atteint son maximum (pic préovulatoire). Ce pic de production induit la maturation rapide du follicule préovulatoire vers un follicule mature dit de « De Graaf ». Les oestrogènes par un mécanisme de *feed-back positif* stimulent la libération des hormones hypophysaires FSH et LH, dont les concentrations deviennent maximales le 14^{ème} jour du cycle, déclenchant l'ovulation. La phase lutéale qui suit est caractérisée par la formation du corps jaune sous l'action de la LH, une lutéinisation qui débute immédiatement après l'ovulation. Le corps jaune produit majoritairement de la progestérone, alors que les cellules de la granulosa qui subsistent en son pourtour continuent de sécréter des œstrogènes (toutefois dans une moindre quantité qu'au cours de la période folliculaire). Enfin, l'involution du corps jaune induit la chute brutale de production d'œstrogènes et de progestérone, déclenchant la desquamation de l'endomètre et l'apparition des menstruations (Figure 9).

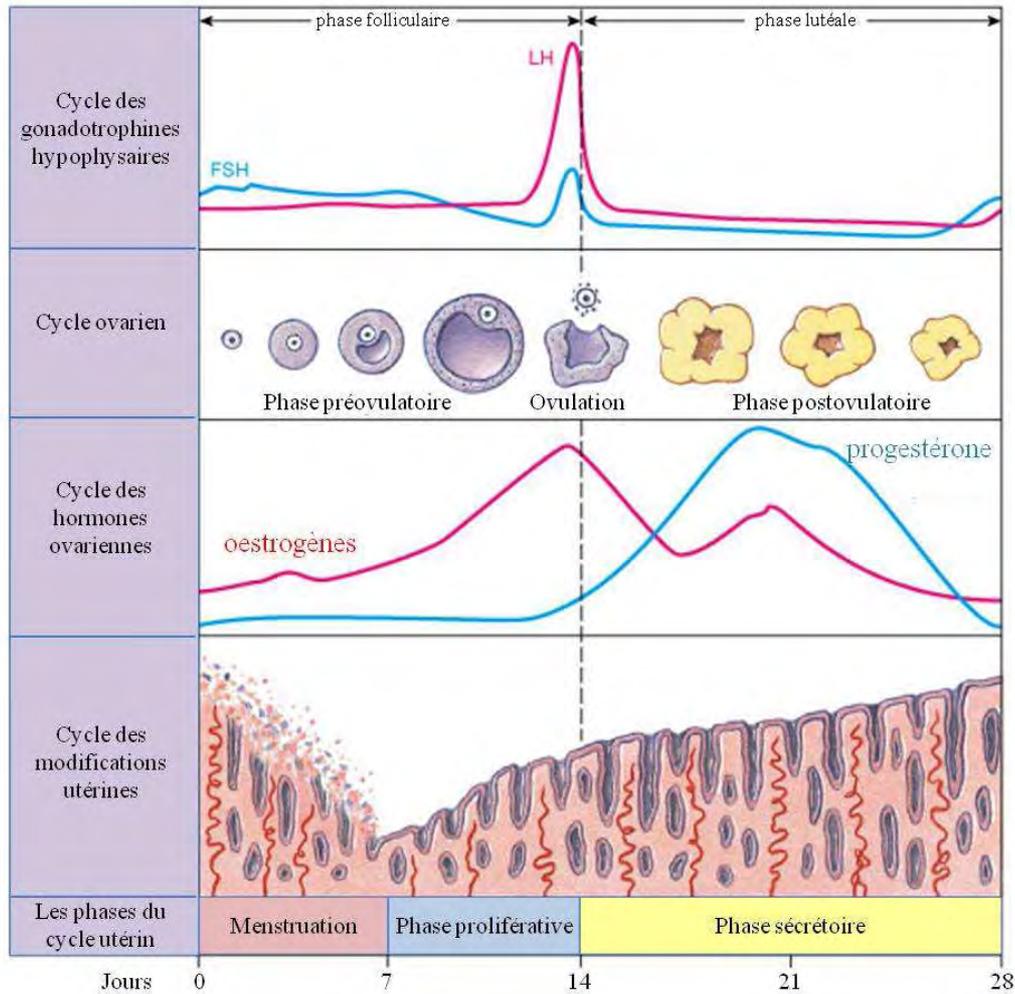


Figure 9: Profil hormonal au cours du cycle menstruel et développement de l'endomètre.

Le cycle oestral chez les rates est beaucoup plus court, 4-5 jours, mais des modifications très similaires au cycle menstruel peuvent être observées, avec quelques particularités liées à l'espèce. Le cycle oestral est divisé en 4 stades : proestrus, œstrus, metestrus (appelé parfois diestrus précoce) et diestrus. Le proestrus et l'œstrus correspondent à la phase folliculaire, tandis que le metestrus et le diestrus correspondent à la phase lutéale. La concentration plasmatique en oestrogènes commence à augmenter très tôt dans la matinée du proestrus, pour atteindre un pic de production vers midi. Comme dans l'espèce humaine, le pic oestrogénique induit la sécrétion de LH et FSH qui atteint des concentrations plasmatiques maximales vers 16-18 heures dans la journée du proestrus, suivi du déclenchement de l'ovulation (Figure 10).

La sécrétion de la progestérone chez la rate présente certaines différences par rapport à l'espèce humaine. Les cellules de la granulosa du follicule pré-ovulatoire sont capables de sécréter de la progestérone, ce que détermine la présence de cette hormone au niveau plasmatique tardivement dans le proestrus. Ce pic progestéronique joue un rôle important dans l'induction de la réceptivité de la femelle (comportement de lordose). La sécrétion de la progestérone par le corps jaune est ensuite responsable des niveaux élevés entre l'après-midi du metestrus et le matin du diestrus (Emanuele et al. 2002; Staley and Scharfman 2005; Westwood 2008; Wray and Noble 2008).

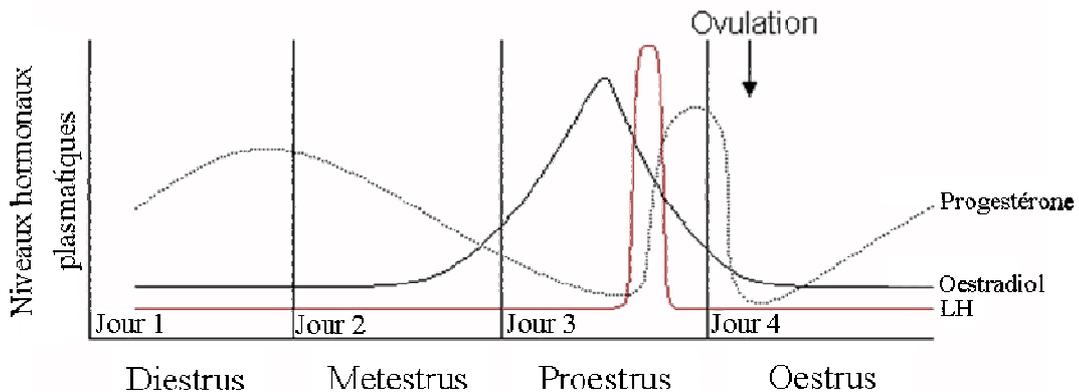


Figure 10: Profil hormonal au cours du cycle oestral chez la rate

Passée la période fertile, l'épuisement progressif du capital d'ovocytes chez la femme, vers 50 ans, induit l'apparition de la **ménopause**. Essentiellement appréciée sur des signes cliniques, la périménopause se caractérise par une irrégularité dans l'apparition des cycles menstruels (dysménorrhées), conséquence d'une diminution de la production des hormones sexuelles (œstrogènes et progestérone) par les gonades. Cette insuffisance progressive dans l'activité ovarienne est due à un dysfonctionnement de l'axe hypothalamo-hypophysaire jusqu'à l'aménorrhée persistante (absence de règles). Des modifications similaires sont observées chez la rate âgée, où la réduction de la fonction ovarienne apparaît en conséquence d'un dérèglement de la fonction gonadotrope hypothalamo-hypophysaire.

2.4 Le rôle des œstrogènes dans la physiopathologie intestinale

Les pathologies intestinales chroniques impliquant une altération plus ou moins importante de la fonction de barrière intestinale sont : 1/les troubles fonctionnels de l'intestin, parmi lesquelles figure le syndrome de l'intestin irritable (SII) et 2/ les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) qui recouvrent la rectocolite hémorragique (RCH) et la maladie de Crohn. Le syndrome de l'intestin irritable (SII) affecte 10-15% de la population totale dans les pays industrialisés, avec une prévalence deux fois plus importante chez les femmes, et est caractérisé par différents symptômes tels que l'alternance de diarrhées et de constipation, des ballonnements et des douleurs abdominales (Taub et al. 1995; Muller-Lissner et al. 2001; Spiller et al. 2007). Les critères diagnostiques (Rome III) permettent une distinction chez les patients SII, basée sur la prédominance des symptômes de diarrhée (SII-D), de constipation (SII-C) ou alternée (SII-A), la forme SII-C affectant plus particulièrement la femme (Longstreth et al. 2006). Bien que l'étiologie du SII reste obscure, l'hypothèse d'un état micro-inflammatoire de la muqueuse intestinale accompagnée d'altérations des relations neuro-immunes est de plus en plus validée (Barbara et al. 2002; Geese et al. 2008; Piche 2009). Les MICI sont par contre caractérisées d'emblée par un ensemble des lésions inflammatoires secondaires à une activation du système immunitaire intestinal, touchant tout ou une partie du tube digestif (Loftus 2004). La maladie de Crohn et la RCH sont deux pathologies chroniques, récidivantes car caractérisées par des périodes de rémission alternées de « poussées » d'activité. L'origine des MICI est également méconnue, impliquant à la fois des facteurs environnementaux, immunologiques et génétiques, où le statut hormonal est probablement impliqué, les MICI, en particulier la maladie de Crohn, s'exprimant principalement chez des personnes jeunes (14-30 ans), donc en âge de fertilité.

Il existe aujourd'hui un consensus pour avancer qu'un point commun dans ces deux formes de pathologies chroniques est une altération de la barrière épithéliale, s'accompagnant d'un passage excessif d'antigènes luminaux vers la muqueuse, à l'origine d'une réaction inflammatoire, très faible (microinflammation) ou au contraire aigue (jusqu'à la nécrose dans la maladie de Crohn) selon qu'il s'agit respectivement de SII ou de MICI. Un deuxième point commun est la fluctuation des symptômes au cours du cycle menstruel chez les femmes, à l'origine de la question du lien entre le statut hormonal,

l'intégrité de la barrière et l'intensité de la réponse inflammatoire. De plus, il apparaît clairement que les traitements hormonaux chez la femme, qu'il s'agisse de l'utilisation à long terme d'une contraception orale en période de fertilité, ou celle d'un traitement hormonal substitutif chez la femme post-ménopausée, ont une incidence dans la pathogenèse et/ou l'évolution des MICI (Timmer et al. 1998; Garcia Rodriguez et al. 2005; El-Tawil 2008; Kane and Reddy 2008). Cependant des controverses existent, certains auteurs considérant ces apports exogènes de stéroïdes comme facteurs de prédisposition (Gurbuz et al. 1994; Garcia Rodriguez et al. 2005), d'autres voyant plutôt dans le traitement hormonal substitutif une protection dans l'activité des MICI (Kane and Reddy 2008). Quel que soit la conclusion, toutes ces données cliniques témoignent de l'influence des hormones stéroïdes sexuelles (prévalence liée au sexe, activité anti- et/ou proinflammatoire) dans l'étiologie et l'activité des pathologies intestinales chroniques. Dans le chapitre qui suit, nous exposerons les données fondamentales sur l'impact du cycle sexuel en général, et des oestrogènes en particulier, sur les trois critères clés de la physiopathologie intestinale : l'intégrité de la barrière épithéliale, la réponse inflammatoire et la douleur viscérale.

2.4.1 Les œstrogènes et l'intégrité de la barrière intestinale

Une étude concluait en 2005 à un rôle modulateur de l'oestradiol sur la perméabilité paracellulaire chez le rat dans les deux sexes (Homma et al. 2005). Sans apporter de démonstration mécanistique, cette étude dessinait les bases d'une influence de la balance oestro-progestative au cours du cycle sexuel sur la perméabilité intestinale et la notion d'un dimorphisme sexuel. Ainsi les auteurs ont observé une perméabilité intestinale plus faible chez les femelles en proestrus (dominance oestrogénique) comparée aux mâles, en conditions basales (non-inflammatoires). De plus, la barrière intestinale apparaissait plus résistante aux lésions tissulaires (acidose, hypoxie) chez les femelles en proestrus par rapport aux mâles. Enfin, l'administration de l'oestradiol chez les mâles induisait une diminution du flux paracellulaire de dextran-FITC en conditions basales, tout en limitant les dommages tissulaires face à un stimulus agressif, témoignant d'un rôle apparent protecteur. Par ailleurs, une sensibilité de la perméabilité paracellulaire aux oestrogènes circulants a également été mise en évidence au niveau d'autres épithéliums, telle que l'endothélium vasculaire (Ye et al. 2003), l'épithélium vaginal (Gorodeski 2001) et la barrière hémato-encéphalique (Kang et al. 2006a). Dans ces systèmes la modulation de la

perméabilité paracellulaire a été observée sur la base de modifications de la résistance trans-épithéliale par les oestrogènes. Ces effets sont induits par une variation d'expression des protéines transmembranaires de jonctions serrées, telles que l'occludine et les claudines.

Dans l'intestin, des études récentes ont mis en évidence une modulation de la voie trans-cellulaire par les fluctuations cycliques des œstrogènes (Condliffe et al. 2001; O'Mahony and Harvey 2008). Ces effets des oestrogènes sont rapides et n'impliquent pas les récepteurs nucléaires. Le transport trans-cellulaire des ions, spécialement la réabsorption de Na^+ et K^+ et la sécrétion du Cl^- à travers la barrière épithéliale est responsable de l'homéostasie hydrique. Dans un premier temps, les œstrogènes activent très rapidement les protéines kinases PKC δ et PKA, induisant la phosphorylation des canaux potassiques voltage dépendants KCNQ1 et par conséquent, l'inhibition de la réabsorption du K^+ et de la sécrétion du Cl^- (Condliffe et al. 2001; O'Mahony et al. 2007; O'Mahony and Harvey 2008). Dans un deuxième temps, les œstrogènes diminuent l'expression des transporteurs des ions et ces effets sont médiés par les récepteurs membranaires (O'Mahony et al. 2009).

Les deux types ER α et β sont présents au niveau d'intestin chez les rats mâles et femelles (Kawano et al. 2004). Les études sur biopsies humaines ont également identifié ER α et ER β dans le côlon normal, dans les deux sexes (Foley et al. 2000; Konstantinopoulos et al. 2003). ER α est exprimé au niveau de la muqueuse intestinale et dans les neurones des plexus nerveux Auerbach et Meissner (Kawano et al. 2004). ER β est exprimé dans les cellules épithéliales, les neurones des plexus sous-muqueux et myentériques, les cellules endothéliales, les lymphocytes et dans les cellules musculaires lisses de la *muscularis mucosa* et *muscularis propria* (Konstantinopoulos et al. 2003; Kawano et al. 2004). Au niveau de l'épithélium colique, chez le rat comme chez l'homme, l'ER β est le récepteur dominant (Thomas et al. 1993; Campbell-Thompson et al. 2001; Konstantinopoulos et al. 2003), avec un niveau d'expression d'ER β approximativement deux fois plus important chez la femme comparé à l'homme (Campbell-Thompson et al. 2001). L'ER β est localisé au niveau cytoplasmique et surtout nucléaire des cellules épithéliales superficielles (Campbell-Thompson et al. 2001; Cho et al. 2007), ainsi que dans les cellules à la base des cryptes (Konstantinopoulos et al. 2003). Le niveau d'expression d'ER β est plus important dans les cellules en prolifération situées à la base des cryptes par rapport aux cellules dans la zone de maturation (Figure 11 A), plus proche

de lumen et dans l'épithélium de surface (Konstantinopoulos et al. 2003), ce qui suggère un rôle dans la prolifération cellulaire. Dans les lignées cellulaires humaines coliques d'origine tumorale, comme Caco-2 et T84, ER β reste la forme prédominante des ERs comme dans le côlon normal (Figure 11 B), ce qui les présentent comme un bon modèle pour appréhender *in vitro* les effets d'une exposition à l'oestradiol et à ses agonistes pharmacologiques (Campbell-Thompson et al. 2001).

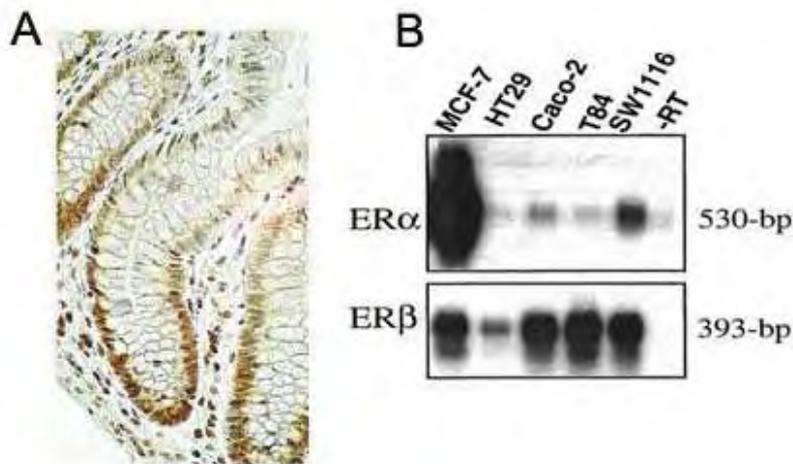


Figure 11: Expression de récepteurs aux oestrogènes au niveau du côlon et dans les lignées cellulaires coliques.

- A. La présence de l'immunomarquage de ER β à la base des cryptes et dans l'épithélium superficiel du côlon humain normal (grossissement x 40) (Konstantinopoulos et al. 2003).
- B. La forte expression de ARNm de ER β dans les lignées cellulaires humaines coliques HT29, Caco-2, T84, SW1116. Les niveaux de ARNm de ER α sont très faiblement exprimés dans les lignées HT29, Caco-2, T84. Une expression plus forte de ER α est observée dans la lignée SW1116, mais qui est moins importante par rapport à la lignée de cellules tumorales mammaires MCF-7 (Campbell-Thompson et al. 2001).

Le rôle important d'ER β dans le développement, l'organisation et la maintenance architecturale de l'épithélium colique a récemment été mis en évidence chez des souris déficientes pour ER β (Wada-Hiraike et al. 2006). Ces souris KO présentent un défaut de développement et de maturation de l'épithélium colique, traduit par une hyperprolifération cellulaire, une perte de la différenciation des cellules épithéliales et une inhibition des voies apoptotiques. L'inactivation du gène pour ER β s'accompagne également d'anomalies des jonctions intercellulaires, qui se traduisent par une diminution de nombre de desmosomes, la présence de desmosomes asymétriques et une perte de jonctions serrées, support de la perméabilité paracellulaire. Par ailleurs, le défaut de prolifération des

colonocytes chez les souris ER β -/- témoignent du rôle probable des oestrogènes dans le contrôle du renouvellement de l'épithélium intestinal, où une liaison aux ER β apparaît freiner la prolifération cellulaire.

Ce rôle des oestrogènes dans le contrôle de la prolifération cellulaire au niveau du côlon est à corréler à l'importante littérature sur le déséquilibre de la balance ER α /ER β dans le développement des tumeurs colorectales. En effet, les études sur des biopsies humaines ont mis en évidence une diminution significative de l'expression d'ER β dans la zone tumorale par rapport à l'épithélium colique normal (Foley et al. 2000; Campbell-Thompson et al. 2001; Konstantinopoulos et al. 2003). De plus, la diminution progressive de l'expression d'ER β est en directe corrélation avec l'incapacité des cellules cancéreuses à se différencier. Une perte progressive d'ER β pendant le processus de la carcinogenèse est également observée aussi dans d'autres tissus, telle que la prostate et la glande mammaire (Roger et al. 2001; Bardin et al. 2004; Yang et al. 2007). Ainsi dans le côlon, une prédominance d'expression d'ER β apparaît protectrice contre la précancérisation des tissus. Les études cliniques montrent par ailleurs une incidence du cancer colorectal plus faible chez les femmes en pré-ménopause par rapport aux hommes, suggérant une protection liée au statut hormonal féminin. Après l'installation de la ménopause l'incidence du cancer colorectal augmente, mais le traitement hormonal substitutif s'avère protecteur contre les pathologies intestinales hyperprolifératives, diminuant de 30 à 40% le risque d'apparition d'une tumeur (Nanda et al. 1999; Delluc and Benamouzig 2008).

2.4.2 Les oestrogènes et le système immunitaire intestinal

Hormis leurs effets directs sur les cellules épithéliales, les oestrogènes participent également au contrôle de l'activité des cellules immunitaires associées au GALT, où les deux formes α et β des ERs sont présents. ER α est exprimé dans les lymphocytes T et B, dans les cellules dendritiques, les macrophages, les monocytes, les cellules *natural killer* (NK) et les mastocytes (Curran et al. 2001; Grimaldi et al. 2002; Phiel et al. 2005). L'expression d'ER β est beaucoup moins ubiquitaire, principalement observée dans les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ et dans les lymphocytes B (Phiel et al. 2005).

2.4.2.1 Influence des œstrogènes sur les cellules immunitaires

Les neutrophiles sont les premières cellules à répondre à une attaque antigénique. Ces cellules détruisent les pathogènes par la phagocytose et par la libération des radicaux libres toxiques pour les tissus. Les oestrogènes induisent des modifications dans le nombre et la fonction des neutrophiles. Par exemple, les oestrogènes suppriment la production des leucocytes dans la moelle épinière. L'oestradiol diminue la chimiotaxie des neutrophiles ainsi que l'adhérence à l'endothélium vasculaire, ce que prévient l'infiltration neutrophilaire et les lésions tissulaires. Dans les modèles expérimentaux de colite, la diminution significative de l'infiltration tissulaire par l'oestradiol se traduit par une diminution de l'activité de l'enzyme myéloperoxydase (MPO), retrouvée dans les granules azurophiles des neutrophiles (Verdu et al. 2002; Harnish et al. 2004; Houdeau et al. 2007). Ces effets sont médiés par ER β (Harnish et al. 2004). La capacité de l'oestradiol à limiter le recrutement des neutrophiles dans le foyer inflammatoire est due à sa capacité de diminuer l'expression des protéines d'adhésion, telle que l'ICAM-1 (Inter-Cellular Adhesion Molecule 1) (Verdu et al. 2002) et de chemokines, comme le *macrophage migration inhibitory factor* (Houdeau et al. 2007).

Les macrophages sont impliqués dans la phagocytose et présentent une capacité importante de sécrétion de protéines pro-inflammatoires et de cytokines. Les macrophages jouent un rôle clé dans l'immunité innée et constituent l'une des cibles des oestrogènes au sein du système immunitaire, augmentant notamment leur activité de phagocytose (Baranao et al. 1992).

Les cellules dendritiques sont des cellules présentatrices d'antigène, qui activent les lymphocytes T naïfs, et dirigent leur développement vers une réponse inflammatoire de type Th1 ou Th2. Les œstrogènes jouent un rôle important dans la différenciation de cellules dendritiques. Par exemple, le traitement des cellules dendritiques spléniques avec des œstrogènes diminue la production de TNF α et d'IL-12, tout en induisant l'expression des cytokines anti-inflammatoires d'IL-6 et IL-10 (Yang et al. 2006).

Les mastocytes sont des cellules qui se caractérisent par la présence dans leur cytoplasme de très nombreuses granulations contenant des médiateurs chimiques libérés lors des processus inflammatoires ou des réactions allergiques. Le traitement avec des œstrogènes réduit la libération des protéases par les mastocytes dans le modèle spontané de colite (modèle transgénique HLA-B27) chez le rat (Harnish et al. 2004). Ces effets anti-inflammatoires des œstrogènes se manifestent par une diminution d'expression d'ARNm

de RMCP -1, -3, -4 (*Rat mast cell protease*) chez les rats traités avec des doses physiologiques d'œstradiol. *In vitro*, l'administration d'œstradiol inhibe la dégranulation des mastocytes et la libération de cytokines (Harnish et al. 2004). Dans le même modèle expérimental de colite HLA-B27, une autre étude témoigne de la diminution des scores lésionnels microscopiques après traitement par ERB-041, un agoniste ER β (Harris et al. 2003).

2.4.2.2. Les cytokines oestrogène – sensibles : le cas du macrophage migration inhibitory factor (MIF)

Les cytokines sont des médiateurs protéiques solubles qui induisent la production en cascade d'autres médiateurs essentiels au déroulement de l'inflammation, et participent à chacune des étapes de la réponse inflammatoire (initiation, amplification, entretien ou résolution et réparation). Les cytokines libérées au cœur du tissu enflammé interagissent avec leurs récepteurs spécifiques exprimés à la surface des cellules cibles. L'activation utilise deux voies de transduction conduisant à deux réponses cellulaires distinctes : 1/ une réponse cellulaire immédiate (activation de COX, NADPH - oxydase, NOS, induction du chimiotactisme) et 2/ une réponse cellulaire retardée, impliquant les facteurs de transcriptions NF-kB et AP1 et leur intervention directe sur le génome : synthèse des protéines (cytokines, protéines d'adhérence) et d'enzymes (COX, LPO, NOS). Trois groupes de cytokines ont été caractérisés : les cytokines pro- ou anti- inflammatoires, les cytokines immunorégulatrices et les chémokines.

Parmi les cytokines essentielles à la genèse et au maintien de la réaction inflammatoire, le *Macrophage Migration Inhibitory Factor* (MIF) est une protéine d'expression ubiquitaire, présente dans les cellules immunitaires, telles que les macrophages, les cellules dendritiques, les lymphocytes et mastocytes, mais également dans les cellules épithéliales des barrières biologiques (Baugh and Donnelly 2003; Calandra and Roger 2003). Contrairement aux autres cytokines, le MIF est exprimé de manière constitutive et stocké dans ces cellules, donc ne nécessite pas une synthèse protéique *de novo* pour permettre leur sécrétion, comme les interleukines par exemple. Lors d'un stimulus inflammatoire, le MIF est rapidement libéré par les cellules immunitaires et épithéliales pour inhiber la migration aléatoire des macrophages en induisant leur accumulation sur la zone lésée. Le MIF est un véritable « chef d'orchestre » dans la cascade immuno-inflammatoire. Située en amont de la cascade d'évènements

immuno-inflammatoires, cette cytokine stimule de façon directe ou indirecte la production d'un large spectre de molécules pro-inflammatoires, telles que des cytokines (TNF α , IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8 et *macrophage inflammatory protein 2*), l'oxyde nitrique, la cyclo-oxygénase 2 (COX2) et les produits de la voie métabolique de l'acide arachidonique, ainsi que certaines métalloprotéinases matricielles (Calandra and Roger 2003). Chez les patients souffrants de la maladie de Crohn ou de RCH, des niveaux élevés de MIF ont été détectés dans le sérum ainsi qu'au niveau intestinal, en particulier dans le cytoplasme des cellules épithéliales (de Jong et al. 2001; Murakami et al. 2001; Maaser et al. 2002). De plus, les études sur des souris transgéniques sur-exprimant le MIF ont mis en évidence l'induction rapide d'une colite dès les très faibles doses de Dextran Sulfate de Sodium (1% DSS) normalement sans effet chez les souris sauvages (Ohkawara et al. 2005). Enfin, l'administration *in vivo* d'un anticorps anti-MIF neutralisant la bioactivité de la cytokine améliore significativement les manifestations cliniques et histologiques dans les deux modèles expérimentaux de colites (modèle DSS et TNBS – acide trinitrobenzène sulfonique) (Ohkawara et al. 2002). La réduction de la sévérité de la colite expérimentale suite au traitement avec l'anticorps anti-MIF est due à l'inhibition d'expression des cytokines Th1 comme le TNF α et l'IFN- γ .

Les études récentes de notre équipe ont montré que l'expression basale et induite de MIF était sous le contrôle des hormones sexuelles (Houdeau et al. 2007). Chez la rate, l'expression basale de MIF dans le côlon n'est pas stable, mais varie au cours du cycle sexuel, contrairement au TNF α et l'IL-1 β qui restent stables dans les tissus. Cette variation du contenu basal en MIF se traduit par une surexpression pendant la phase lutéale (dominance de la progestérone) et une diminution dans la phase folliculaire (dominance œstrogénique). De plus, un traitement par l'oestradiol chez la rate ovariectomisée (OVX) diminue significativement les niveaux tissulaires du MIF dans le modèle de colite expérimentale (TNBS et DSS), tant au niveau de l'épithélium colique que dans les ganglions nerveux entériques, et s'accompagne d'une réduction de l'infiltration neutrophilaire et d'une amélioration des scores histologiques. Les propriétés œstrogénosensibles du MIF sont intéressantes à exploiter dans l'évaluation du potentiel œstrogénomimétique des perturbateurs endocriniens, comme le bisphénol A.

En dessous du MIF, l'**interleukine-1 β** et le **TNF α** sont essentielles à la genèse de la réaction inflammatoire et son maintien. Ces cytokines sont produites essentiellement par les cellules phagocytaires (macrophage, monocytes). Elles peuvent être synthétisées en quantité moins importante par de nombreuses d'autres cellules activées, telles que les neutrophiles, les mastocytes, les fibroblastes, les cellules endothéliales, les lymphocytes T et B. Ces cytokines sont à l'origine d'une augmentation du catabolisme cellulaire et de la synthèse de protéines de l'inflammation. Dans maladie de Crohn et la RCH, les cytokines TNF α et IL-1 β sont essentiellement produites par les cellules mononuclées des muqueuses (Reimund et al. 1996). En effet, des cellules mononuclées de la *lamina propria* isolées à partir de biopsies de patients MICI secrètent *in vitro* des quantités importantes de cytokines inflammatoires. L'IL-1 β et le TNF α induisent le recrutement des neutrophiles dans le foyer inflammatoire et stimulent la production d'autres cytokines impliquées dans les destructions tissulaires. Comme dit plus haut, les niveaux tissulaires d'IL-1 β et TNF α ne présentent pas de modifications au cours du cycle sexuel chez la rate, mais en diminuant la production de MIF dans une colite expérimentale, un traitement à l'oestradiol réduit par voie de cascade la production tissulaire d'IL-1 β (Houdeau et al. 2007). Concernant le TNF α , sa régulation par les oestrogènes est assez variable et dépend de la dose de l'oestradiol administrée. En effet, les taux de TNF α restent élevés lors d'une colite expérimentale chez les rates OVX traitées avec des doses physiologiques d'oestradiol (Houdeau et al. 2007), tandis que des doses supra-physiologiques réduisent significativement le taux sérique de TNF α (Sener et al. 2005).

Enfin l'**Interféron γ** (IFN- γ) est une cytokine pro-inflammatoire qui possède une forte activité antivirale et qui joue un rôle important dans la stimulation des lymphocytes T et les cellules *natural killer*. IFN- γ est une cytokine clé qui possède un rôle majeur dans l'induction et la progression de MICI, plus particulièrement dans la maladie de Crohn (Breese et al. 1993). Des quantités importantes d'IFN- γ sont secrétés par les cellules mononuclées de la *lamina propria* du côlon des patients atteints de la maladie de Crohn (Breese et al. 1993). Dans le modèle expérimental de colite induite par le DSS, une corrélation positive a été observée entre les niveaux produits d'IFN- γ et la sévérité des lésions tissulaires (Ito et al. 2006). L'IFN- γ est responsable de la libération de certaines chemokines impliquées dans la progression de l'inflammation au niveau intestinal, telles que le MIG (*Monokine induced by interferon- γ*), l'IP-10 (*interferon-inducible protein 10*)

et le MCP-1(monocyte chemoattractant protein-1) (Ito et al. 2006). Des doses supra-physiologiques d'œstradiol (équivalentes à celles atteintes pendant la grossesse) diminuent l'expression de IFN- γ dans la colite expérimentale au DNB (acide dinitro-benzène sulfonique) (Verdu et al. 2002).

2.4.3 Les œstrogènes et la douleur viscérale

2.4.3.1 Douleur viscérale et les voies de transmission douloureuse

La douleur est définie comme une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable, associée à une lésion tissulaire réelle ou potentielle, ou décrite dans des termes évoquant une telle lésion. Dans le mécanisme de la douleur, il est important de bien distinguer l'hyperalgésie de l'allodynie. L'hyperalgésie est définie par une augmentation des réponses à des différents stimuli et est liée à une sensibilisation des nocicepteurs. L'allodynie est caractérisée par l'apparition de la douleur suite à une stimulation normalement non douloureuse (Figure 12).

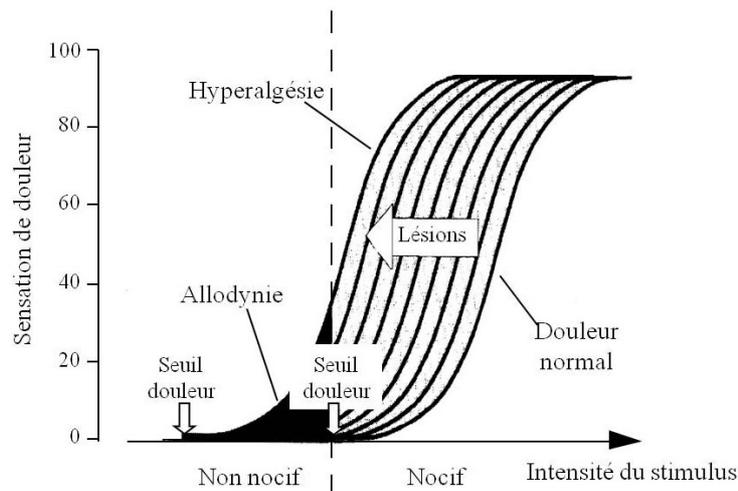


Figure 12: Relation entre intensité du stimulus douloureux et sensation douloureuse.
(Gebhart 1999)

La transmission de la douleur par le système nerveux sensitif (ou afférent) est un phénomène complexe impliquant des mécanismes électrophysiologiques et neurochimiques, où 3 étapes vont se succéder (Figure 13) :

- l'élaboration de l'influx au niveau du nocicepteur et sa transmission *via* l'afférence nerveuse périphérique, dont les corps cellulaires sont localisés dans les ganglions rachidiens (ganglion des racines dorsales de la moelle),
- le relais et la modulation au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière (transmission de l'influx, blocage ou amplification, convergence des différents influx),
- l'intégration au niveau du cerveau qui le transforme en message conscient : sensation douloureuse avec une composante sensori-discriminative (intensité, localisation, durée du stimulus nociceptif), et une composante émotionnelle et affective désagréable.

Les nocicepteurs sont des récepteurs sensoriels, capables d'être activés par des stimuli périphériques. Ces récepteurs sont constitués par les terminaisons libres des afférences nerveuses amyéliniques (extrémités distales de la projection dendritique) constituant des arborisations plexiformes dans la paroi des viscères.

Après activation des nocicepteurs, l'influx nociceptif se dirige par des fibres nerveuses afférentes vers la moelle épinière où les axones des neurones afférents font synapse avec des interneurons dans les cornes dorsales de la moelle épinière. Les afférences de la vessie ou du côlon empruntent la voie parasympathique afin de transmettre les messages douloureux en provenance des viscères. Les fibres nerveuses à l'approche de la moelle épinière s'organisent en deux groupes : les grosses fibres A α/β amyélinisées qui prennent la position dorso-médiane dans la racine, et les fibres A δ et C qui occupent la position ventro-latérale de la racine. Les fibres A α/β sont responsables de la transmission rapide des sensations tactiles et proprioceptives. La sensation de douleur est transmise par les fibres A δ et C. Les fibres A δ sont faiblement myélinisées et responsables de la transmission rapide (vitesse de 4 à 30 m/s) de la douleur localisée et précise, comme la piqûre. Les fibres C sont responsables de la transmission lente (vitesse de 0,4 à 2 m/s) de la douleur diffuse, mal localisée, tardive de type brûlure.

A partir des relais interneuronaux de la corne dorsale, s'organisent des circuits réflexes spinaux par l'intermédiaire de chaînes d'interneurones. Le message nociceptif se poursuit alors par les voies spinales ascendantes jusqu'aux centres supraspinaux *via* des neurones de 2^{ème} ordre. Deux voies principales véhiculent le message nociceptif :

- la voie spinothalamique latérale qui se termine au niveau de trois zones du thalamus : la région ventro-postéro-latérale, postérieure et médiane qui relaye ensuite l'information vers le cortex sensoriel. Cette voie est constituée des fibres A δ et est responsable de la localisation et de la perception de l'intensité de la douleur (Craig and Burton 1981).

- la voie spinothalamique médiane ou spinoréticulaire – se compose surtout des fibres C qui transmettent la douleur lente et diffuse. Leurs synapses s'articulent avec les noyaux de la formation réticulée du tronc cérébral et les noyaux thalamiques médians. Les messagers afférents sont ensuite transmis vers le cortex frontal et le système limbique, deux régions responsables des émotions et de la mémoire. La faible vitesse de conduction des fibres C, le caractère diffus des grands champs récepteurs ainsi que les structures supérieures impliquées dans cette voie en font une candidate type pour la perception de la composante désagréable de la douleur.

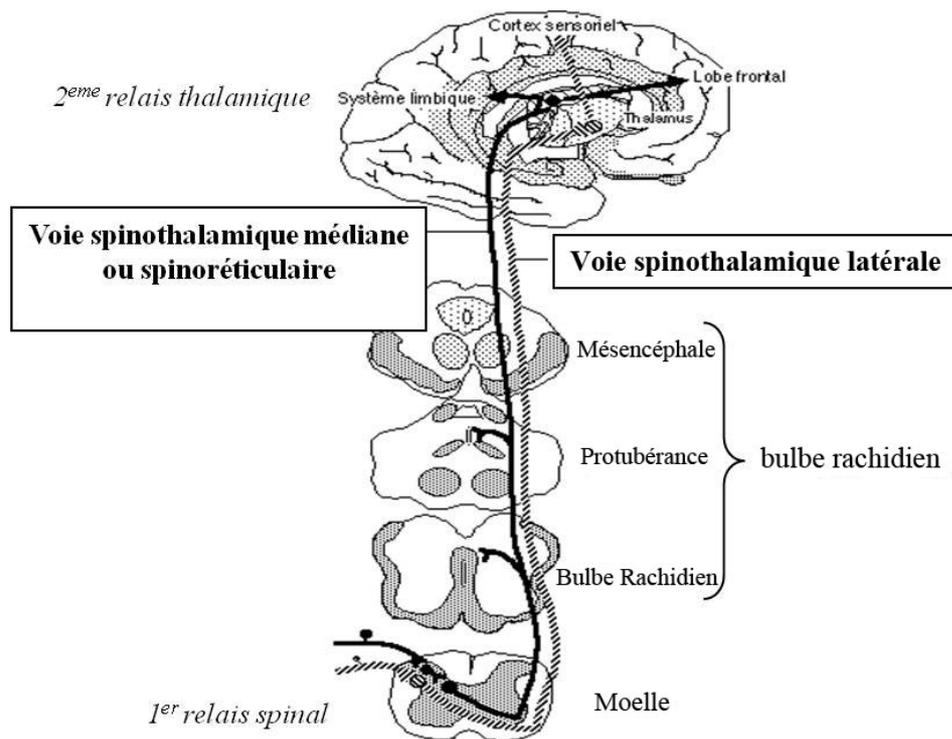


Figure 13: Voies de la douleur : faisceaux spinothalamiques latéral et médial.

D'autres voies ascendantes et structures impliquées dans la nociception ont été nouvellement décrites :

- Le faisceau spino-parabrachio-amygdalien qui joue également un rôle important dans la transmission des messages douloureux vers les centres supérieurs (Bernard and Besson 1990). Ces neurones sont activés par des stimulations cutanées, mais également par des stimulations viscérales. Ils se projettent au niveau du noyau central de l'amygdale.

- Le faisceau spino-parabrachio-hypothalamique qui pourrait jouer un rôle majeur dans les composantes végétatives et endocriniennes de la douleur.

L'information nociceptive est transmise du thalamus au cortex cérébral *via* les neurones de 3^{ème} ordre. Le thalamus est un lieu de convergence de multiples voies nociceptives directes ou indirectes. En fait, l'information véhiculée par les faisceaux spinaux ascendants se projette respectivement sur :

- les noyaux du thalamus postérieur avant d'être envoyée directement vers le cortex somatosensoriel. Ces structures interviennent donc dans le codage, l'identification et la localisation du stimulus nociceptif. Cette voie est ainsi responsable de l'aspect sensori-discriminatif de la douleur.
- la substance réticulée du tronc cérébral et les noyaux du thalamus médian comportant ensuite des vastes projections sur le cortex pré-frontal, les structures limbiques, l'hypothalamus et le striatum. Cette voie de conduction lente est responsable de la douleur sourde et mal systématisée (non-discriminative).

Contrôles descendants de la sensibilité viscérale

Au niveau supraspinal, la modulation descendante de la douleur en provenance du cortex est transmise directement à la moelle épinière par l'intermédiaire, soit du tractus cortico-spinal, soit d'un relais au niveau du tronc cérébral. Les voies descendantes modulant ainsi les sensations viscérales peuvent être, soit excitatrices, soit inhibitrices. L'origine des contrôles est située dans le mésencéphale au niveau de la substance grise périaqueducule et dans la médulla au niveau du noyau du raphé magnus et du noyau latéral de la formation réticulée.

Au niveau spinal la transmission des messages nociceptifs est réglée par un effet de balance entre des influences excitatrices (d'origine périphérique) et des influences inhibitrices (d'origine périphérique ou supraspinale).

Au niveau périphérique le contrôle s'exerce soit directement sur le site, soit sur le corps cellulaire localisé dans le ganglion rachidien. Dans les deux cas, il pourra en résulter une modification de transfert des informations vers les centres.

2.4.3.2 Modulation de la douleur viscérale chez la femme

La douleur viscérale est le symptôme dominant dans le SII et constitue une des critères majeurs pour le diagnostic de cette pathologie. L'apparition de SII est dépendante du sexe et de l'âge de la population. Dans les pays industrialisés la proportion des femmes souffrant de SII est deux à trois fois plus fréquente par rapport aux hommes. En plus, la majorité des femmes souffrant de SII sont en âge de reproduction, ultérieurement, après l'âge de 40 ans, la prévalence de SII décroît progressivement, pour atteindre dans la septième décennie de la vie des taux d'incidence similaires aux hommes (Heitkemper and Chang 2009). En revanche, l'incidence de la maladie chez les hommes reste constante entre 20 et 69 ans. Ces données soulignent l'incidence du statut hormonal dans l'étiologie et la symptomatologie de SII. De plus, chez les patientes SII, la perception de la douleur viscérale est amplifiée par rapport à leurs homologues masculins. Cette différence est due à une diminution du seuil de sensibilité pour des volumes égaux de distension rectale (induite par la distension d'un ballon au niveau du rectum et contrôlée à l'aide d'un barostat), avec en plus pour les femmes une sensibilisation accrue à l'application répétée de stimuli douloureux (Chang et al. 2006). Enfin, l'intensité de la douleur viscérale présente des variations considérables au cours du cycle menstruel (Figure 14). Ces variations se traduisent par une douleur viscérale qui apparaît progressivement en début de la phase lutéale, s'aggrave dans la période pré-menstruelle (les jours qui précèdent le début des règles) et atteint l'intensité maximale au début des menstruations (Heitkemper et al. 2003), période caractérisée par l'écroulement des taux circulants d'oestrogènes et de progestérone.

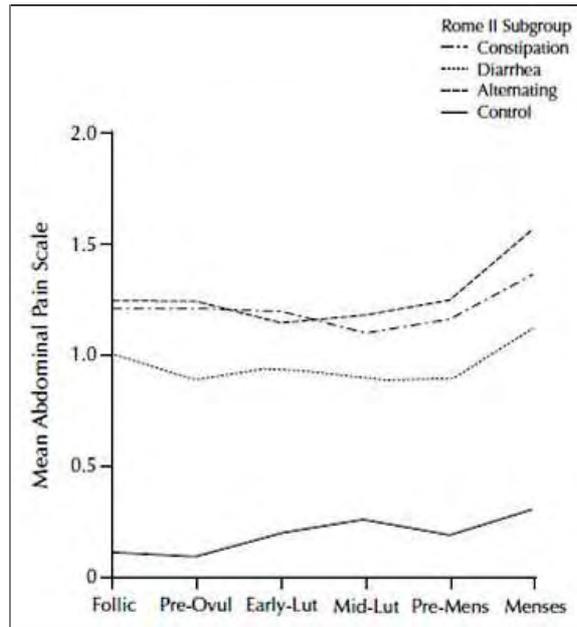


Figure 14: Variations de la douleur abdominale au cours du cycle menstruel chez les patientes souffrantes du SII (différents sous-groupes selon les critères de Rome II - constipés, diarrhéiques, alternés).

Follic – phase folliculaire ; Pre-Ovul – phase préovulatoire ; Early-Lut – phase lutéale précoce ; Mid-Lut – phase mi-lutéale ; Pre-Mens – phase de pré-menstruations ; Menses – menstruations (Heitkemper et al. 2003)

2.4.3.3 Oestrogènes et sensibilité viscérale – apport des études animales

Les études sur modèles animaux ont permis de mieux comprendre le rôle des hormones sexuelles dans la sensibilité viscérale, tout en soulignant des différences par rapport à l'espèce humaine. En effet, des travaux récents montrent qu'en conditions basales chez la rate, le seuil de sensibilité viscérale varie au cours du cycle sexuel (Ji et al. 2008). Ce seuil de sensibilité est diminué en proestrus (moyenne de 15 mm Hg) sous dominance œstrogénique, par rapport au diestrus (25 mm Hg) sous dominance progestéronique, une observation à l'inverse de la symptomatologie chez la patiente SII, où pour rappel, la perception de la douleur abdominale est exacerbée en fin de cycle lorsque les taux circulants d'oestrogènes s'écroulent (voir plus haut). De plus, la magnitude de la réponse viscérale à des stimuli équivalents est plus importante chez les rates en proestrus par rapport aux femelles en diestrus (Ji et al. 2008). Cette différence apparaît essentiellement due à l'action des oestrogènes, non à celle de la progestérone. Les études montrent que l'administration seule d'oestradiol chez la rate OVX induit une hypersensibilité viscérale en conditions basales (Ji et al. 2003) et inflammatoires (Bradesi et al. 2003; Ji et al. 2005). Pour l'intestin, si les avis concernant l'influence des oestrogènes circulants sur la

sensibilité viscérale sont unanimes, les effets résultants (pro- ou antinociceptifs), le mécanisme d'action (rapide ou génomique) et le type de récepteurs impliqués (ER α , β ou ER membranaire) restent controversés.

Les deux types de ERs nucléaires sont présents dans les compartiments du système nerveux impliqués dans la modulation de la réponse nociceptive. Tant ER α que ER β a été mis en évidence dans la moelle épinière et dans les ganglions rachidiens, mais également dans les zones du cerveau capables de moduler la réponse au stress et à la douleur, telles que l'hypothalamus, l'amygdale, le noyau du raphé dorsal et la substance grise périaqueducale (Shughrue et al. 1997; Papka et al. 2001). Souvent les deux récepteurs peuvent coexister dans certains neurones sensoriels, ce qui pourrait expliquer la difficulté actuelle de définir le rôle exact de chaque type dans la physiopathologie de la douleur. Des études sur des souris invalidées pour ER β mettent en évidence son implication dans l'exacerbation de la réponse à la douleur (Spooner et al. 2007). Une réduction de la réponse viscérale suite à l'injection de formaldéhyde est observée chez les souris ER $\beta^{-/-}$ en comparaison des sauvages et cet effet est associé à une diminution de l'expression de la protéine c-Fos au niveau spinal, plus exactement au niveau des lamina I-II et IV-V (Spooner et al. 2007). Une autre étude montre que l'invalidation de ER α ou ER β chez la souris induit une altération similaire de la réponse à la douleur (Li et al. 2009a), ce qui suggère l'implication des deux isoformes. De plus, la perte des ERs efface le dimorphisme sexuel. Malgré des phénotypes similaires (en ce qui concerne la nociception) entre les deux lignés de souris (ER $\alpha^{-/-}$ ou ER $\beta^{-/-}$), le rôle exact de chaque type de récepteur reste encore inconnu. Certaines études soutiennent l'hypothèse que les effets des oestrogènes sur la sensibilité viscérale ne sont pas génomiques, mais s'installent rapidement et impliquent les récepteurs membranaires des oestrogènes, plus exactement le GPR30 (Lu et al. 2007; Li et al. 2009a).

Enfin, le GPR30 est également exprimé dans le cerveau, la moelle épinière, les ganglions nerveux autonomes et sensoriels, sans différence entre les sexes. Pour l'intestin, Lu et collaborateurs ont montré que les oestrogènes modulaient l'hypersensibilité viscérale induite par le 5-hydroxytryptofane chez le rat *via* le récepteur GPR30, un effet qui n'impliquerait pas les récepteurs nucléaires aux oestrogènes, car insensible à leur antagoniste, le ICI 182,780 (Lu et al. 2007).

CHAPITRE III

BISPHENOL A – XENOESTROGÈNE ET PERTURBATEUR ENDOCRINIEN

Le bisphénol A (BPA) est le nom usuel du 4,4'-dihydroxy-2,2-diphénylpropane. Le BPA est composé de deux cycles aromatiques (phényles) liés par un pont carbone et appartient à la famille des diphénylaminés hydroxylés, ou bisphénols (Figure 15). Découvert par le chimiste russe Alexandre Dianin en 1891, cette molécule provient de la condensation de l'acétone avec deux phénols. La réaction est catalysée par l'acide chlorhydrique ou par une résine de polystyrène.

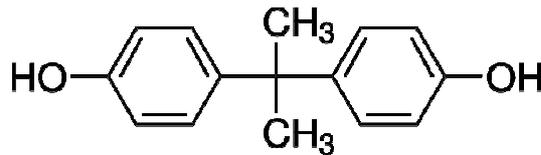


Figure 15: Structure chimique du bisphénol A

Le BPA a été très étudié dans les années 1930, dans la recherche d'oestrogènes de synthèse pour prévenir chez la femme les fausses couches et les menaces d'accouchements prématurés. Le BPA a été la première molécule synthétique décrite ayant une activité modulatrice sélective sur les ERs. Mais cette perspective d'une utilisation clinique du BPA a été abandonnée avec la découverte en 1938 du diéthylstilbestrol (DES), une molécule possédant une meilleure affinité pour les ERs et une activité oestrogénique plus importante que le BPA.

3.1 L'origine et les sources de production du Bisphénol A

Le BPA est largement présent dans notre environnement quotidien. Sa production mondiale est estimée à environ 3 millions de tonnes par an. Dans l'Union européenne, la quantité produite de BPA s'élève à hauteur de 700 000 tonnes par an. D'après les données

de 2005 et 2006, les quantités du BPA utilisées dans l'Union européenne sont d'environ 1,15 million de tonnes par an.

Le BPA est utilisé comme monomère dans la fabrication des plastiques de type polycarbonate et des résines époxy-phénoliques (ou BADGE : Bisphénol A Diglycidil Ether). Selon *Plastics Europe*, le polycarbonate possède des caractéristiques exceptionnelles telles que la biocompatibilité, la facilité de stérilisation, la résistance à la chaleur, la transparence, la résistance au feu et une bonne malléabilité, ce qui explique son usage à grande échelle. Le polycarbonate entre dans la composition d'un très grand nombre d'objets courants, comme les disques compacts (CD), les lunettes (verres et montures), certaines bouteilles d'eau et de lait recyclables, des conteneurs d'eau réutilisables, des biberons, ainsi que de la vaisselle pour four à micro-ondes. Le BPA est également utilisé dans les canalisations d'adduction d'eau potable où les résines BADGE protègent contre la corrosion, tout en offrant une bonne stabilité thermique et de résistance mécanique. Les résines époxy-phénoliques sont également présentes dans le revêtement intérieur des canettes et des boîtes des conserves, ainsi que sous les couvercles métalliques des pots et bouteilles en verre. Ces résines sont également utilisées pour les amalgames dentaires. Le BPA est également utilisé comme inhibiteur de polymérisation pour le PVC (également utilisé dans la distribution d'eau potable), comme antioxydant dans les plastifiants ou encore comme agent actif utilisé pour fabriquer le film d'impression des papiers thermosensibles.

La présence du BPA dans les plastiques peut être repérée par le chiffre **3** (PVC), **7** (autres) ou **PC** (polycarbonate) au centre ou en dessous du symbole de recyclage.

3.2 Quelles voies d'exposition pour l'homme ?

3.2.1 L'exposition *via* l'environnement

Le BPA est retrouvé dans l'environnement, résultat d'une contamination à chaque étape de sa production, de sa transformation et de son utilisation. Ainsi, le BPA a été détecté dans les eaux de surface et les eaux souterraines, notamment dans des zones de pompage destinées à la distribution d'eau potable. Les concentrations en BPA mesurées dans les rivières des nombreux pays industrialisés sont inférieures ou égales à 8 ng/ml (Belfroid et al. 2002; Kang et al. 2006b). Dans les eaux salées, le BPA peut persister plus

longtemps que dans les rivières sans aucune dégradation (environ 30 jours comparé aux 3-5 jours dans les rivières), augmentant sa présence dans les organismes marins, devenant une source supplémentaire de contamination pour l'homme avec les fruits de mer et poissons (Basheer et al. 2004). Le BPA a également été mesuré en quantités non négligeables dans les eaux usées, des boues et des biosolides provenant d'installations municipales et industrielles.

Des études montrent la présence du BPA dans l'air à des concentrations allant de 2 à 208 ng/m³ (Rudel et al. 2001). Ainsi les voies respiratoires sont une source possible d'exposition au BPA, mais les quantités inhalées restent faibles. Cependant, cette voie pourrait être considérée une source importante pour les employés de l'industrie du plastique.

Enfin, le BPA peut être adsorbé au niveau des sols et des sédiments où il est plus concentré que dans les eaux de surface. La demi-vie du BPA dans les sols est inférieure à 3 jours (Fent et al. 2003). Néanmoins, dans les zones à forte densité de population humaine, la contamination des sols par le BPA est entretenue par les déchets domestiques et industriels (Kawahata et al. 2004).

3.2.2 L'exposition *via* l'alimentation

Si le BPA est très largement répandu dans l'environnement (air, eau, sol), la principale source d'exposition au monomère pour l'homme reste la voie orale, *via* la consommation des aliments et boissons ayant été conditionnées dans des emballages fabriqués à partir de BPA polymérisé. Par exemple, la polymérisation incomplète des résines BADGE génère des monomères du BPA qui migrent vers les aliments ou les liquides. Le taux de migration dépend directement des conditions de stockage et d'utilisation, comme la température et le temps de chauffage, la durée de conservation et le pH des aliments. Ainsi le chauffage à des températures élevées lors de la stérilisation (biberons) ou de l'appertisation (procédé d'autoclavage après la mise en conserve) accroît considérablement le passage du monomère, auquel vient s'ajouter sa migration dans le cas de stockage de produits alimentaires acides, aboutissant à augmenter les concentrations de BPA libre dans le produit consommé (Kang et al. 2006b; Vandenberg et al. 2007a). La température est probablement le facteur clé dans la migration du BPA : par exemple le chauffage à 121°C pendant 30 minutes cause une migration 5 fois plus importante qu'un chauffage à 105°C pendant la même période (Kang et al. 2006b). Yoshida et les collègues

ont également montré que la concentration en BPA était plus importante dans la phase solide comparée à la phase liquide des produits en conserve (Yoshida et al. 2001). Il est admis que le BPA migre du revêtement intérieur vers la phase aqueuse, pour ensuite se stocker dans la phase solide du produit.

Âge du consommateur	Aliments/boissons consommés	Exposition alimentaire au BPA d'après une valeur protectrice de migration en microgramme/kg de poids corporel/jour (les chiffres entre parenthèses représentent l'exposition d'après une valeur de migration typique)
Nourrisson de 3 mois	Lait maternel uniquement	0,2
Nourrisson de 3 mois	Formule infantile administrée dans un biberon en verre ou sans polycarbonate	2,3
Nourrisson de 3 mois	Formule infantile administrée dans un biberon contenant du polycarbonate	11* (4 [#])
Nourrisson de 6 mois	Formule infantile administrée dans un biberon contenant du polycarbonate + aliments/boissons du commerce	13* (8,3 [#])
Enfant d'un an et demi	2 kg d'aliments du commerce/boissons	5,3
Adulte	3 kg d'aliments du commerce/boissons	1,5

* D'après une valeur supérieure de 50 microgrammes de BPA/litre de lait maternel

D'après une valeur type de 10 microgrammes de BPA/litre de lait maternisé

Figure 16: Table d'exposition alimentaire totale au Bisphénol A à différents âges.
(EFSA 2006)

Chez l'adulte, la consommation de boissons contenues dans les bouteilles en polycarbonate, l'ingestion d'aliments en conserve ou de denrées chauffées aux micro-ondes dans leur emballage plastique se traduit par une exposition journalière au BPA de 1,5 µg/kg de poids corporel (EFSA 2006; 2008; Lim et al. 2009). Les enfants, et en particulier les nourrissons, représentent un groupe à risque avec une forte exposition au BPA, en raison de leur plus faible masse corporelle. Selon certaines estimations, la dose d'exposition au BPA pour les nouveau-nés peut atteindre 24 µg/kg/jour (Vandenberg et al. 2007a) et est approximativement de 11-15 µg/kg/jour pour un nourrisson de 3 mois élevé

au biberon en polycarbonate et/ou nourris de lait maternisé lyophilisé et stocké en conditionnement BADGE (EFSA 2006; Vandenberg et al. 2007a).

Une exposition orale au BPA est également observée après application de résines composites pour combler les caries chez les enfants et les adultes, ou dans le cas de scellement dentaire des premières et secondes molaires permanentes qui apparaissent vers l'âge de 6 et de 12 ans respectivement. Olea et collaborateurs ont ainsi détecté des concentrations élevées en BPA (3,3 - 30µg/ml) dans la salive prélevée 1 heure après l'application des amalgames composés de Bis-glycidyl diméthacrylate et de Bisphénol A-diméthylacrylate (Olea et al. 1996). Toutefois, l'exposition au BPA dans le cadre d'un traitement dentaire représente un événement aigu et transitoire, et marginal par rapport aux autres sources d'exposition orale.

3.2.3 L'exposition cutanée

L'importance de la voie cutanée, considérée négligeable jusqu'à présent, a été mise en évidence très récemment (Biedermann et al. 2010; Zalko et al. 2010). Le BPA est utilisé pour enduire les papiers d'impression thermique : en réagissant à la température, le BPA libère un colorant (lactone) donnant l'encre noire sur les tickets de caisse, relevés bancaires etc... La quantité moyenne du BPA présente dans les tickets de caisse est estimée à environ 13,3 g/kg de papier. L'usage répété de 10 heures par jour de tickets de caisse (le cas d'une exposition professionnelle) provoquerait une absorption quotidienne de 71µg du BPA par le seul passage transcutané (Biedermann et al. 2010), favorisé par des mains humides et, même après lavage, des quantités résiduelles de BPA peuvent être détectées sur l'épiderme (Biedermann et al. 2010).

3.3 Imprégnation des populations

Le BPA a été mesuré dans les tissus et les liquides humains des populations des pays industrialisés, à une concentration moyenne comprise entre 0,1 et 10nM.

Mesures dans le sang : les concentrations plasmatiques de BPA libre ont été déterminées en utilisant diverses techniques comme la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC), la chromatographie en phase gazeuse couplé à la spectrométrie de masse (GC-MS) et la réaction ELISA. Les niveaux sériques en BPA dans la population

adulte ont été estimés du 0,2 à 20 ng/ml (Inoue et al. 2000; Ikezuki et al. 2002; Hiroi et al. 2004; Vandenberg et al. 2007a). Une étude récente effectuée sur 300 femmes coréennes a détecté des valeurs du BPA allant jusqu'à 60 ng/ml (Lee et al. 2008). Malgré les nombreuses mesures du BPA sérique chez l'adulte, il n'existe pas de relevés équivalents pour les nourrissons. Or, selon les calculs basés sur des modèles toxico-cinétiques, la concentration plasmatique des nouveau-nés est attendue à trois fois supérieure comparée aux adultes (Mielke and Gundert-Remy 2009).

Mesures dans les urines : L'urine est considérée comme le meilleur liquide corporel pour estimer l'exposition humaine au BPA. L'étude effectuée par Calafat et les collègues sur une cohorte américaine de 2 517 personnes âgées de 6 ans et plus ont mis en évidence la présence du BPA dans l'urine de 93% des individus (Calafat et al. 2008). Cette étude montre par ailleurs une variation des niveaux urinaires du BPA en fonction des groupes d'âge, avec des concentrations plus importantes chez l'enfant et diminuant progressivement avec l'âge. Ainsi, la concentration moyenne du BPA pour les 95^e percentiles chez des enfants de 6 à 11 ans est de 4,5 ng/ml, de 3,0 ng/ml pour les adolescents (12 à 19 ans) et pour le groupe de 20 ans et plus de 2,5 ng/ml. Une autre étude a décelé des niveaux urinaires du BPA 10 fois plus élevés chez les nourrissons prématurés en soins intensifs par rapport à la population adulte (Calafat et al. 2009). Aucune différence significative n'a pas été observée entre les sexes. Le fait que de jeunes enfants soient plus exposés au BPA par rapport aux adultes a également été vérifiée en Allemagne, où une récente étude sur 599 enfants âgés de 3 à 14 ans a détecté des taux élevés de BPA (3,5 ng/ml) chez les 3 à 5 ans (Becker et al. 2009).

Une condition de vie particulière pouvant modifier les niveaux urinaires en BPA est la grossesse. Une étude réalisée au centre de fertilité de Massachusetts a déterminé chez 45 femmes avant leur grossesse une concentration urinaire de BPA en moyenne de 1,09 ng/ml. Après l'installation de la grossesse, cette concentration de BPA a augmenté de 33% chez ces mêmes femmes (Mahalingaiah et al. 2008). Des concentrations élevées de BPA chez les femmes enceintes comparées à la population générale ont été récemment confirmées sur une cohorte de 100 femmes norvégiennes, les taux urinaires allant jusqu'à 4,5 ng/ml (Ye et al. 2009). Ces observations sont considérées comme inquiétantes en tant qu'indicateur d'exposition précoce au BPA pour le fœtus humain.

En se basant sur les niveaux urinaires du BPA (Calafat et al. 2008) et à l'aide de modèles pharmacocinétiques, les dernières estimations d'absorption journalière du BPA donnent pour un adulte une valeur d'exposition d'environ 50,5 ng/kg/jour, contre 67,4 ng/kg pour un enfant âgé de 6 à 11 ans (Lakind and Naiman 2008).

Mesures dans le lait maternel et le liquide amniotique : Le BPA est une molécule lipophile qui peut être retrouvé dans les graisses et le lait maternel. Le BPA a été décelé dans le lait maternel à des concentrations moyennes allant de 0,61 à 1,1 ng/ml (Sun et al. 2004; Ye et al. 2006). Des quantités plus importantes (3,41 ng/ml) ont été retrouvés dans le colostrum, dans les trois premiers jours après l'accouchement (Kuruto-Niwa et al. 2007), confirmant l'exposition de l'enfant par sa mère.

Le BPA a également été mesuré dans le liquide amniotique au cours d'amniocentèses, effectuées avant la 20^{ème} semaine de grossesse. Les concentrations détectées ont varié de 0,5 à 1,96 ng/ml (Engel et al. 2006). Enfin, Ikezuki et coll. ont détecté des niveaux très élevés en BPA (environ 8,3 ng/ml) dans le liquide amniotique prélevé à 15-18 semaines de grossesse, mais ces valeurs peuvent être discutables compte tenu de la technique utilisée (ELISA) jugée moins spécifique (Ikezuki et al. 2002).

3.4 Mécanismes d'action du Bisphénol A

Le BPA libre (ou BPA parent), de conformation chimique apparentée à l'oestradiol, possède la capacité de se lier aux ER α et β et d'activer une cascade de réactions à l'origine d'une perturbation de l'équilibre hormonal. Il existe en effet des relations bien définies entre les caractéristiques structurales du BPA et son activité biologique (Perez et al. 1998). Pour présenter des propriétés œstrogéniques, une molécule doit présenter deux caractéristiques essentielles : un groupement aromatique hydroxyle (cycle phénolique) et un squelette hydrophobe. Le groupement hydroxyle est fondamental pour l'activité hormonale. Le second groupement fonctionnel à base d'oxygène (hydroxyle, cétone, ou carbonyle) lui confère, ou du moins augmente l'activité œstrogénique. Le BPA possède deux groupements hydroxyles, donc les deux caractéristiques essentielles pour se fixer sur les ERs (Figure 17). De plus, le BPA possède deux groupements méthyls qui renforcent l'activité œstrogénique. Par ailleurs, des études ont montré que le remplacement des groupements méthyls par des groupements hydrophiles provoque une baisse de l'activité œstrogénique du BPA (Perez et al. 1998).

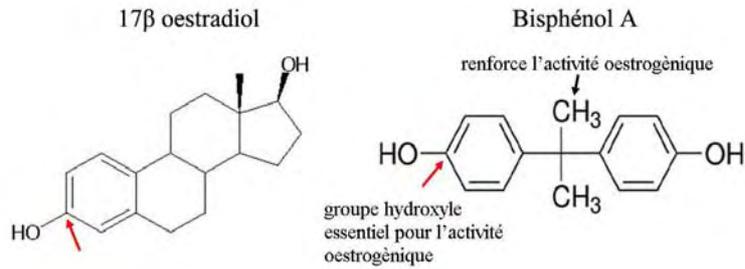


Figure 17: Relation entre structure chimique du Bisphénol A et activité oestrogénique.

Les études de liaison ligand-récepteur ont déterminé que l'affinité relative de liaison du BPA pour ER α est de 0,05 et pour ER β est de 0,33 alors que celle d'oestradiol est de 100 (Kuiper et al. 1997). Malgré cette faible affinité de liaison, les effets biologiques du BPA ont été observés à des concentrations équivalentes à celles des oestrogènes. Ces observations ont suscité des nombreux débats quand au mécanisme d'action du BPA.

Le BPA est considéré comme un SERM (*Selective Estrogen Receptor Modulator*). Les SERM sont des molécules à activité agoniste partielle. Cette activité varie selon le promoteur du gène étudié et selon le tissu considéré. Le BPA, par rapport à l'oestradiol, interagit différemment avec le domaine fixateur du ligand des ERs, puis dans le recrutement de co-activateurs, aboutissant à des différences dans la réponse transcriptionnelle (Routledge et al. 2000; Welshons et al. 2006). Le BPA forme des complexes BPA-ER α ou BPA-ER β . Cependant, malgré une affinité de liaison 10 fois plus faible pour ER β par rapport à ER α , le complexe BPA-ER β possède une capacité du recrutement du coactivateur TIF2 500 fois plus importante par rapport au complexe BPA-ER α , exacerbant le potentiel de perturbateur endocrinien sur des fonctions physiologiques d'organes où l'isoforme ER β est la forme prédominante des ERs.

L'activité du BPA dans chaque tissu dépend du niveau d'expression des ERs et de la balance entre les deux types de récepteurs. Le BPA peut manifester selon les tissus des effets agonistes, antagonistes ou des effets mixtes agonistes - antagonistes sur les ERs. De plus, une même dose de BPA ne présente pas la même amplitude d'action biologique au niveau des tissus cibles (Welshons et al. 2006), soulignant l'importance d'établir des courbes dose - réponse pour chaque organe.

Des études récentes suggèrent que le BPA, en plus de ses effets génomiques, pourrait avoir des effets non-génomiques rapides comme les oestrogènes. Dans le chapitre II, nous avons vu qu'il existait deux hypothèses en ce que concernent les effets non-génomiques, l'une impliquant des récepteurs membranaires de structure similaire aux récepteurs nucléaires, mais localisés à la membrane, l'autre utilisant un récepteur transmembranaire couplé à la protéine G (GPR30). Par exemple, le BPA à des doses très faibles (10^{-12} M) induit rapidement (en moins d'une minute) l'augmentation de calcium intracellulaire, puis la sécrétion de prolactine dans la lignée pituitaire GH3/B6 (Watson et al. 2007). L'inhibition de ces effets par l'antagoniste des ERs classiques (ICI 182,780) combinée au constat de la rapidité du ICI pour inhiber ces effets ont déterminé les auteurs à attribuer le rôle aux ERs membranaires. Cependant, cette hypothèse ne permet pas d'expliquer les effets à de très faibles doses, car il est supposé que le BPA possède une affinité pour les récepteurs membranaires similaire à celle pour les récepteurs nucléaires classiques.

La deuxième hypothèse présente le récepteur transmembranaire GPR30 comme médiateur des effets rapides du BPA, d'autant que le BPA possède une bonne affinité de liaison pour ce récepteur (Thomas and Dong 2006). Sur des lignées cellulaires humaines de testicules JKT-1, le BPA stimule la prolifération cellulaire à des concentrations très faibles (de 10^{-9} to 10^{-12} M) (Bouskine et al. 2009). Dans cette étude, ni le ICI 182,780, ni même l'oestradiol n'ont été capables de reproduire ces effets, alors que le complexe oestradiol-BSA (qui ne traverse pas la membrane cellulaire) a mimé cette activité. Dans cette étude, l'administration de l'antagoniste de GRP30 a bloqué les effets rapides du BPA, démontrant l'implication de ce récepteur transmembranaire couplé à la protéine G.

Autres mécanismes d'action du BPA

Le BPA possède la capacité de se lier à d'autres récepteurs nucléaires, tels que les récepteurs aux hormones thyroïdes et aux androgènes. Le BPA empêche la fixation à son récepteur de l'hormone thyroïdienne T3 (triiodothyronine) et recrute des co-répresseurs, entraînant l'inhibition de l'activité transcriptionnelle dès 10^{-6} M (Moriyama et al. 2002). Le BPA inhibe l'action de la T3 avec une constante d'inhibition (K_i) d'environ 10^{-4} M (Moriyama et al. 2002).

Le BPA possède également un effet antagoniste sur les récepteurs nucléaires aux androgènes, comme la testostérone. L'activité anti-androgénique du BPA est de l'ordre de

10^{-5} à 10^{-7} M (Sohoni and Sumpter 1998; Vandenberg et al. 2009). Le mécanisme par lequel le BPA exerce son activité antagoniste implique l'inhibition de la liaison des androgènes aux récepteurs, la diminution de la translocation de l'AR vers le noyau et la réduction de l'interaction des AR avec ses co-régulateurs (Lee et al. 2003), aboutissant à l'inhibition de l'activité transcriptionnelle.

Enfin, une étude très récente met en évidence la capacité du BPA à se fixer aux récepteurs des glucocorticoïdes (Prasanth et al. 2010), une activité agoniste comparable à celles du cortisol et de la dexaméthasone.

3.5 Métabolisme du Bisphénol A

Le métabolisme du BPA est un facteur essentiel à l'évaluation de la toxicité du xénoestrogène chez l'homme et pour discuter de possibles transpositions des effets observés chez l'animal à l'espèce humaine. Le métabolisme du BPA est étroitement lié à la voie d'exposition. Par voie orale, le BPA est pris en charge par les enzymes du cycle entérohépatique pour sa conjugaison et sa détoxification. La voie métabolique principale du BPA dans toute espèce est la glucuronidation par l'uridine diphosphate glucuronyltransférase (UDPGT) hépatique, conduisant à la formation du métabolite majeure, le conjugué BPA-glucuronide, qui ne possède pas d'activité oestrogénique (Pottenger et al. 2000; Volkel et al. 2002), une forme considérée comme rapidement éliminée dans les urines.

Chez les rats le métabolisme du BPA est différent. Après la glucuronidation du BPA au niveau hépatique, le conjugué est excrété dans la bile et retourne à l'intestin où il est dissocié par la flore bactérienne, retourne ainsi à l'état libre (donc actif), capable de nouveau de se fixer sur les ERs par voie systémique une fois réabsorbé (Sakamoto et al. 2002; Inoue et al. 2003). Des données similaires ne sont pas connues chez l'homme, mais la possibilité d'une dissociation du BPA-glucuronidé au niveau de plusieurs tissus périphériques ne peut être exclue, car du BPA libre est retrouvé dans les urines. En effet, l'enzyme β -glucuronidase, responsable de la déconjugaison du BPA-glucuronidé est présente dans la plupart des tissus humains, en particulier dans le placenta et le foie foetal (Ginsberg and Rice 2009).

La sulfatation est une voie secondaire dans le métabolisme du BPA, tant chez les rongeurs que chez l'homme, avec la génération du métabolite BPA-sulfate qui ne possède pas d'activité oestrogénique. Toutefois cette voie métabolique reste peu étudiée.

Une étude très récente sur des singes et des souris apporte des nombreux détails dans le métabolisme du BPA et ajoute une controverse à la détoxification rapide du BPA dans l'espèce humaine (Taylor et al. 2010). Dans un premier temps, le BPA n'apparaît pas métabolisé rapidement au niveau hépatique, car des niveaux plasmatiques élevés du monomère libre (donc actif au plan hormonal) ont été détectés à 8 et 12 heures après l'administration orale chez le singe. De plus, l'activité de l'enzyme UGT chez les souris nouveau-nées est 4 fois inférieure à celle des adultes, témoignant d'une exposition postnatale au BPA actif plus important qu'à l'âge l'adulte. Dans un deuxième temps, le métabolisme chez le rongeur apparaît comparable à celui du primate sur la base des données pharmacocinétique, notamment une clearance du BPA libre pendant 24 heures similaire entre le singe et la souris, et similaire aux valeurs mesurées chez l'homme. Enfin, les auteurs suggèrent que la population humaine est exposée à des doses très supérieures à celles connues à présent, supposée le résultat de l'additivité des sources d'exposition, en plus de la voie orale.

3.6 Bisphénol A et période périnatale : une fenêtre critique d'exposition

Il existe aujourd'hui un consensus pour présenter la période périnatale comme période à risque en ce que concerne l'exposition aux perturbateurs endocriniens, en particulier au BPA. La présence du BPA dans le liquide amniotique et les tissus fœtaux confirme la capacité du BPA à traverser la barrière placentaire (Zalko et al. 2003), autorisant une exposition très précoce au xénoestrogène. Cependant, le fœtus ne possède pas l'équipement enzymatique nécessaire pour neutraliser le contaminant, les enzymes responsables de la conjugaison du BPA (glucuronidase) n'étant suffisamment exprimées dans les microsomes hépatiques humains avant la naissance (Coughtrie et al. 1988; Ring et al. 1999). Une grande partie des enzymes de la glucuronidation n'apparaît qu'après la naissance, tout en restant à des niveaux d'expression moins élevés que chez l'adulte (Coughtrie et al. 1988; Taylor et al. 2010). Ainsi l'exposition fœtale au BPA est considérée comme facteur du risque dès les faibles doses.

Certaines études montrent qu'en période périnatale la voie métabolique majeure pour le fœtus est la sulfatation, ce qui permettrait une première étape de neutralisation du BPA en l'absence d'une activité suffisante de glucuronidation (Strolin Benedetti and Baltes 2003; EFSA 2008). Malgré la présence de cette voie de transformation, le fœtus ne serait pas pour autant protégé d'une perturbation hormonale, en raison de la présence de l'enzyme arylsulfatase-C, largement répandue dans les tissus oestrogéno-sensibles, et capable de générer du BPA libre, donc actif dans l'organisme en développement (Ginsberg and Rice 2009). De plus, en période fœtale puis dans les premiers jours du nouveau-né, l'organisme est protégé de l'action des œstrogènes maternels grâce à la présence de l' α -foetoprotéine. Comme vu plus haut, cette protéine a pour rôle de fixer les œstrogènes pour bloquer, voire tamponner leurs effets biologiques non désirables à cette période. Or le BPA n'est pas complexé par l' α -foetoprotéine humaine, et reste donc efficace pour perturber le système endocrinien fœtal (Milligan et al. 1998).

3.7 Bisphénol A et risques sanitaires

3.7.1 Etudes animales

En toxicologie, les études sur l'animal de laboratoire permettent de déterminer l'effet d'une molécule dans un organisme entier, fonction par fonction, selon différentes voies d'exposition déterminées par la voie primaire de contamination par le produit (orale, cutanée, respiratoire), dans différentes périodes de vie (exposition pré-, péri- ou postnatale). En toxicologie réglementaire, la sélection des valeurs toxicologiques de référence d'un produit (dose journalière admissible (DJA) pour l'homme) est obtenue sur la base de la dose expérimentale sans effet nocif constaté chez l'animal (*No Observed Adverse Effect Level* ou NOAEL), après application d'un facteur d'incertitude (généralement 100) tenant compte de la variabilité inter-individuelle et de la différence interspèce. Pour le BPA, la NOAEL constatée sur des fonctions sensibles à l'oestradiol (reproduction) a été fixée par les agences sanitaires européennes à 5 mg/kg/j, pour une DJA établie à 50 μ g/kg/j.

Les études les plus récentes alertent cependant les autorités sanitaires sur des effets du BPA observés à des doses égales et inférieures aux doses références.

3.7.1.1 Effets sur la reproduction et le développement

L'exposition prénatale au BPA (i.e. pendant la vie fœtale) s'accompagne, dès la naissance et jusqu'à l'âge adulte, de troubles de la fonction de reproduction et du développement des organes génitaux. Des souris mâles exposées pendant la gestation au BPA (2-20 µg/kg/jour p.o. chez la mère) présentent un développement anormal de la prostate, caractérisé par une augmentation du nombre et de la taille des canaux prostatiques, du volume total de la prostate, ainsi qu'une malformation de l'urètre (Timms et al. 2005), ou encore une diminution du poids des épидидymes et de la production spermatique journalière (vom Saal et al. 1998).

Pour la descendance femelle, une exposition *in utero* chez la souris (de 1 à 1 000 µg/kg/jour s.c.) provoque des lésions au niveau des ovaires et de l'utérus, telles que des kystes ovariens, une hyperplasie atypique de l'utérus et des polypes utérins (Newbold et al. 2009). Une autre étude toujours chez la souris (0,025 et 0,25 µg/kg/jour s.c.) rapporte des altérations de la morphologie ovarienne, une diminution du volume de l'endomètre, une hyperprolifération cellulaire de l'épithélium glandulaire de l'utérus et une expression plus importante des récepteurs ERα et à la progestérone dans l'épithélium utérin (Markey et al. 2005). Aux doses plus importantes (0,25, 25 et 250 mg/kg/jour, s.c.), le BPA en période prénatale induit dans la descendance femelle des modifications morphologiques de la glande mammaire, caractérisées au niveau stromal par une maturation précoce du coussinet adipeux et une altération de la localisation du collagène, tandis qu'au niveau épithélial les auteurs ont observé une diminution de la taille cellulaire et un retard dans la formation de la lumière (Markey et al. 2001; Vandenberg et al. 2007b). Ces souris présentent aussi des modifications de l'expression génique, caractérisées par une altération du ratio de la synthèse d'ADN entre l'épithélium et le stroma, suggérant le début d'un processus néoplasique.

L'exposition en période périnatale (4-400 mg/kg/jour administrés aux mères gestantes et allaitantes) induit chez le mâle adulte un déséquilibre dans l'homéostasie de la testostérone, traduit par une augmentation significative de sa concentration plasmatique (Watanabe et al. 2003). L'exposition périnatale aux doses plus faibles (20 et 200 µg/kg/jour p.o.) provoque chez les rats adultes une diminution du poids de l'épидидyme, ainsi qu'une diminution du nombre des spermatozoïdes (Howdeshell et al. 2008).

Pour la descendance femelle, l'exposition périnatale au BPA chez la souris (0,5 à 10 mg/kg/jour s.c.) s'accompagne de pubertés précoces (Nikaido et al. 2004) ou induit des perturbations du cycle oestral et une diminution des niveaux plasmatiques de LH (1,2 mg/kg/jour p.o.) (Rubin et al. 2001). Dans cette même espèce, le BPA administré aux mères (0,01 à 1 mg/kg/j s.c.) est également responsable de modifications dans la morphologie ovarienne et utérine, caractérisées par des lésions bénignes dans l'oviducte et des hyperplasies kystiques de l'endomètre. Les pathologies les plus sévères se traduisent par des adénomyomes et léiomyomes, des hyperproliférations et hyperplasies atypiques. D'autres travaux montrent que ces effets perturbateurs du BPA résultent d'altérations au niveau génomique. En effet, le traitement BPA (0,05 et 20 mg/kg/jour s.c.) en période périnatale peut inhiber l'expression de gènes *Hox* dans l'utérus des rongeurs (Varayoud et al. 2008). Les gènes *Hox* sont des morphogènes impliqués dans le développement de l'utérus et associés à des processus endocriniens, tels que la prolifération de l'endomètre et la différenciation dans l'utérus des adultes.

Enfin l'**exposition directe à l'âge adulte** (i.e. exposition postnatale) se traduit par une diminution de la biosynthèse des androgènes par les cellules de Leydig (2,4 µg/kg/j) (Akingbemi et al. 2004). Cette déficience hormonale s'accompagne d'une diminution de la production de spermatozoïdes et d'une hypertrophie de la prostate ventrale, associée à une augmentation du facteur de croissance IGF1 (3 mg/kg/j, s.c.), suggérant encore une implication du xénoestrogène dans des processus néoplasiques (Herath et al. 2004).

3.7.1.2 Effets sur le développement du système nerveux et le comportement

L'exposition au BPA pendant le développement est capable d'induire des modifications d'expression de certains récepteurs au niveau du système nerveux, en particulier les ERs. Ainsi, aux doses de 25 et 250 µg/kg/jour (s.c.), le BPA induit chez les rats mâles une surexpression de l'ARNm codant pour ERβ dans l'aire préoptique de l'hypothalamus (Ramos et al. 2003), les femelles n'ayant par contre pas été examinées dans cette étude. Cependant, d'autres travaux rapportent qu'une dose équivalente de BPA (40 µg/kg/jour, p.o.) pendant la période du développement induit chez les femelles à l'âge adulte une surexpression de ERα dans les neurones de l'aire préoptique de l'hypothalamus (Ceccarelli et al. 2007), sans savoir s'il s'agit là d'un dimorphisme d'effet lié au sexe. A ce sujet, l'exposition périnatale au BPA (0,03 et 1,5 mg/kg/j, p.o) induit une augmentation du

volume du *locus coeruleus* chez les mâles, contre une diminution chez les femelles (Kubo et al. 2003), sans savoir si ces altérations sont liées à un déséquilibre du ratio ER α /ER β dans le cerveau.

Récemment, une étude sur les primates a montré que l'exposition à l'âge adulte au BPA (50 μ g/kg/jour, s.c) bloquait la synaptogenèse induite par l'oestradiol dans l'hippocampe et le cortex préfrontal (Leranth et al. 2008), un effet susceptible d'avoir des conséquences en termes de comportement. Les études sur le comportement font appel à différents tests : nage forcée, planche à trous, labyrinthe surélevé. On sait par exemple que l'exposition au BPA induit chez le rongeur des modifications de l'activité locomotrice et exploratoire, ou encore de l'apprentissage. L'exposition au BPA pendant la gestation induit des modifications du comportement maternel et de la réponse à la douleur, du comportement impulsif dans les deux sexes, synonyme d'anxiété (Aloisi et al. 2002; Richter et al. 2007).

3.7.1.3 Effets sur le métabolisme

De plus en plus d'études mettent en évidence un lien entre obésité et exposition au BPA. L'équipe d'Ana Soto a été parmi les premières à rapporter cet effet obésogène, montrant que l'exposition périnatale au BPA (0,1 mg/kg/jour et 1,2 mg/kg /jour p.o.) augmentait la masse corporelle des rats femelles et mâles à l'âge adulte (Rubin et al. 2001). Curieusement, ces effets du BPA ont été plus marqués à la dose la plus faible, une notion que l'on retrouve dans de nombreuses études (effet dose-réponse « non monotone ») et passée inaperçue dans les études de toxicologie réglementaire, autre source de controverses. L'exposition périnatale au BPA (1 μ g/ml et 10 μ g/ml dans l'eau de boisson des mères) s'accompagne également d'une accumulation de tissu adipeux et de niveaux plasmatiques élevés de leptine et de cholestérol total dans la descendance (Miyawaki et al. 2007). Ces effets s'accompagnent d'une hypertrophie des adipocytes, ainsi que d'une surexpression des gènes de la lipogenèse (LPL- lipoprotéine lipase, FAS –acide gras synthase, SCD-1c –*sterol regulatory element binding protein-1C*) (Somm et al. 2009).

L'exposition directe de souris adultes pendant 4 jours au BPA (10 μ g/kg/jour, s.c.) augmente le contenu des cellules β -pancréatiques en insuline dès le deuxième jour de traitement, perturbant ainsi le métabolisme glucidique (Alonso-Magdalena et al. 2006). Puis ces animaux développent une hyper-insulinémie chronique, accompagnée d'une insulino-résistance périphérique, caractéristique du diabète de type II.

3.7.2 Etudes épidémiologiques

Rares sont les études épidémiologiques ayant cherché à déterminer l'impact du BPA sur la santé humaine, basées sur une corrélation entre l'incidence croissante de pathologies d'origine multifactorielle (diabète, obésité, maladies cardio-vasculaires) et l'exposition au monomère. Les plus récentes et importantes études ont été réalisées par le NHANES (*National Health and Nutrition Examination Survey*) sur une cohorte de 1455 et 1493 sujets couvrant les périodes de 2003-2004 et 2005-2006 (Lang et al. 2008; Melzer et al. 2010). Ces deux études réalisées sur une population âgée de 18 à 74 ans ont corrélé le constat de maladies chroniques aux concentrations urinaires de BPA total, ainsi que certains marqueurs plasmatiques de la fonction hépatique, de l'homéostasie glucidique et du métabolisme lipidique. Dans les deux cohortes, les études ont conclu à des concentrations urinaires plus élevées en BPA chez les patients atteints de maladies cardiovasculaires (maladie coronarienne, infarctus du myocarde et angine pectorale) (Figure 18). Des taux urinaires élevés de BPA sont également retrouvés chez les individus obèses (index de masse corporelle supérieur à 35) par rapport aux individus normopondéraux (6,93 vs 3,91 ng/ml, respectivement), tout en soulignant une tendance importante mais non significative dans la corrélation positive entre le BPA total dans l'urine et la fréquence du diabète de type II (Lang et al. 2008). Dans ces deux études, des concentrations urinaires élevées en BPA accompagnent une augmentation des concentrations plasmatiques en γ -glutamyl transférase, alcaline phosphatase et en lactate déshydrogénase, témoignant d'un dysfonctionnement hépatique.

D'autres études épidémiologiques, effectuées toutefois sur des populations moins importantes, rapportent une corrélation entre l'exposition au BPA et un déséquilibre dans la fonction de reproduction, masculine et féminine. Takeuchi et collaborateurs ont observé chez les femmes souffrant du syndrome d'ovaire polykystiques des concentrations plasmatiques élevées de BPA par rapport à la population normale ($1,05 \pm 1,01$ ng/ml vs $0,71 \pm 0,09$ ng/ml, respectivement) (Takeuchi et al. 2004). Les auteurs ont également constaté une association entre les taux sériques de BPA et la concentration en hormones androgènes (testostérone, androstènedione et DHEA). Une étude effectuée dans une clinique des Massachusetts sur 167 hommes a montré que des concentrations élevées de BPA étaient associées à une augmentation des taux plasmatiques de FSH et une diminution des taux d'inhibine B (marqueur de l'activité des cellules de Sertoli impliquées dans la spermatogenèse), ainsi qu'une réduction du ratio oestradiol/testostérone (marqueur de

l'activité aromatasase) (Meeker et al. 2010). Très récemment, une étude chinoise sur 164 travailleurs exposés au BPA a révélé un dysfonctionnement de la fonction sexuelle parallèle aux taux élevés de BPA urinaire, caractérisé par une diminution de la libido, des fonctions érectiles et de la puissance d'éjaculation (Li et al. 2010).

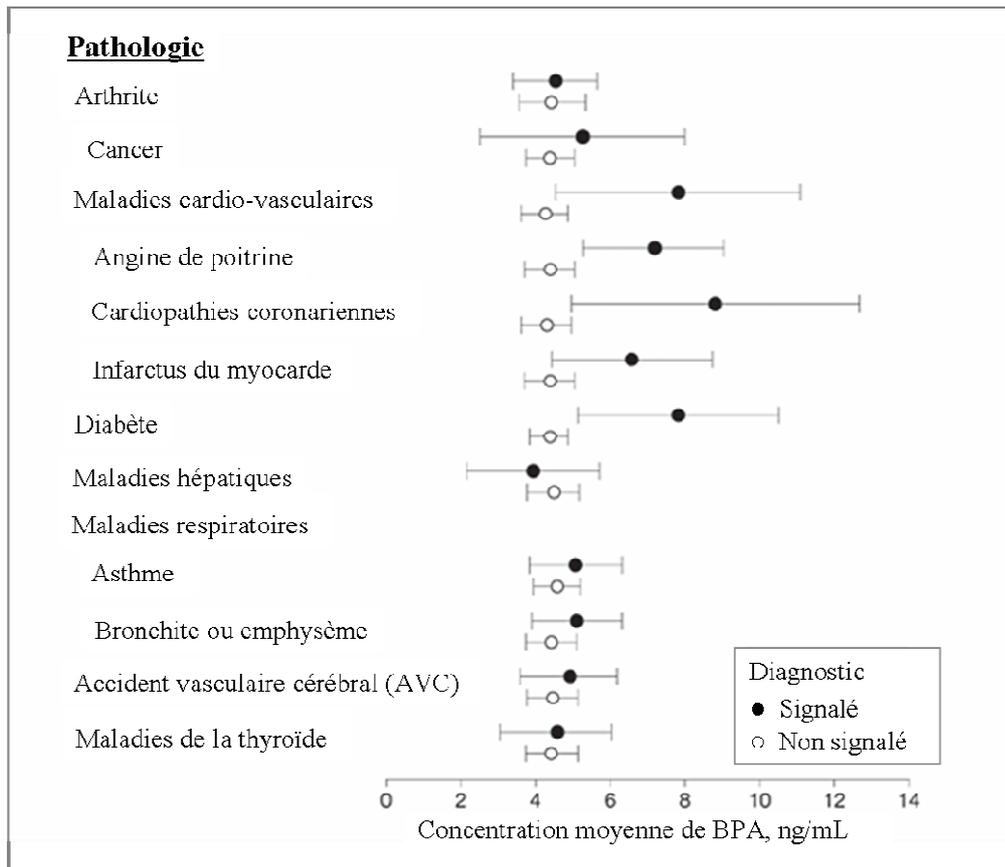


Figure 18 : La corrélation entre les concentrations urinaires de Bisphénol A et la présence de certaines pathologies.
(Lang et al. 2008)

Cet ensemble de données épidémiologiques ne permet pas d'établir définitivement un lien causal entre l'exposition populationnelle au BPA et l'étiologie de maladies chroniques pour l'homme. Par contre, le constat que ces mêmes pathologies, entre autres, apparaissent chez l'animal exposé très tôt dans la vie aux faibles doses de BPA est à l'origine du débat scientifique et politique actuel, conduisant aujourd'hui les autorités sanitaires à reconsidérer les grilles d'évaluation toxicologique dans le domaine des perturbateurs endocriniens.

3.8 Position des autorités réglementaires et politiques

L'utilisation à l'échelle mondiale du BPA dans le *packaging* alimentaire, sa capacité de migration vers l'aliment et boissons et la présence d'effets délétères sur certaines fonctions de l'organisme a déterminé l'implication de l'Etat, de l'Union Européenne ou d'ONG dans l'évaluation du risque sanitaire. La NOAEL est la dose de référence en toxicologie, considérée comme sans effet des fonctions biologiques.

3.8.1 Législation européenne

Les premières évaluations sur la dangerosité du BPA au niveau européen ont été effectuées en 1986 par le comité scientifique de l'alimentation humaine (CSAH ou SCF en anglais). A cette période, le CSAH avait établi une DJA de 0,05 mg/kg/jour (European Commission 2002). Ces estimations étaient basées sur des études effectuées chez des rongeurs exposés pendant 90 jours au BPA par voie orale. Ces études ont déterminé une NOAEL sur le poids corporel chez les rongeurs (paramètre pris en compte à cette période) de 25 mg/kg/jour. A partir de cette dose, un facteur d'incertitude de 500 a été appliqué pour établir une DJA de 50 µg/kg/jour. Une réévaluation du BPA a été effectuée par le CSAH en 2002, pour l'utilisation de matériaux plastiques et d'articles destinés à entrer en contact avec les aliments. L'apparition d'études plus complètes sur la reproduction portant sur 3 générations chez le rat a permis de ré-évaluer la NOAEL pour la diminuer à 5 mg/kg/jour et obtenir une nouvelle DJA de 10 µg/kg/jour (European Commission 2002).

En janvier 2002 a été créée l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (*European Food Safety Authority* ou EFSA) à la suite d'une série de crises liées à la sécurité des aliments survenues à la fin des années 1990. Le rôle de l'EFSA est d'évaluer et d'assurer la sécurité de la chaîne alimentaire dans l'Union Européenne. De sa création, le dossier BPA a été pris en charge par l'organisme européen. Le groupe scientifique a réactualisé la base de données sur les effets du BPA sur la reproduction et le développement de la génération descendante (réduction du poids corporel au sevrage, hypoplasie des tubules séminifères, ou encore *hypospadias* et cryptorchidie) pour fixer la valeur NOAEL à 5 mg/kg/jour et, en réduisant le facteur d'incertitude à 100, porter la DJA totale à 50 µg/kg/jour (EFSA 2006) toujours en vigueur aujourd'hui.

En 2008, le groupe scientifique de l'EFSA a été sollicité pour réévaluer le risque d'exposition au BPA en fonction de l'âge, en particulier pour les fœtus et nouveau-nés. Cette demande est apparue suite à l'interdiction au Canada des biberons en polycarbonate qui contiennent du BPA et un rapport de l'Endocrine Society aux Etats-Unis, concluant à la dangerosité du contaminant sur le développement fœtal et des nourrissons. Dans son rapport, le groupe scientifique de l'EFSA a cependant jugé que l'exposition fœtale était négligeable, compte tenu des capacités maternelles de métabolisme et d'élimination du produit supérieures à celle des rats (EFSA 2008). En conclusion l'EFSA n'a pas considéré pertinent de réévaluer la dose journalière tolérable pour l'homme en fonction de l'âge.

Compte tenu du nombre croissant d'études montrant des effets du BPA à de très faibles doses (inférieures à la DJA), en octobre 2009, l'EFSA a été sollicitée par la Commission Européenne pour évaluer les nouvelles preuves scientifiques susceptibles d'avoir un impact sur les précédentes estimations des doses de références. En attendant l'avis final, l'EFSA a refusé la demande de la Commission Européenne de convertir la DJA en DJA temporaire, mais a identifié des domaines d'études qui doivent être mieux examinés. L'avis définitif a été rendu en septembre 2010, et maintient la DJA à sa valeur actuelle de 50µg/kg/j.

Le **Norvège** a été le premier pays à avoir interdit dès 2007 l'importation des biberons à base du BPA.

Le **Danemark** a annoncé une interdiction temporaire sur les matériaux en contact avec l'alimentation à base de BPA et destinés aux enfants de moins de trois ans. Cette interdiction a pris effet le 1^{er} Juillet 2010.

D'autres pays, comme l'**Allemagne**, la **Suède** et la **Belgique** recommandent de limiter l'utilisation du BPA afin de protéger la santé publique et envisage l'interdiction de certains matériaux.

En **France**, en février 2010, l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA) a rendu un dernier avis sur le BPA. Dans ce rapport, l'AFSSA remet en question la méthodologie utilisée dans le cas particulier des perturbateurs endocriniens. L'AFSSA rapporte: « constater des « effets subtils » sur de jeunes rats, ce qui l'incite à poursuivre son travail d'expertise pour comprendre ces signaux d'alertes ». Dans sa saisine, l'agence conseille donc de ne pas « chauffer trop fort » les aliments ou biberons aux micro-ondes (AFSSA 2010b), tout en reconnaissant que la période qui s'étend depuis l'exposition *in*

utero (via la mère) jusqu'à l'âge de 3 ans représente la période critique d'exposition au BPA (AFSSA 2010a). En mars 2010, le Sénat a adopté à l'unanimité une proposition de loi destinée à suspendre la commercialisation des biberons en polycarbonate. En juin, le parlement a interdit par un ultime vote consensuel à l'Assemblée nationale « la fabrication, l'importation, l'exportation et la mise sur le marché à titre gratuit ou onéreux de biberons produits à base de bisphénol A ». Cette suspension prendra effet le 1^{er} Janvier 2011.

3.8.2 Législation REACH

REACH (en anglais : *Registration, evaluation and authorisation of chemicals*) est un règlement du Parlement européen et du Conseil de l'Union européenne entré en vigueur le 1^{er} juin 2007. REACH rationalise et améliore l'ancien cadre réglementaire de l'Union européenne sur les produits chimiques. Les principaux objectifs de REACH sont de construire un système d'information sur les substances chimiques particulièrement préoccupantes, et à terme, mieux encadrer leur utilisation. REACH s'appuie sur quatre piliers :

- **Evaluation** : consiste à déterminer par les autorités compétentes la nécessité d'effectuer un examen plus approfondi d'une substance.
- **Enregistrement** : est nécessaire pour tous les fabricants et importateurs de substances chimiques produites à *plus d'une tonne par an*. Cette procédure consiste dans un premier temps à rassembler toutes les données concernant les propriétés de la substance, les effets sur la santé et l'environnement, les risques et le possible danger sanitaire. Ensuite la procédure consiste à assembler le dossier technique, effectuer une évaluation de la sécurité chimique et la documenter dans un Rapport de Sécurité Chimique. Ce dernier est obligatoire pour les substances produites ou importées à une quantité de plus de 10 tonnes par an, comme pour le BPA. Une fois ces procédures accomplies, la substance chimique est enregistrée dans une base de données gérée par l'Agence Européenne des Produits Chimiques (AEPC). A partir des informations fournies par les industriels, l'AEPC classe les substances chimiques en fonction des risques. L'AEPC identifie en particulier les substances qui présentent les propriétés les plus dangereuses, dites «substances extrêmement préoccupantes». Il s'agit des substances persistantes (non biodégradables), bioaccumulables, cancérigènes, mutagènes et reprotoxiques.

- **Autorisation pour les «substances extrêmement préoccupantes»** : les industriels qui souhaitent utiliser des substances «extrêmement préoccupantes» devront obtenir une autorisation de l'AEPC. Pour l'obtenir, les industriels doivent démontrer que les risques posés par ces substances sont valablement maîtrisés, ou que les avantages socio-économiques découlant de leur utilisation l'emportent sur les risques. Le but est de remplacer progressivement ces substances par des solutions de remplacement appropriées techniquement et économiquement viables.
- **Restriction pour gérer les risques de substances préoccupantes** : C'est un filet de sécurité du système qui permet de gérer les risques non couverts par ailleurs. La restriction peut permettre l'interdiction pure et simple d'une substance sur le marché européen quel que soit son usage.

En ce que concerne le BPA, jusqu'à présent ce monomère était exempté d'enregistrement. En raison des quantités produites et du nombre croissant d'études rapportant des effets toxiques du BPA sur l'organisme animal, la législation REACH a imposé son enregistrement comme substance à risque au 1^{er} décembre 2010. Les principaux fabricants de BPA se sont unis afin de préparer un dossier d'enregistrement complet et ont créé le consortium BPA REACH.

3.8.3 Législation au plan mondial

Le Canada a été le premier pays au monde à prendre des mesures à l'égard du BPA, en décidant dès 2008 d'appliquer le principe de précaution à l'échelle du pays pour protéger les populations sensibles, comme les nourrissons et les jeunes enfants. Ainsi le gouvernement canadien a classé le BPA comme substance «toxique» pour la santé humaine et l'environnement, tout en interdisant l'utilisation, la production et la distribution de biberons, et de tout type de vaisselle pour les enfants fabriqués à base de BPA. En ce que concerne la population adulte, le gouvernement canadien a conclu que la dose d'exposition journalière du BPA ne présentait pas d'inquiétude et n'a pas considéré pertinent de prendre des mesures de précaution particulières.

Aux **Etats-Unis**, l'utilisation du BPA dans les produits en contact avec les aliments a été approuvée dans les années 1960. Les premières études scientifiques montrant des effets adverses du BPA ont déterminé l'administration américaine des denrées alimentaires

et des médicaments (FDA – *Food and Drug Administration*) à établir une dose maximale admissible chez l'homme (RfD – *Reference Dose*) équivalente à la DJA européenne. Ces doses restant critiquées par la communauté scientifique, le Centre National de la Recherche toxicologique de la FDA en collaboration avec le programme national de toxicologie (NTP – *National Toxicology Program*) a lancé des études approfondies. Dans le premier rapport rendu en 2008, la FDA a conclu que le BPA présent dans les emballages alimentaires n'était pas dangereux pour la santé humaine et a rassuré les consommateurs sur les valeurs seuils en vigueur (NTP 2008).

Malgré l'avis rassurant de la FDA, dès 2009, des règlements limitant ou interdisant l'utilisation du BPA dans les biberons ont été adoptés dans plusieurs états ou ville (Minnesota, Connecticut, Chicago). Dans la même année, la FDA a annoncé sa décision de revoir les niveaux de sécurité et dans son rapport préliminaire de janvier 2010, la FDA s'est déclarée favorable pour prendre les mesures nécessaires afin de réduire l'exposition des nourrissons au BPA *via* l'alimentation (NTP 2010). En outre, la FDA se propose de collaborer avec les industries pour minimiser ou remplacer le BPA des plastiques alimentaires. La FDA reconnaît également que les nourrissons représentent une population potentiellement sensible au BPA en raison du développement des systèmes nerveux et endocriniens, et de l'immaturation de leur système hépatique de détoxification et d'élimination de substances telles que le BPA.

RESULTATS EXPERIMENTAUX

RESULTATS EXPERIMENTAUX

1 : Oestradiol decreases colonic permeability through oestrogen receptor β -mediated up-regulation of occludin and junctional adhesion molecule-A in epithelial cells. V. Braniste, M. Leveque, C. Buisson-Brenac, L. Bueno, J. Fioramonti, E. Houdeau. *Journal of Physiology* 2009 Jul 1;587(Pt 13):3317-28.

2 : Impact of oral bisphenol A at reference doses on intestinal barrier function and sex differences after perinatal exposure in rats. V. Braniste, A. Jouault, E. Gaultier, A. Polizzi, C. Buisson-Brenac, M. Leveque, P.G. Martin, V. Theodorou, J. Fioramonti, E. Houdeau. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010 Jan 5;107(1):448-53.

I. Oestradiol decreases colonic permeability through oestrogen receptor β -mediated up-regulation of occludin and junctional adhesion molecule-A in epithelial cells

Dans l'endothélium vasculaire et l'épithélium vaginal, l'oestradiol est capable de moduler la perméabilité paracellulaire et l'expression des protéines de jonctions serrées. Toutefois la capacité des hormones ovariennes à moduler la voie de transport paracellulaire au niveau de la barrière intestinale n'a pas reçu d'attention. Des récepteurs aux oestrogènes (ERs) sont exprimés dans les cellules épithéliales intestinales ou les oestrogènes participent au contrôle de la prolifération et de la différenciation de l'épithélium.

L'objectif de cette étude a été de déterminer chez la femelle l'influence des hormones ovariennes au cours du cycle sexuel, en particulier les oestrogènes, sur la perméabilité paracellulaire basale dans le côlon de rate adulte, puis de vérifier sur des lignées cellulaires humaines coliques (Caco2) la sensibilité épithéliale aux hormones.

Méthodologie : Dans un premier temps, nous avons évalué chez des rates adultes la perméabilité paracellulaire colique au cours du cycle oestral en utilisant deux approches : 1/ *in vivo* – par la mesure du passage paracellulaire d'une macromolécule marquée, le ^{51}Cr -EDTA administré par gavage orale, de la lumière intestinale vers la circulation sanguine, et 2/ *ex vivo* – par la mesure en chambres de Ussing du passage d'une macromolécule fluorescente (FITC-dextran 4 kDa) du pôle muqueux vers le pôle séreux de la paroi colique.

Dans un second temps, nous avons mesuré la perméabilité intestinale en chambres de Ussing sur des segments de côlon des rates ovariectomisées puis traitées une semaine avec des implants Silastis sous-cutanés (s.c.) contenant de la progestérone, de l'oestradiol ou vides (contrôles), en présence ou en absence de l'antagoniste des ERs (ICI 182,780). D'autres segments de côlon obtenus de rates ovariectomisées et traitées par des injections s.c. d'un agoniste de ER α (propyl pyrazole triol – PPT) ou β (diarylpropionitrile – DPN) ont été utilisées pour déterminer l'implication de chaque type de ERs dans cette fonction.

Enfin, nous avons étudié dans le côlon l'expression des protéines de jonctions serrées montrées sensibles aux oestrogènes dans d'autres systèmes épithéliaux non-digestifs.

En utilisant des approches de biologie moléculaire (RT-PCR et Western blotting) et d'immunocytochimie, nous avons étudié l'expression des protéines transmembranaires

(occludine et JAM-A) et cytoplasmique (ZO-1) de jonctions serrées dans le côlon sous différents conditions de traitement par l'oestradiol ou ses agonistes α et β , en présence et en l'absence de ICI 182,780, et sur la lignée Caco-2.

Résultats : Les observations montrent que la perméabilité paracellulaire colique chez la femelle n'est pas statique en conditions basales, mais varie au cours du cycle sexuel, avec une diminution d'approximativement de 40% du flux paracellulaire aux macromolécules chez la rate en oestrus (phase folliculaire sous dominance oestrogénique) par rapport aux animaux en dioestrus (phase lutéale sous-dominance de la progestérone). Ces effets sont essentiellement dus aux variations plasmatiques en oestrogènes, une sensibilité vérifiée chez les rates ovariectomisées et traitées aux hormones ovariennes. En effet, l'administration de la progestérone n'a eu aucune influence sur la perméabilité intestinale, tandis d'un traitement s.c. de 5 jours avec l'oestradiol a diminué la perméabilité colique de manière dose-dépendante. L'administration de l'antagoniste ICI 182,780 a bloqué complètement les effets de l'oestradiol, démontrant un effet médié par les ERs. De plus, ces effets sont reproduits par le DPN, non par le PPT, concluant en l'implication seule de la voie de signalisation ER β dans le contrôle œstrogénique de la perméabilité paracellulaire colique chez la rate.

Les effets de l'oestradiol passent par une surexpression des protéines transmembranaires de jonctions serrées, occludine et JAM-A, un effet reproduit par le seul traitement au DPN dans le côlon de rat, comme dans la lignée cellulaire Caco-2, et bloqué en présence de ICI 182,780, confirmant l'implication de la voie ER β . Aucun traitement ne s'est avéré capable de moduler l'expression de la protéine cytoplasmique ZO-1.

Conclusion : Ces résultats montrent pour la première fois que l'oestradiol renforce la barrière épithéliale par une voie ER β -dépendante au cours du cycle sexuel, un effet conséquent de la surexpression des protéines transmembranaires, occludine et JAM-A. Ces observations mettent en évidence l'importance de la voie de signalisation ER β dans les variations cycliques du transport paracellulaire colique chez la femelle, une voie d'échange impliquée dans le transport d'ions et d'eau nécessaires à l'homéostasie de la muqueuse intestinale et l'équilibre hydrique de l'organisme.

Oestradiol decreases colonic permeability through oestrogen receptor β -mediated up-regulation of occludin and junctional adhesion molecule-A in epithelial cells

Viorica Braniste, Mathilde Leveque, Claire Buisson-Brenac, Lionel Bueno, Jean Fioramonti and Eric Houdeau

Unité de Neuro-Gastroentérologie & Nutrition, UMR1054, INRA, Toulouse, France

Oestradiol modulates paracellular permeability and tight junction (TJ) function in endothelia and reproductive tissues, but whether the ovarian hormones and cycle affect the paracellular pathway in the intestinal epithelium remains unclear. Oestrogen receptors (ERs) are expressed in intestinal epithelial cells, and oestradiol regulates epithelium formation. We examined the effects of oestrous cycle stage, oestradiol benzoate (EB), and progesterone (P) on colonic paracellular permeability (CPP) in the female rat, and whether EB affects expression of the TJ proteins in the rat colon and the human colon cell line Caco-2. In cyclic rats, CPP was determined through lumen-to-blood ^{51}Cr -labelled EDTA clearance, and in Ussing chambers for dextran permeability. CPP was also examined in ovariectomized (OVX) rats treated with P or EB, with and without the ER antagonist ICI 182,780, or with the selective agonists for ER α (propyl pyrazole triol; PPT) or ER β (diarylpropionitrile; DPN). In oestrus rats, CPP was reduced ($P < 0.01$) relative to dioestrus. In OVX rats, EB dose-dependently decreased CPP, an effect mimicked by DPN and blocked by ICI 182,780, whereas P had no effect. Oestradiol increased occludin mRNA and protein in the colon ($P < 0.05$), but not zona occludens (ZO)-1. Further, EB and DPN enhanced occludin and junctional adhesion molecule (JAM)-A expression in Caco-2 cells without change in ZO-1, an effect blocked by ICI 182,780. These data show that oestrogen reinforces intestinal epithelial barrier through ER β -mediated up-regulation of the transmembrane proteins occludin and JAM-A determining paracellular spaces. These findings highlight the importance of the ER β pathway in the control of colonic paracellular transport and mucosal homeostasis.

(Received 15 January 2009; accepted after revision 11 May 2009; first published online 11 May 2009)

Corresponding author E. Houdeau: Unité de Neuro-Gastroentérologie & Nutrition, Institut National de la Recherche Agronomique, 180 chemin de Tournefeuille, BP 93173, 31027 Toulouse cedex 03, France. Email: eric.houdeau@toulouse.inra.fr

Abbreviations CPP, colonic paracellular permeability; DPN, diarylpropionitrile; EB, oestradiol benzoate; ER, oestrogen receptor; JAM-A, junctional adhesion molecule-A; OVX, ovariectomized; P, progesterone; PPT, propyl pyrazole triol; TJ, tight junction; ZO-1, zona occludens.

One critical function of intestinal epithelium is to provide a protective barrier of the internal milieu against adverse luminal factors. This physical barrier is restricted by the integrity of the apical intercellular tight junctions (TJs) sealing paracellular spaces between epithelial cells (Turner, 2006). Increased paracellular permeability has been implicated in the pathogenesis of chronic mucosal inflammation in animals and humans (Meddings, 1997; Cenac *et al.* 2004; Resta-Lenert *et al.* 2005; Shen & Turner, 2006; Moriez *et al.* 2007). However, the intestinal epithelial barrier is not impermeable in normal conditions, permitting fluid transport (Masyuk *et al.* 2002) and communication between the mucosal immune system

and the commensal flora, the latter playing a major role in antigen sampling and the development of tolerance (Artis, 2008). Although there is growing evidence that oestrogens play a role in the architectural maintenance of intestinal epithelium, driving cell differentiation and proliferation (Wada-Hiraike *et al.* 2006a), the influence of the changing hormonal milieu during the ovarian cycle on paracellular permeability has received no attention. Of note, Homma *et al.* (2005) pointed out an improved epithelial barrier function in pro-oestrus rats compared with males, and a decreased intestinal permeability in males following oestradiol supplementation. This suggested a mechanistic link between the absolute levels of plasma oestrogens and

the regulation of paracellular spaces, which remains to be explored.

Both ER α and β are expressed in the gastrointestinal tract (Enmark *et al.* 1997; Campbell-Thompson *et al.* 2001; Konstantinopoulos *et al.* 2003; Kawano *et al.* 2004), with ER β as the predominant ER in the colon, mainly located in epithelial cells (Konstantinopoulos *et al.* 2003). Recent studies in ER β -/- mice showed an irregular and abnormal shape of the lateral surface contacts between colonic epithelial cells, underlying changes in the standard features of TJs (Wada-Hiraike *et al.* 2006a,b). These results suggest that oestrogen affects colonic permeability through regulation of TJ integrity. Tight junctions are composed of transmembrane proteins, claudins, occludin and junctional adhesion molecules (JAMs), interacting with cytoplasmic proteins such as ZO-1 to maintain dynamic structures with the cell cytoskeleton, thus determining paracellular spaces. In human endothelial and ectocervical epithelial cells, oestradiol has been shown to regulate paracellular permeability through modulation of occludin expression (Ye *et al.* 2003; Kang *et al.* 2006; Gorodeski, 2007). In the colon, no information is available about the interactions between oestrogens and TJ proteins in regulating the epithelial barrier permeability.

The present *in vivo* and *in vitro* studies were designed to investigate the influence of the oestrous cycle on basal paracellular permeability in the rat colon. We also examined the effects of oestradiol and progesterone, an ER antagonist and stimulation by specific ER α and β agonists on colonic paracellular permeability (CPP) in ovariectomized (OVX) rats. We show that CPP varied during the sexual cycle, decreasing under plasma oestrogen dominance in the follicular phase, an effect mimicked by ER β agonist in OVX rats. To address the question of whether oestrogens affect expression of key TJs proteins, we examined occludin and ZO-1 expression in the colon of oestradiol-treated OVX rats. We demonstrated a link between oestrogen-mediated decrease in CPP and modulation of occludin mRNA and protein in the colon. In further support of the notion that epithelial cells are targeted by oestradiol, we found that ER β stimulation of the human cell line Caco-2 cells up-regulated the transmembrane proteins occludin and JAM-A, both have pivotal functions in the control of paracellular permeability.

Methods

Animals and treatments

Adult female Wistar rats (Janvier, Le Genest St Isle, France) were housed in cages with free access to food and water under a 12:12 h light-dark cycle. All protocols were approved by the local Institutional Animal Care and Use

Committee in compliance with the European laws on the protection of animals (86/609/EEC).

In a first series of experiments, oestrous cycle stages were assessed through daily vaginal smears. Two groups of rats were used for *in vivo* comparison of CPP for 24 h during the follicular and the luteal phase of the sexual cycle, that is, from pro-oestrus to oestrus ($n = 14$), and from metoestrus to dioestrus ($n = 11$), respectively. Two other groups of rats were killed by decapitation in oestrus ($n = 13$) or dioestrus ($n = 9$), and used for *in vitro* evaluation of CPP in Ussing chambers.

In a second series of experiments, bilateral ovariectomies (OVX) or sham operations were performed on rats anaesthetized with a single intraperitoneal bolus dose of ketamine hydrochloride (150 mg kg⁻¹, Imalgene 500, Rhône Mérieux, Lyon, France). After a 6 day recovery period for complete depletion of endogenous sex hormones, OVX rats were re-anaesthetized and Silastic implants (medical grade tubing; Dow Corning, Midland, MI, USA) filled with oestradiol benzoate (EB) (1,3,5[10]-estratriene-3,17 β -diol-3-benzoate; Sigma, St Louis, MO, USA), progesterone (P) (4-pregnen-3,20-dione; Sigma) or empty implants (controls) were positioned under the skin of the neck for 5 days as already described (Houdeau *et al.* 2007). According to Vongher and Frye (1999), the wall thickness and length of the implants (EB: 1.57 mm I.D./3.18 mm O.D., 24 mm; P: 3.36 mm I.D./4.65 mm O.D., 10 mm) determined physiological plasma levels of oestradiol and progesterone. Animals were assigned to the following groups: (1) untreated sham operated females killed in oestrus (sham oestrus, $n = 3$), (2) control OVX with empty implants (OVX, $n = 16$), (3) OVX rats with EB implants (OVX+EB, $n = 14$), (4) OVX rats with P implants (OVX+P, $n = 14$), and (5) OVX rats with EB implants receiving daily subcutaneous injections of the pure ER antagonist ICI 182,780 (2 mg (kg body weight (BW))⁻¹/day in olive oil; Tocris, Bristol, England) (OVX+EB+ICI, $n = 5$). At the end of treatment, rats were killed by decapitation, and distal colons were dissected, washed in Krebs-Henseleit solution (Sigma) and used for CPP measurements in Ussing chambers. Additional tissue segments were simultaneously frozen in liquid nitrogen until protein extraction for Western blot analyses.

In a dose-dependent experiment, OVX rats were given daily for 5 days a subcutaneous (s.c.) injection of EB (0.001, 0.005, 0.05, 0.5, or 5 mg (kg BW)⁻¹ day⁻¹) dissolved in olive oil ($n = 5-8$ per group) for CPP measurements in Ussing chambers. For the effects of ER selective agonists, 21 OVX rats were divided into three groups, and used for CPP measurements in Ussing chambers: each group was s.c. treated for 5 days with 10% DMSO in olive oil (vehicle), propylpyrazole triol (PPT, an ER α -specific agonist; 4 mg (kg BW)⁻¹ day⁻¹; Tocris), or diarylpropionitrile (DPN, an ER β -specific

agonist; 4 mg (kg BW)⁻¹ day⁻¹; Tocris). The selective ligand activity of these compounds has been previously described using competitive binding and transcription assays (Stauffer *et al.* 2000; Meyers *et al.* 2001). The dose used herein for PPT was as effective as EB stimulation to elicit a full uterotrophic response as already reported (Harris *et al.* 2002; Frasor *et al.* 2003), while DPN at the daily dose used was appropriate to investigate ER β activities *in vivo* (Lee *et al.* 2005; Weiser *et al.* 2009), and did not evoke uterotrophic activity in the present study. Additionally, to determine a genomic activity for EB, a last group of OVX rats received a single injection of EB (5 mg (kg BW)⁻¹, s.c.; $n=6$), with or without ICI 182,780 (2 mg (kg BW)⁻¹, s.c.; $n=5$). Control rats received the vehicle, olive oil (Ve, $n=6$). Eight hours after treatment, rats were killed, and colons subjected to RNA extraction.

***In vivo* measurement of colonic paracellular permeability**

Lumen to blood clearance for 24 h of ⁵¹Cr-labelled ethylenediamine tetra-acetic acid (⁵¹Cr-EDTA; Perkin Elmer Life Sciences, Paris, France) was used to assess CPP during the sexual cycle. Animals were anaesthetized as above, and surgically equipped with an intracolonic catheter 1 week before experimentation, as previously described (Ait-Belgnaoui *et al.* 2005), then placed in individual metabolic cages 24 h before intracolonic injection of ⁵¹Cr-EDTA (0.7 μ Ci) diluted in 250 μ l saline. Faeces and urine were collected separately for 24 h, and total radioactivity found in urine was measured with a gamma counter (Cobra II, Packard, Meriden, CT, USA). Colonic permeability to ⁵¹Cr-EDTA was expressed as the percentage of total administered radioactivity recovered in urine.

Ussing chamber experiments

Immediately after killing, distal colons were removed and cut along the mesenteric border, and three colonic strips from each rat were mounted in Ussing chambers (Easymount, Hamden, CT, USA) having a flux area of 0.5 cm². Both sides of each colonic sheet were bathed in 5 ml of circulating oxygenated Krebs–Henseleit solution (Sigma), and maintained at 37°C. Colonic paracellular permeability was assessed by measuring mucosal-to-serosal flux of fluorescein isothiocyanate (FITC)-labelled 4 kDa dextran (Sigma) across the colonic strip. In brief, after a 20 min equilibrium period, 500 μ l of buffer solution on the mucosal side was replaced by 500 μ l solution of FITC-dextran (2.2 mg ml⁻¹ as final concentration). After 1 h, fluorescence was measured in the serosal buffer with a fluorimeter (Tecan Infinite

M200, Austria). Results were expressed as the flux of FITC-dextran crossing 1 cm² of epithelium per hour (nmol cm⁻² h⁻¹), and are the means of measurements done in triplicates. Trans-epithelial resistance (TER), an indicator of tissue viability and paracellular ion exchange, was expressed as Ohm cm².

Cell culture and treatments

Caco-2 cells were grown at 37°C in 5% CO₂ humidified atmosphere in phenol-red free Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; MidiMed, Boussens, France), with 100 U ml⁻¹ penicillin, 100 μ g ml⁻¹ streptomycin and non-essential amino acids (MidiMed), and augmented with 10% fetal bovine calf serum (FCS; MidiMed) pretreated with dextran coated charcoal. Charcoal stripped FCS was prepared by mixing 500 ml FCS with 10 g activated charcoal (Sigma) overnight at 4°C. Following centrifugation to remove charcoal, the FCS was filtered at 0.22 μ m, then added to the DMEM. Cells were plated in a 24-well plate coated with collagen type 1 (5 μ g cm²; BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) or on collagen type 1-coated round glass coverslips at a density of 5 \times 10⁴ cells per cm² for 3 days, then exposed in triplicate to EB (10 nM), PPT (100 nM) and DPN (100 nM) for 8 h in charcoal stripped FCS. For treatment with the ER antagonist, ICI 182,780 (10 μ M) was added in the medium 1 h before EB or DPN treatment. All chemicals were pre-dissolved in 100% ethanol at a concentration of 10 μ M, then diluted with the medium to bring the final concentration, while control cells were exposed to vehicle ethanol (final dilution < 0.1%).

Immunofluorescence labelling

Caco-2 monolayers on coverslips were fixed and permeabilized in methanol–acetic acid (95/5%) for 20 min at –20°C, then blocked for 30 min with phosphate-buffered saline (PBS)–0.1% bovine serum albumin (BSA) at room temperature (RT). Cells were incubated overnight at 4°C with rabbit anti-occludin polyclonal antibody (Zymed Laboratories, South San Francisco, CA, USA), diluted 1:100 in PBS, or rabbit anti-JAM-A (Zymed Laboratories), diluted 1:25 in PBS. After washing, secondary detection was performed using Alexa fluor 488-conjugated IgG donkey anti-rabbit (1:2000 in PBS; Molecular Probes/Invitrogen, Cergy Pontoise, France) for 30 min. Caco-2 monolayers were washed and mounted in Prolong mounting medium (Invitrogen), and the labelling was examined under a Nikon 90i fluorescence microscope. The z-axial images were collected using an Olympus FV5-101 confocal laser scanning, and Fluoview software (Olympus).

Protein extraction and Western blot

Total proteins were extracted from colons and Caco-2 cells in RIPA buffer containing 1% Igepal, 0.5% deoxycholic acid, 0.1% sodium dodecyl sulphate in Tris-buffered saline (TBS) 1×, and a complete protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), before clarification at 10 000 g for 10 min (4°C). Protein concentrations were measured using the BC Assay Uptima kit (Interchim, France). Equal amounts of protein per lane were separated by SDS-PAGE, then transferred onto nitrocellulose membranes (Optitran, Schleicher 1 Schuell Biosciences, Dassel, Germany). Membranes were blocked with 5% dry milk in 0.1% tween in TBS (TBST) for 2 h at RT, and then incubated overnight at 4°C with primary antibodies. Immunoblotting was performed using polyclonal rabbit anti-occludin antibody (Zymed Laboratories) diluted 1 : 500 in 5% dry milk in TBST, and polyclonal rabbit anti-ZO-1 (Zymed Laboratories) or anti-JAM-A (Abcam, Cambridge, UK) diluted 1 : 1000 and 1 : 500 in 3% BSA in TBST, respectively. After washing in TBST–milk, membranes were incubated for 1 h at RT with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Visualizer Detection Kit, Upstate, Lake Placid, NY, USA) diluted 1 : 20 000 in TBST, and washed. Bands were identified using SuperSignal West Femto (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). Relative values of the band density were estimated using ImageJ software (NIH, Bethesda, MD, USA), and are presented as the mean of blot determination in 5 to 7 animals.

RNA extraction and RT-PCR

Total RNA was prepared from colons or Caco-2 cells with QIAzol (Qiagen, Courtaboeuf France) by standard isopropanol–chloroform precipitation. The resulting RNA pellets were washed with 75% ethanol and resuspended in RNase free water. RNA quality was confirmed by analysis of the 260 : 280 nm absorbance ratio. cDNA was synthesized from 1 µg RNA using an Omniscript RT kit (Qiagen) and 5 µmol l⁻¹ random primers (Invitrogen, France) according to the manufacturer's instructions on an automated Applied Biosystems 9700 PCR System. cDNA was diluted 5 times before PCR amplification. Primer sets were as follows: for rat occludin (forward 5'GCT-CAG-GGA-ATA-TCC-ACC-TAT-CA3', reverse 5'CAC-AAA-GTT-TTA-ACT-TCC-CAG-ACG3'), annealing temperature 62°C; human occludin (forward 5'TCA-GGG-AAT-ATC-CAC-CTA-TCA-CTT-CAG3', reverse 5'CAT-CAG-CAG-CAG-CCA-TGT-ACT-CTT-CAC3'), annealing temperature 53°C; rat ZO-1 (forward 5'CGG-AAC-TAT-GAC-CAT-CGC-CAT-C3', reverse

5'GCC-TGT-ACC-TGT-TGT-GCA-CC3'), annealing temperature 62°C; human ZO-1 (forward 5'CGG-TCC-TCT-GAG-CCT-GTA-AG3', reverse 5'GGA-TCT-ACA-TGC-GAC-GAC-AA3'), annealing temperature 46°C; human JAM-A (forward 5'GGT-CAA-GGT-CAA-GCT-CAT3', reverse 5'CTG-AGT-AAG-GCA-AAT-GCA-G3'), annealing temperature 48°C; rat GAPDH (forward 5'ATC-ACC-ATC-TTC-CAG-GAG-CG3', reverse 5'TTC-TGA-GTG-GCA-GTG-AGG-GC3'), annealing temperature 50°C; human GAPDH (forward 5'TTC-ATT-GAC-CTC-AAC-TAC-AT3', reverse 5'GTG-GCA-GTG-ATG-GCA-AGG-AC3'), annealing temperature 48°C. The 50 µl PCR reaction mixtures contained 2.5 units of HotStarTaq DNA polymerase (QIAGEN), 0.2 µM of each primer, 200 µM of each dNTP and cDNA corresponding to 1 µg of total RNA. The PCR products (10 µl of each PCR reaction) were separated on a 2% agarose gel and were visualized by SYBR Gold staining under UV light. Control experiments were also performed in which RNA was omitted from the reverse transcription reactions. Under these conditions, no bands were seen on agarose gels for any of the genes studied (data not shown).

Statistical analysis

All data are presented as means ± S.E.M. Statistical significance was assessed by Student's *t*-test or one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test for multiple comparisons where appropriate. Analyses were performed by running Prism 4 software (GraphPad, San Diego, CA, USA). *P* < 0.05 was considered significant.

Results

Oestrous cycle-dependent variations of colonic paracellular permeability

The initial study focused on determining the *in vivo* parameters of CPP to intracolonic ⁵¹Cr-EDTA in cyclic rats. In animals in follicular phase, CPP, expressed as the percentage of ⁵¹Cr-EDTA that crosses the colonic barrier, showed a significant decrease compared with rats in luteal phase (–44%, 1.0 ± 0.1 vs. 1.8 ± 0.2% of total ⁵¹Cr-EDTA recovered in urine, respectively; *P* < 0.01) (Fig. 1A). Similar differences in paracellular fluxes were observed in Ussing chambers, as assessed by a decreased CPP to FITC-dextran in colonic segments from oestrus rats compared with those of dioestrus rats (–38%, 1.0 ± 0.1 vs. 1.6 ± 0.1 nmol cm⁻² h⁻¹, respectively; *P* < 0.001) (Fig. 1B), associated with an increased baseline TER (Table 1).

Table 1. Colonic trans-epithelial resistance (TER) in cyclic rats, and OVX rats with or without oestradiol benzoate, progesterone and ICI 182,780

Animals	TER (Ω cm ²)	n
Cyclic		
Dioestrus	84.5 ± 5.5	4
Oestrus	114.0 ± 10.9*	4
OVX		
Ve	90.3 ± 2.8	9
EB	109.3 ± 5.5 ^a	10
P	75.6 ± 4.7 ^{ns}	5
EB+ICI	95.6 ± 9.6 ^{ns}	5

Data are means ± s.e.m. of triplicate measurements in Ussing chambers. * $P < 0.05$ vs. dioestrus rats; ^a $P < 0.05$, and ns (not significant) vs. control Ve.

Effects of ovariectomy, progesterone, oestradiol and ER specific ligands on colonic paracellular permeability

Compared to sham oestrus rats, bilateral ovariectomy induced a marked increase in CPP monitored in Ussing chambers (0.36 ± 0.05 vs. 0.64 ± 0.02 nmol cm⁻² h⁻¹, respectively; $P < 0.01$) (Fig. 2). Treatment with P did not change CPP and TER (Fig. 2 and Table 1). In contrast, EB replacement elicited a 49% decrease of FITC-dextran fluxes compared to OVX controls (0.33 ± 0.03 vs. 0.64 ± 0.02 nmol cm⁻² h⁻¹, respectively; $P < 0.001$) (Fig. 2), correlated with a significant increase in TER ($P < 0.05$), reaching baseline values observed in oestrus rats (Table 1). When the ER antagonist, ICI 182,780, was co-administered with EB in OVX rats, both CPP and TER returned to baseline values similar to those observed in OVX controls (Fig. 2 and Table 1). We also examined the effects of various doses of EB injected daily

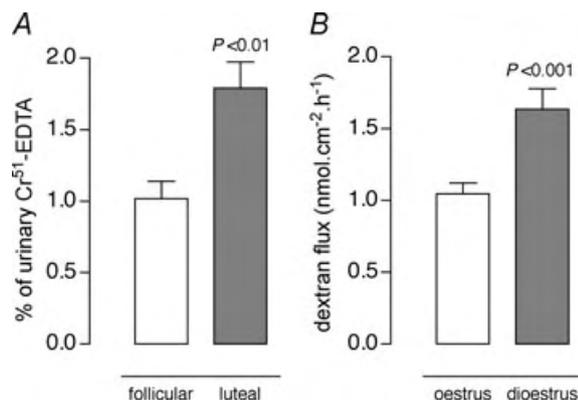


Figure 1. Effect of oestrous cycle on paracellular permeability
 A, *in vivo* ⁵¹Cr-EDTA recovery in urine 24 h after injection into the colon of rats in follicular and luteal phase. B, *in vitro* paracellular FITC-dextran flux measured for 1 h in Ussing chambers in colon segments from oestrus and dioestrus rats. Bars are means ± s.e.m. Statistical significance was assessed by Student's *t*-test.

for 5 days ($10 \mu\text{g}$ to 5mg (kg BW)⁻¹ day⁻¹) on CPP to FITC-dextran. As shown in Fig. 3A, a dose-dependent decrease of dextran flux throughout colonic strips was observed ($P < 0.05$), with a median effective dose (ED₅₀) of $72 \mu\text{g}$ (kg BW)⁻¹ day⁻¹, and maximal inhibition at 5mg (kg BW)⁻¹ day⁻¹.

To determine the ER subtype mediating oestradiol regulation of CPP, OVX rats were treated with DPN (a selective ER β agonist), PPT (a selective ER α agonist) or vehicle (controls) for 5 days. In Ussing chambers, the flux of FITC-dextran was reduced by 36% in DPN treated rats compared with controls (0.47 ± 0.03 vs. 0.73 ± 0.06 nmol cm⁻² h⁻¹, respectively; $P < 0.05$), whereas no significant changes were observed following PPT stimulation (Fig. 3B).

Oestradiol stimulates occludin expression but not ZO-1 in the rat colon

We further analysed whether oestradiol-induced decrease in CPP resulted from changes in the *in vivo* expression of the tight junction proteins, occludin and ZO-1. OVX rats were treated for 5 days with either vehicle (olive oil) or EB at the dose (5mg (kg BW)⁻¹ day⁻¹) producing maximal inhibition on CPP as observed in the prior dose-response study. As shown in Fig. 4A, there was no significant

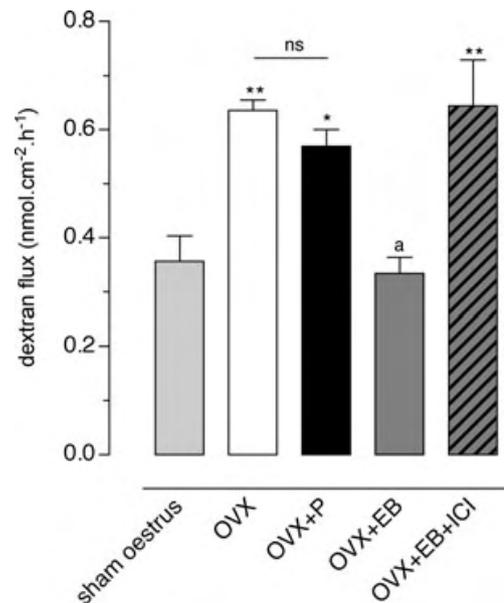


Figure 2. Effect of ovariectomy, progesterone, oestradiol and ICI 182,780 on paracellular permeability

FITC-dextran flux measurements for 1 h in Ussing chambers in colon segments from sham operated rats (sham oestrus), and ovariectomized rats treated for 5 days with empty s.c. implants (OVX) or with implants filled with P (OVX+P) or EB (OVX+EB) or EB with daily s.c. injection of the ER antagonist ICI 182,780 (2mg (kg BW)⁻¹ day⁻¹) (OVX+EB+ICI). Bars are means ± s.e.m. $P < 0.001$, ANOVA; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. sham oestrus, ^a $P < 0.001$ vs. OVX or P group of rats; ns: not significant (Bonferroni *post hoc* test).

difference in the ZO-1 protein expression compared to control OVX, whereas EB treatment induced a sharp increase in occludin protein expression (+49%, $P < 0.05$). To further examine the signalling mechanisms by which EB increases occludin amount, OVX rats were treated with a single injection of EB ($5 \text{ mg (kg BW)}^{-1} \text{ day}^{-1}$) and killed at 8 h after treatment, a time point compatible with a genomic effect of EB on occludin expression in other epithelia (Kang *et al.* 2006). Colons from animals treated with EB alone exhibited a marked increase in occludin mRNA, blocked by ICI 182,780, whereas no change was observed for ZO-1 mRNA (Fig. 4B).

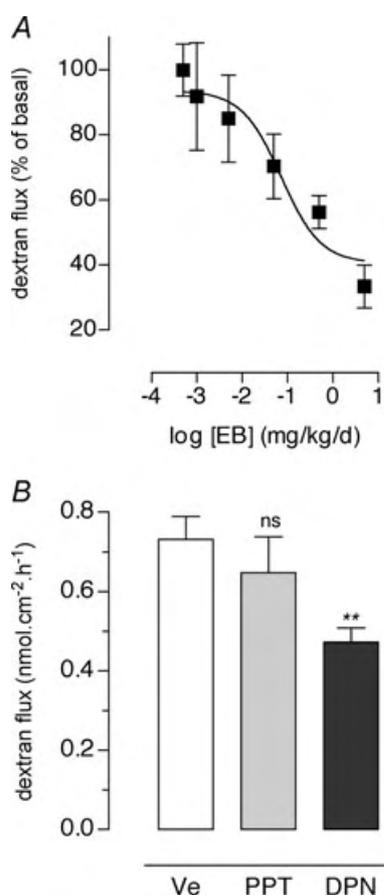


Figure 3. Dose effect of oestradiol on paracellular permeability in OVX rats and involvement of ER α and ER β

A, dose-response study of oestradiol benzoate (EB, $1 \mu\text{g}$ to $5 \text{ mg (kg BW)}^{-1} \text{ day}^{-1}$ for 5 days, s.c.) on paracellular FITC-dextran flux measured for 1 h in colon segments mounted in Ussing chambers. Values are means \pm s.e.m. of triplicate measurements in 5–8 rats per group ($P < 0.05$, ANOVA). B, effects of a 5 day treatment with the selective ligand agonist for ER α (PPT, $4 \text{ mg (kg BW)}^{-1} \text{ day}^{-1}$, s.c.), ER β (DPN, $4 \text{ mg (kg BW)}^{-1} \text{ day}^{-1}$, s.c.) on colonic paracellular permeability in Ussing chambers. OVX rats treated with vehicle DMSO in olive oil (Ve) were used as controls. Values are means \pm s.e.m. of triplicate measurements in 7 rats per group. ** $P < 0.01$ and ns (not significant) vs. Ve.

Effects of oestradiol, PPT and DPN on occludin, JAM-A and ZO-1 expression in Caco-2 cells

To evaluate whether the EB-mediated increase in occludin expression specifically involved ER β expressed by epithelial cells, and whether it could affect other transmembrane proteins involved in TJ function, we assessed occludin and JAM-A mRNA and protein levels in human Caco-2 cell line stimulated with EB, PPT or DPN, with or without the ER antagonist ICI 182,780. We found that DPN, like EB, up-regulated occludin (+43%; $P < 0.05$) and JAM-A (+58%; $P < 0.05$) protein expression by Caco-2 cells, while PPT had no significant effect (Fig. 5A and B). Pre-treatment of EB- or DPN-stimulated Caco-2 cells with ICI 182,780 resulted in reducing occludin as well as JAM-A protein amount to an extent comparable to that observed in controls (Fig. 5A and B). At the transcription level, Caco-2 cells showed a significant increase in occludin mRNA when treated with EB ($P < 0.01$) or DPN ($P < 0.05$), and these effects were blocked by the pre-treatment with ICI 182,780 (Fig. 5A). Similar EB and DPN effects were found for JAM-A mRNA (Fig. 5B). Compared to control cells, no significant change in both occludin and JAM-A mRNA levels was observed following PPT stimulation (Fig. 5A and B). Further, as observed in the rat colon (Fig. 4), no EB-related changes could be discerned on mRNA and protein level of ZO-1 (Fig. 5C).

To test whether EB and DPN affect the architecture of TJs, Caco-2 monolayers were immunostained by fluorescent antibodies to occludin and JAM-A. In control cells, occludin and JAM-A immunofluorescence were distributed as distinct continuous bands along the cell borders, and cell morphology did not differ among treatment groups (Fig. 6). In EB- and DPN-treated monolayers, immunostaining for occludin was markedly increased at the TJ level, whereas no change was detected after PPT treatment compared to control cells (Fig. 6A). Similar DPN effect was observed for JAM-A staining at the apical cell-to-cell contact (Fig. 6B), while PPT had no effect (not shown). Pretreatment with ICI 182,780 prevented the DPN-induced increase in occludin and JAM-A immunostaining (Fig. 6).

Discussion

A major route of transport in gut epithelia is the paracellular pathway, regulated by TJs that form part of the apical junctional complex between epithelial cells (Turner, 2006). In the absence of pathological disorders, epithelial cells are not totally sealed and allow transport of water and solutes, as well as microbial sampling for maintaining intestinal immune homeostasis (Masyuk *et al.* 2002; Shen & Turner, 2006; Artis, 2008). The present study in female rats shows that

colonic paracellular permeability was not static in basal conditions, but fluctuated depending on stages of the oestrous cycle. Here we present evidence of a physiological link between cycle-dependent permeability changes, circulating oestrogens and ER β -mediated increase in expression of occludin and JAM-A, two TJ transmembrane proteins with pivotal functions in the maintenance of epithelial intercellular spaces.

There is growing evidence that sex steroids influence gut physiology. Both oestrogen and progesterone receptors are expressed in the GI tract under normal conditions (i.e. without tumour formation or developing inflammation) (Enmark *et al.* 1997; Campbell-Thompson *et al.* 2001; Konstantinopoulos *et al.* 2003; Kawano *et al.* 2004; Xiao *et al.* 2005), and sex steroids have been shown to influence gastric motility (Günel *et al.* 2004), colonic transit time (Xiao *et al.* 2005; Cong *et al.* 2007), chloride ion secretion (Condliffe *et al.* 2001; O'Mahony *et al.* 2007), and epithelium formation (Wada-Hiraike *et al.* 2006a). In contrast, the literature is less abundant regarding influence of the natural cyclic shift from oestrogen to progesterone plasma dominance on gut function. Our data in cyclic rats show, first, that paracellular permeability was lower in oestrus (i.e. oestrogen dominance) than in dioestrus (progesterone dominance); second, that the decrease of paracellular permeability under oestrogen dominance appeared concomitant to an increase in TER, suggesting the reinforcement of TJ function during the follicular phase, an effect which is lost in the subsequent luteal

phase. Our statement that these variations occurred in relation to changes in plasma oestrogen is supported by the following findings. First, progesterone did not influence epithelial permeability in OVX rats, while oestradiol evoked an increase in TER, and a dose-related decrease in paracellular flux. Similarly, Mullick *et al.* (2001) also documented a reduced permeability following oestradiol treatment, but not progesterone, in rat carotid arteries. Second, the oestradiol effects on colonic paracellular flux and TER were blocked by the ER antagonist ICI 182,780, demonstrating that these responses are mediated by ERs. These findings reinforce the hypothesis that oestradiol is able to limit TJ opening in the colon during the reproductive cycle, thus able to limit the passage of potentially harmful luminal components. Consistent with this suggestion, Homma *et al.* (2005) demonstrated sexual dimorphism in rat ileal permeability, with a female gut in pro-oestrus stage (i.e. oestrogen peak) better preserved than the male intestine under hypoxia and acidosis, a sex difference abrogated by oestradiol pretreatment in males. A protective role of oestradiol in decreasing paracellular permeability enlarges its beneficial effects on intestinal barrier function, since oestradiol was thought to have primarily anti-inflammatory activities in the gut, by decreasing neutrophil infiltration and cytokine production in colitis (Verdu *et al.* 2002; Günel *et al.* 2003; Harnish *et al.* 2004; Houdeau *et al.* 2007).

Gut epithelial cells contain functional ERs (Thomas *et al.* 1993), and oestrous cycle-related changes in

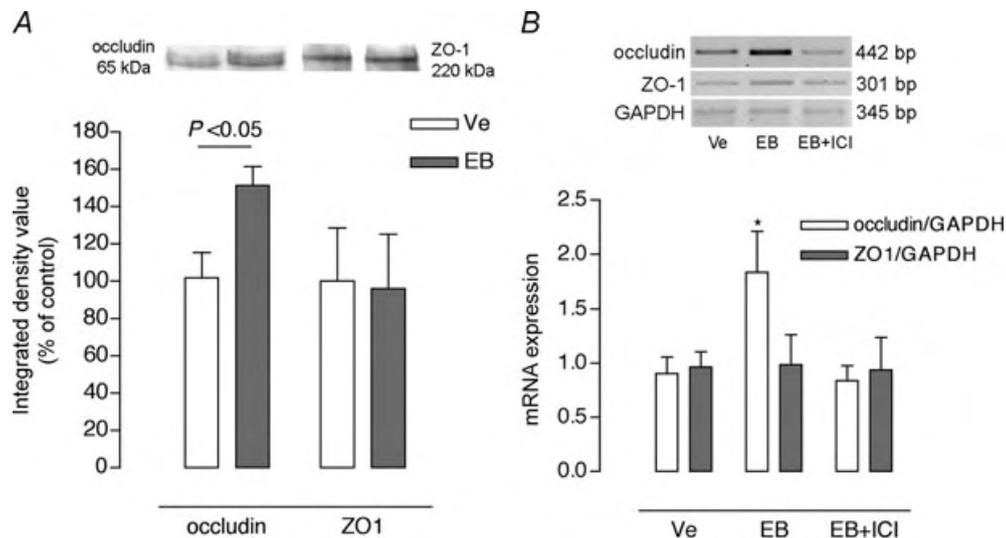


Figure 4. Effects of oestradiol on occludin and ZO-1 expression in the colon of OVX rats

A, representative Western blot lanes for occludin and ZO-1 from the same protein extract, and quantitative representation of corresponding protein contents from 7 independent experiments. Note that EB significantly increased occludin protein without change in ZO-1 amount. B, RT-PCR results for occludin, ZO-1, and GAPDH mRNA using total RNA from colon lysates of 6 independent experiments. In OVX rats 8 h after a single EB injection (5 mg kg^{-1}), EB significantly increased occludin mRNA, blocked by ICI 182,780 (EB+ICI), without change in the expression of mRNA for ZO-1. Values are means \pm S.E.M. Ve: control vehicle. * $P < 0.05$ vs. corresponding control (Ve).

ER expression have been reported in the mouse intestine (Kawano *et al.* 2004). Our findings emphasize a multifaceted role of oestrogen in the physiological control of intestinal epithelium. For instance, oestradiol appeared to inhibit chloride ion exchange in distal colonic cells, an anti-secretory response also found to be oestrous cycle-dependent (O'Mahony & Harvey, 2008). These authors postulated that the anti-secretory effect of oestradiol may enhance salt and water retention in females, as commonly observed in oral contraceptive users with high oestrogen dosage, or during natural periods of elevated plasma oestrogen (Oelkers, 1996; Fruzzetti *et al.* 2007). Because water molecules can be driven passively by paracellular flux additional to the transcellular pathway (Masyuk *et al.* 2002), our data support the

hypothesis that the oestrogen-mediated decrease of paracellular permeability may act in combination with inhibition of chloride ion channels to modulate fluid movement throughout the intestinal epithelium. Such a mechanism may compensate the natriuretic and blood pressure lowering effect of endogenous progesterone during the luteal phase, thus contributing to body water homeostasis throughout the menstrual cycle (Oelkers, 1996). According to O'Mahony & Harvey (2008), the body fluid-retaining effects of oestrogen during the reproductive cycle may allow for volume expansion of the uterus in preparation for embryo implantation, a water transport also leading to reduction in viscosity of the uterine luminal fluid (Jablonski *et al.* 2003; Richard *et al.* 2003).

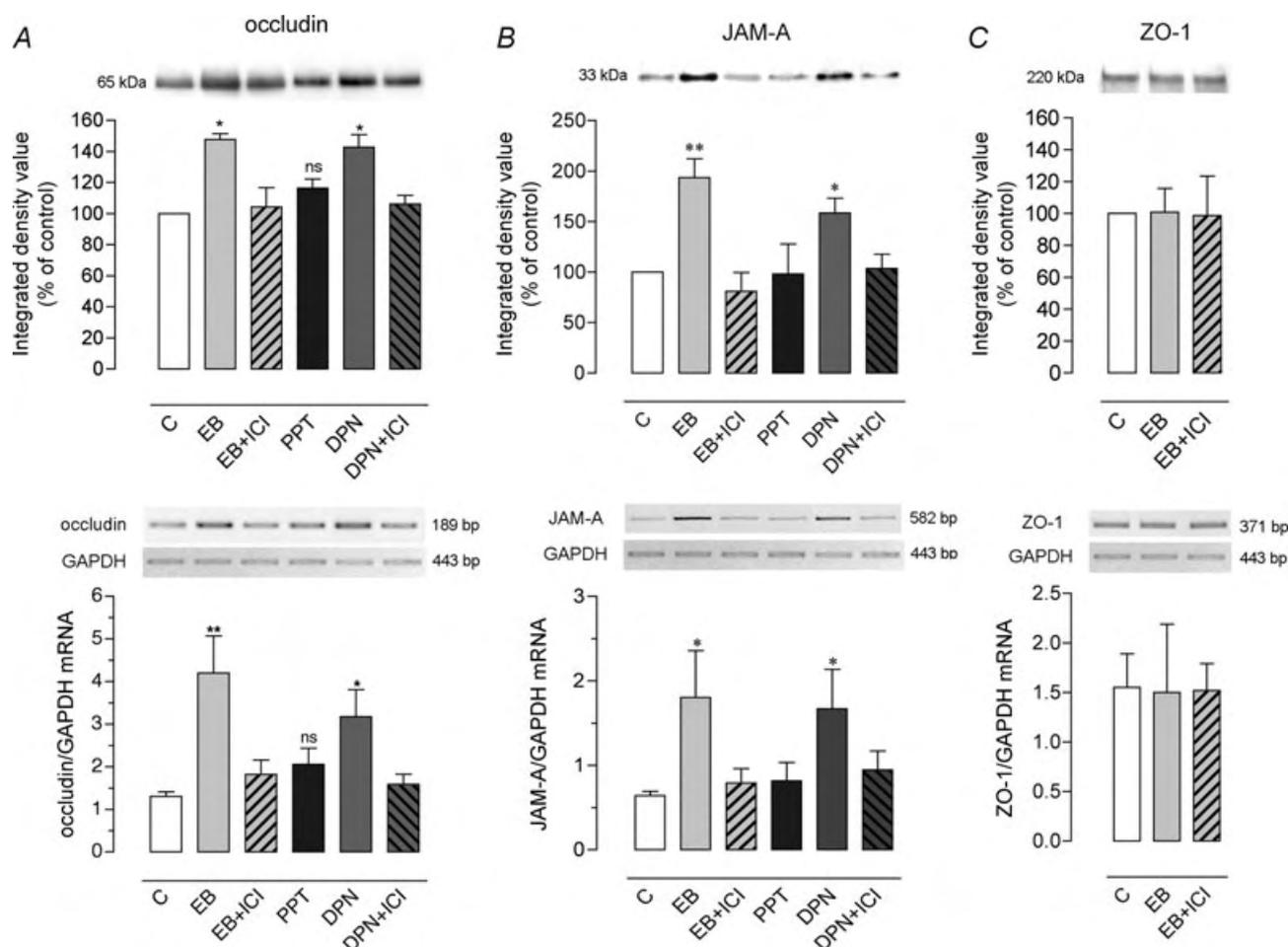


Figure 5. Effects of oestradiol, ER α and β agonists, and ICI 182,780 on occludin, JAM-A and ZO-1 expression in Caco-2 cells

The expression of occludin (A), JAM-A (B), and ZO-1 (C) proteins and mRNA were examined by Western blotting (upper panels) and RT-PCR (lower panels), with representative band images and corresponding densitometric analysis. Caco-2 cells were treated for 8 h with ethanol vehicle (C), or with EB (10 nM), DPN (100 nM) or PPT (100 nM), in the presence or absence of ER antagonist ICI 182,780 (ICI, 10 μ M). Note that EB like DPN, but not PPT, significantly increased mRNA and protein levels of occludin (A) and JAM-A (B), without effect on ZO-1 expression (C). Both EB and DPN effects on occludin and JAM-A expression were blocked by ICI. Each bar represents mean \pm s.e.m. from 6 to 7 independent experiments. $P = 0.01$, ANOVA; ** $P < 0.001$, * $P < 0.05$, and ns (not significant) (Bonferroni *post hoc* test) vs. control cells (C).

Oestrogens interact with at least two receptors ER α and ER β (Heldring *et al.* 2007). Herein we report that the EB-mediated decrease in epithelial permeability was mimicked by the ER β agonist DPN, but not by the ER α agonist PPT. Although both ERs were expressed in the colon, ER β predominates in normal colonic mucosa (Campbell-Thompson *et al.* 2001), consistent with the effect observed only through DPN stimulation in the present study. It is of note that DPN acts as an agonist on both ERs, but in support of the present data, DPN has

a 70-fold higher binding affinity and a 170-fold higher potency in transcription assays with ER β than with ER α (Meyers *et al.* 2001), and appeared as effective as EB stimulation to decrease intestinal permeability in our study, in contrast to PPT, thus confirming this effect only attributed to ER β activation. In the colon, ER β was mainly found in epithelial cells (Konstantinopoulos *et al.* 2003), suggesting that these cells are the main targets for the oestrogen-induced decrease in paracellular permeability. To address this question, we compared the effect of

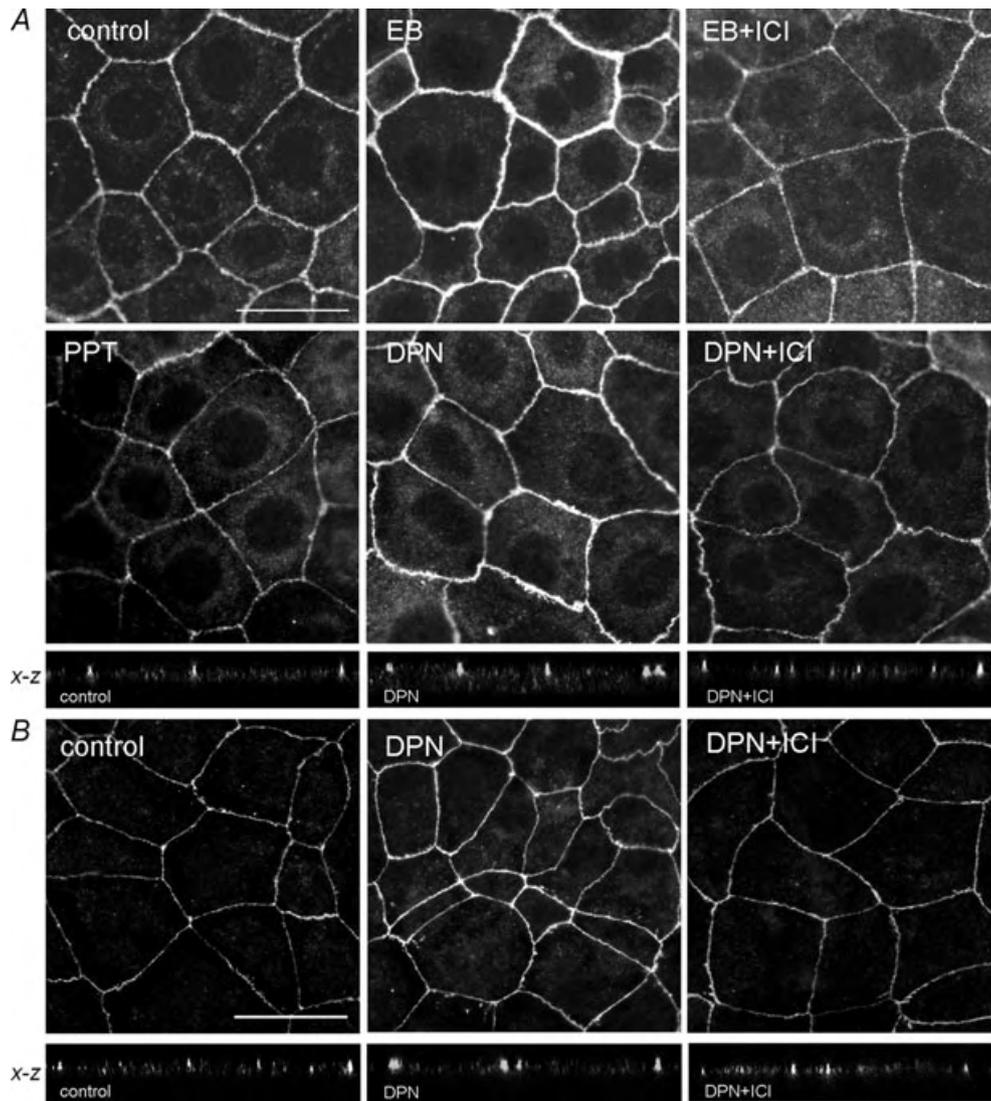


Figure 6. Immunofluorescence detection of occludin and JAM-A in Caco-2 cells

Cell monolayers were exposed for 8 h to ethanol vehicle (Control), EB (10 nM), DPN (100 nM), or PPT (100 nM), in the presence or absence of ER antagonist ICI 182,780 (ICI, 10 μ M). *A*, occludin: note that DPN like EB, but not PPT, increases occludin staining at the level of epithelial cell membranes, and ICI added 1 h before EB or DPN treatment blocked this effect. In confocal images in the x-z plane, note that DPN enhances occludin immunostaining at the apical cell-to-cell contact of epithelial cells compared to control cells, and this effect was abrogated in the presence of ICI 182,780. *B*, JAM-A, representative images of immunostaining with or without DPN treatment and ICI 182,780, and x-z plane confocal images showing modulation of epithelial JAM-A staining at apical sites. Scale bars = 25 μ m.

oestradiol in the rat colon and in a human intestinal cell line on the expression of TJ proteins that control the intercellular spaces. Tight junction proteins are composed of cytoplasmic and transmembrane proteins. Among them, occludin and ZO-1 contribute to the rate-limiting step for paracellular passage in intestinal epithelium (Turner, 2006). In human endothelial cell lines, it has been shown that the amount of occludin is inversely correlated to paracellular permeability, the latter being decreased when occludin expression is increased, a modulation mediated by oestradiol (Ye *et al.* 2003; Kang *et al.* 2006; Sumanasekera *et al.* 2007). In the rat colon, we report here that EB stimulation is associated with an increase of occludin protein, without changes in the amount of ZO-1. In addition, consistent with a transcription activity, the mechanisms involved an increase in occludin mRNA, an effect blocked by the ER antagonist ICI 182,780. A similar activation of occludin by oestradiol has been described in the mouse brain, where oestrogens also participate in the control of paracellular diffusion in the blood–brain barrier (Kang *et al.* 2006). Furthermore, the effect of EB was reproduced on cultured Caco2 cells in the present study, demonstrating that EB acts directly on epithelial cells to enhance occludin protein and mRNA. As reported in the colon, ER α and β were co-expressed in the human cell line Caco-2, with ER β the predominant subtype (Campbell-Thompson *et al.* 2001), and our data using the selective agonist DPN confirm that the ER β pathway is the intrinsic mechanism regulating occludin expression in colonic epithelial cells. To further explore the effects of oestradiol and DPN on Caco-2 cells, we also found increased expression levels of JAM-A, a transmembrane protein apically positioned at TJs with occludin in the colon (Vetrano *et al.* 2008). Several studies have implicated JAM-A in the regulation of intestinal barrier function. For instance, JAM-A deficiency in mice resulted in enhanced intestinal permeability to FITC-dextran and decreased TER (Laukoetter *et al.* 2007), and silencing of JAM-A in Caco-2 cells also resulted in increased epithelial permeability (Vetrano *et al.* 2008). Consistently, Vetrano *et al.* (2008) showed a dramatic loss of epithelial JAM-A that correlates with epithelial barrier defect in Crohn's disease and ulcerative colitis, the two major forms of inflammatory bowel disorders in humans. Interestingly, it has been proposed that JAM-A plays a pivotal role in the assembly of the TJ protein complex, by interacting with ZO-1 and stabilizing occludin at the junctions (Bazzoni *et al.* 2000). Hence, it is likely that an increased amount of epithelial JAM-A together with occludin ameliorates TJ integrity, thus improving the epithelial barrier function under oestrogen dominance. However, we cannot exclude that oestradiol may also target other proteins involved in the epithelial TJ complex, and not investigated in the present study, mainly the claudins, a large family of intercellular adhesion molecules (Van Itallie

& Anderson, 2006), of which up-regulation by various factors, for instance solutes and nutrients, has been shown to enhance paracellular sealing in the colon (Li *et al.* 2004; Amasheh *et al.* 2009; Suzuki & Hara, 2009).

In conclusion, the ER β -mediated increase of occludin and JAM-A expression in epithelial cells has been identified as the molecular mechanism for the oestrogen modulation of paracellular permeability in the colon. This is in support of the hypothesis that high plasma oestrogen level during the follicular phase of the reproductive cycle limits TJ opening in the normal colon, through up-regulation of transmembrane proteins leading to the reinforcement of the structural integrity of TJs, an effect suppressed during the luteal phase. Because impaired paracellular permeability is a trigger for inflammatory bowel disorders and chronic inflammation in humans (Meddings, 1997; Shen & Turner, 2006), the ER β pathway may represent a novel target to prevent or limit the epithelial barrier defect in these diseases.

References

- Ait-Belgnaoui A, Bradesi S, Fioramonti J, Theodorou V & Bueno L (2005). Acute stress-induced hypersensitivity to colonic distension depends upon increase in paracellular permeability: role of myosin light chain kinase. *Pain* **113**, 141–147.
- Amasheh S, Milatz S, Krug SM, Bergs M, Amasheh M, Schulzke JD & Fromm M (2009). Na⁺ absorption defends from paracellular back-leakage by claudin-8 upregulation. *Biochem Biophys Res Commun* **378**, 45–50.
- Artis D (2008). Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nat Rev Immunol* **8**, 411–420.
- Bazzoni G, Martinez-Estrada OM, Orsenigo F, Cordenonsi M, Citi S & Dejana E (2000). *J Biol Chem* **275**, 20520–20526.
- Campbell-Thompson M, Lynch IJ & Bhardwaj B (2001). Expression of estrogen receptor (ER) subtypes and ER β isoforms in colon cancer. *Cancer Res* **61**, 632–640.
- Cenac N, Chin AC, Garcia-Villar R, Salvador-Cartier C, Ferrier L, Vergnolle N, Buret AG, Fioramonti J & Bueno L (2004). PAR2 activation alters colonic paracellular permeability in mice via IFN- γ -dependent and -independent pathways. *J Physiol* **558**, 913–925.
- Condliffe SB, Doolan CM & Harvey BJ (2001). 17 β -oestradiol acutely regulates Cl⁻ secretion in rat distal colonic epithelium. *J Physiol* **530**, 47–54.
- Cong P, Pricolo V, Biancani P & Behar J (2007). Abnormalities of prostaglandins and cyclooxygenase enzymes in female patients with slow-transit constipation. *Gastroenterology* **133**, 445–453.
- Enmark E, Peltö-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, Nordenskjöld M & Gustafsson JA (1997). Human estrogen receptor β -gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab* **82**, 4258–4265.

- Frasor J, Barnett DH, Danes JM, Hess R, Parlow AF & Katzenellenbogen BS (2003). Response specific and ligand dose-dependent modulation of estrogen receptor (ER) α activity by ER β in the uterus. *Endocrinology* **144**, 3159–3166.
- Fruzzetti F, Lazzarini V, Ricci C, Quirici B, Gambacciani M, Paoletti AM & Genazzani AR (2007). Effect of an oral contraceptive containing 30 μ g ethinylestradiol plus 3 mg drospirenone on body composition of young women affected by premenstrual syndrome with symptoms of water retention. *Contraception* **76**, 190–194.
- Gorodeski GI (2007). Estrogen decrease in tight junctional resistance involves matrix-metalloproteinase-7-mediated remodelling of occludin. *Endocrinology* **148**, 218–231.
- Günel O, Bozkurt A, Deniz M, Sungur M & Yeğen BC (2004). Effect of sex steroids on colonic distension-induced delay of gastric emptying in rats. *J Gastroenterol Hepatol* **19**, 975–981.
- Günel O, Oktar BK, Özçınar E, Sungur M, Arbak S & Yeğen B (2003). Estradiol treatment ameliorates acetic acid-induced gastric and colonic injuries in rats. *Inflammation* **27**, 351–359.
- Harnish DC, Albert LM, Leathurby Y, Eckert AM, Ciarletta A, Kasaian M & Keith JC Jr (2004). Beneficial effects of estrogen treatment in the HLA-B27 transgenic rat model of inflammatory bowel disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **286**, 118–125.
- Harris HA, Katzenellenbogen JA & Katzenellenbogen BS (2002). Characterization of the biological roles of the estrogen receptors, ER α and ER β , in estrogen target tissues in vivo through the use of an ER α -selective ligand. *Endocrinology* **143**, 4172–4177.
- Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, Tujague M, Ström A, Treuter E, Warner M & Gustafsson JA (2007). Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev* **87**, 905–931.
- Homma H, Hoy E, Xu DZ, Lu Q, Feinman R & Deitch EA (2005). The female intestine is more resistant than the male intestine to gut injury and inflammation when subjected to conditions associated with shock states. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **288**, G466–G472.
- Houdeau E, Moriez R, Leveque M, Salvador-Cartier C, Waget A, Leng L, Bueno L, Bucala R & Fioramonti J (2007). Sex steroid regulation of macrophage migration inhibitory factor in normal and inflamed colon in the female rat. *Gastroenterology* **132**, 982–993.
- Jablonski EM, McConnell NA, Hughes FM & Huet-Hudson YM (2003). Estrogen regulation of aquaporins in the mouse uterus: potential roles in uterine water movement. *Biol Reprod* **69**, 1481–1487.
- Kang HS, Ahn HS, Kang HJ & Gye MC (2006). Effect of estrogen on the expression of occludin in ovariectomized mouse brain. *Neurosci Lett* **402**, 30–34.
- Kawano N, Koji T, Hishikawa Y, Murase K, Murata I & Kohno S (2004). Identification and localization of estrogen receptor α - and β -positive cells in adult male and female mouse intestine at various estrogen levels. *Histochem Cell Biol* **121**, 399–405.
- Konstantinopoulos PA, Kominea A, Vandoros G, Sykiotis GP, Andricopoulos P, Varakis I, Sotiropoulou-Bonikou G & Papavassiliou AG (2003). Oestrogen receptor beta (ER β) is abundantly expressed in normal colonic mucosa, but declines in colon adenocarcinoma paralleling the tumour's dedifferentiation. *Eur J Cancer* **39**, 1251–1258.
- Laukoetter MG, Nava P, Lee WY, Severson EA, Capaldo CT, Babbitt BA, Williams IR, Koval M, Peatman E, Campbell JA, Dermody TS, Nusrat A & Parkos CA (2007). JAM-A regulates permeability and inflammation in the intestine in vivo. *J Exp Med* **204**, 3067–3076.
- Lee GS, Kim HJ, Jung YW, Choi KC & Jeung EB (2005). Estrogen receptor α pathway is involved in the regulation of calbindin-D9K in the uterus of immature rats. *Toxicol Sci* **84**, 270–277.
- Li N, Lewis P, Samuelson D, Liboni K & Neu J (2004). Glutamine regulates Caco-2 cell tight junction proteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **287**, G726–G733.
- Masyuk AI, Marinelli RA & LaRusso NF (2002). Water transport by epithelia of the digestive tract. *Gastroenterology* **122**, 545–562.
- Meddings JB (1997). Intestinal permeability in Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* **11**, 47–53.
- Meyers MJ, Sun J, Carlson KE, Marriner GA, Katzenellenbogen BS & Katzenellenbogen JA (2001). Estrogen receptor- β potency-selective ligands: structure-activity relationship studies of diarylpropionitriles and their acetylene and polar analogues. *J Med Chem* **44**, 4230–4251.
- Moriez R, Leveque M, Salvador-Cartier C, Barreau F, Theodorou V, Fioramonti J, Bueno L & Eutamene H (2007). Mucosal mast cell proteases are involved in colonic permeability alterations and subsequent bacterial translocation in endotoxemic rats. *Shock* **28**, 118–124.
- Mullick AE, Walsh BA, Reiser KM, Walsh BA, Reiser KM & Rutledge JC (2001). Chronic estradiol treatment attenuates stiffening, glycoxidation, and permeability in rat carotid arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **281**, H2204–H2210.
- Oelkers WK (1996). Effects of estrogens and progestogens on the renin-aldosterone system and blood pressure. *Steroids* **61**, 166–171.
- O'Mahony F & Harvey BJ (2008). Sex and oestrous cycle-dependent rapid protein kinase signalling actions of estrogen in distal colonic cells. *Steroids* **73**, 889–894.
- O'Mahony F, Alzamora R, Betts V, LaPaix F, Carter D, Irnaten M & Harvey BJ (2007). Female gender-specific inhibition of KCNQ1 channels and chloride secretion by 17 β -estradiol in rat distal colonic crypts. *J Biol Chem* **282**, 24563–24573.
- Resta-Lenert S, Smitham J & Barrett KE (2005). Epithelial dysfunction associated with the development of colitis in conventionally housed mdr1a $^{-/-}$ mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **289**, G153–G162.
- Richard C, Gao J, Brown N & Reese J (2003). Aquaporin water channel genes are differentially expressed and regulated by ovarian steroids during the periimplantation period in the mouse. *Endocrinology* **144**, 1533–1541.
- Shen L & Turner JR (2006). Role of epithelial cells in initiation and propagation of intestinal inflammation. Eliminating the static: tight junction dynamics exposed. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **290**, G577–G582.

- Stauffer SR, Coletta CJ, Tedesco R, Nishiguchi G, Carlson K, Sun J, Katzenellenbogen BS & Katzenellenbogen JA (2000). Pyrazole ligands: structure-affinity/activity relationships and estrogen receptor- α -selective agonists. *J Med Chem* **43**, 4934–4947.
- Sumanasekera WK, Sumanasekera GU, Mattingly KA, Dougherty SM, Keynton RS & Klinge CM (2007). Estradiol and dihydrotestosterone regulate endothelial cell barrier function after hypergravity-induced alterations in MAPK activity. *Am J Physiol Cell Physiol* **293**, C566–C573.
- Suzuki T & Hara H (2009). Quercetin enhances intestinal barrier function through the assembly of zonula occludens-2, occludin, and claudin-1 and the expression of claudin-4 in Caco-2 cells. *J Nutr* **139**, 965–974.
- Thomas ML, Xu X, Norfleet AM & Watson CS (1993). The presence of functional estrogen receptors in intestinal epithelial cells. *Endocrinology* **132**, 426–430.
- Turner JR (2006). Molecular basis of epithelial barrier regulation: from basic mechanisms to clinical application. *Am J Pathol* **169**, 1901–1909.
- Van Itallie CM & Anderson JM (2006). Claudins and epithelial paracellular transport. *Annu Rev Physiol* **68**, 403–429.
- Verdu EF, Deng Y, Bercik P & Collins SM (2002). Modulatory effects of estrogen in two murine models of experimental colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **283**, G27–G36.
- Vetrano S, Rescigno M, Cera MR, Correale C, Rumio C, Doni A, Fantini M, Sturm A, Borroni E, Repici A, Locati M, Malesci A, Dejana E & Danese S (2008). Unique role of junctional adhesion molecule-A in maintaining mucosal homeostasis in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **135**, 173–184.
- Vongher JM & Frye CA (1999). Progesterone in conjunction with estradiol has neuroprotective effects in an animal model of neurodegeneration. *Pharmacol Biochem Behav* **64**, 777–785.
- Wada-Hiraike O, Imamov O, Hiraike H, Hultenby K, Schwend T, Omoto Y, Warner M & Gustafsson JA (2006a). Role of estrogen receptor β in colonic epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 2959–2964.
- Wada-Hiraike O, Warner M & Gustafsson JA (2006b). New developments in oestrogen signalling in colonic epithelium. *Biochem Soc Trans* **34**, 1114–1116.
- Weiser MJ, Wu TJ & Handa RJ (2009). Estrogen receptor- β agonist diarylpropionitrile: biological activities of R- and S-enantiomers on behavior and hormonal response to stress. *Endocrinology* **150**, 1817–1825.
- Xiao ZL, Pricolo V, Biancani P & Behar J (2005). Role of progesterone signalling in the regulation of G-protein levels in female chronic constipation. *Gastroenterology* **128**, 667–675.
- Ye L, Martin TA, Parr C, Harrison GM, Mansel RE & Jiang WG (2003). Biphasic effects of 17- β -estradiol on expression of occludin and transendothelial resistance and paracellular permeability in human vascular endothelial cells. *J Cell Physiol* **196**, 362–369.

Author contributions

All experiments were done at the Neuro-Gastroenterology & Nutrition Unit, UMR 1054, Institut National de la Recherche Agronomique, Research Center of Toulouse, France. Study concept and design: V.B. and E.H. Analysis and interpretation of data: V.B., M.L., C.B.-B. and E.H. Drafting of the article: V.B. and E.H. Critical revision for important intellectual content: L.B., J.F. and E.H. Final approval of the article: J.F. and E.H.

Acknowledgments

We thank Drs H. Guillou and R. Garcia-Villar for helpful comments and H. Tiphaine-Alice for statistical advice. This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche, grant ANR-06-PNRA-008-04, and by the Institut National de la Recherche Agronomique.

II. Impact of oral bisphenol A at reference doses on intestinal barrier function and sex differences after perinatal exposure in rats

Le Bisphénol A (BPA) est un xénoestrogène, monomère des plastiques polycarbonate et de résines époxy (Bisphénol A Diglycidyl Ether ou BADGE) au contact des aliments et boissons. Le BPA est utilisé à grande échelle dans l'industrie des emballages alimentaires, notamment pour la fabrication de biberons et dans les résines de protection intérieure des canettes de boisson et boîtes de conserves. Le BPA, classé comme perturbateur endocrinien, est retrouvé dans les liquides de l'organisme à des concentrations de 0,1 à 10 nM (sang, urines), dans le lait maternel, le liquide amniotique et les tissus fœtaux. Des nombreuses études mettent en évidence des effets du BPA à de faibles doses, suscitant des nombreux débats sur le risque sanitaire pour l'homme.

Sur la base de nos premiers résultats montrant la sensibilité de la barrière intestinale face aux oestrogènes circulants, et compte tenu des propriétés oestrogéno-mimétiques du BPA, l'objectif premier de cette étude a été d'évaluer l'impact d'une exposition chronique par voie orale au BPA (doses de références NOAEL, DJA et inférieures) chez la rate adulte sur la fonction de barrière intestinale. Les oestrogènes ayant des propriétés modulatrices dans la réponse inflammatoire et sensibilité viscérale, les effets du BPA ont également été évalué sur ces deux composantes impliquées dans les maladies inflammatoires de l'intestin et les troubles fonctionnels digestifs. Dans un deuxième temps, l'objectif de notre étude a été de déterminer les conséquences d'une exposition en période périnatale au BPA – une période jugée critique pour le développement de l'organisme et jamais évalué dans les études de toxicologie réglementaire – sur la fonction de la barrière intestinale à l'âge adulte (perméabilité et la réponse immunitaire).

Méthodologie : Pour évaluer l'effet propre du BPA sur la fonction de barrière intestinale, des rates adultes ont été ovariectomisées pour éliminer les sources endogènes en hormones ovariennes. Les animaux ont ensuite reçu par voie orale le BPA aux doses de références – NOAEL ou DJA pendant 15 jours. A la fin de cette période d'exposition, nous avons évalué l'impact oral a été évalué sur trois paramètres : 1/ la perméabilité paracellulaire colique au dextran-FITC 4kDa en chambres de Ussing ; 2/ la réponse inflammatoire dans une colite expérimentale 24h après l'administration intra-rectale d'

acide trinitrobenzène sulfonique (TNBS), par l'évaluation de l'activité de l'enzyme myeloperoxidase (MPO, un marqueur d'infiltration neutrophilaire) et l'expression de la cytokine proinflammatoire MIF (par Western blotting), et 3/ la sensibilité viscérale en réponse à une distension colrectale (nombre de contractions abdominales évaluées en électromyographie en réponse à des volumes de distension douloureux). Dans un dernier groupe de rates OVX exposées *per os* au BPA_{NOAEL}, des injections sous-cutanées de ICI 182.780 ont été réalisées pendant les 5 derniers jours de traitement au BPA pour déterminer l'implication des ERs dans les effets du contaminant sur ces trois paramètres. En utilisant, le même modèle pharmacologique de rates OVX, nous avons étudié l'effet du BPA oral sur l'expression des protéines transmembranaire oestrogéno-sensibles de jonctions serrées (occludine et JAM-A) et apprécié l'effet dose-réponse du contaminant sur la perméabilité paracellulaire colique.

Dans un deuxième temps, des rates gestantes ont été exposées au BPA_{NOAEL} par voie orale de la mi-gestation (G15) et jusqu'au sevrage des nouveau-nés (J21 post-natal). Dans la descendance F1, l'impact de l'exposition périnatale colique au BPA (exposition fœtale puis pendant l'allaitement) sur la perméabilité colique basale et la réponse inflammatoire dans une colite au TNBS a été apprécié à l'âge adulte (10 semaine post-natales) dans les deux sexes. Les conséquences sur la balance d'expression des ER α et β a également été évalué par qPCR dans les muqueuses coliques des descendants mâles et femelles.

Enfin, nous avons étudié les conséquences d'une exposition de 24h au BPA sur l'expression des protéines occludine et JAM-A dans la lignée cellulaire humaine Caco2.

Résultats : L'exposition chronique au BPA chez l'adulte est capable de diminuer la perméabilité paracellulaire colique aux deux doses de références NOAEL et DJA, un effet similaire à celui de l'oestradiol administré également par voie orale. Cette diminution de la perméabilité intestinale est dose-dépendante, avec un ED50 de 5,2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{jour}$, dix fois inférieure à la DJA, et un effet maximal observé à 0,5 $\text{mg}/\text{kg}/\text{jour}$. Comme pour l'oestradiol, l'effet du BPA sur la perméabilité intestinale est dû à une surexpression des protéines transmembranaires des jonctions serrées, occludine et JAM-A.

Dans les conditions d'une colite aiguë au TNBS, un traitement oral de 15 jours au BPA_{NOAEL} s'est accompagné d'une réduction des lésions tissulaires macroscopiques dans le côlon inflammé, d'une diminution de l'activité de l'enzyme MPO et de l'expression de la cytokine pro-inflammatoire oestrogéno-sensible MIF (*Macrophage Migration Inhibitory*

Factor). Le BPA_{DJA} a été sans effet sur ces mêmes paramètres. Enfin, en condition basales (hors inflammation), la sensibilité viscérale en réponse à une distension colorectale chez la rate OVX a été exacerbée après exposition au BPA_{NOAEL}, sans effet de la dose DJA. L'effet du BPA_{NOAEL} sur la réponse à la douleur a été similaire à celui produit par l'hormone mère oestradiol.

Chez l'adulte OVX, les effets du BPA sur les trois paramètres mesurés ont été bloqués par l'administration préalable de l'antagoniste ICI 182,780 confirmant l'implication des ERs.

Exposition périnatale au BPA_{NOAEL} : Un dimorphisme sexuel a été observé dans les effets du BPA sur la perméabilité intestinale et la colite expérimentale dans la descendance F1 exposée au BPA_{NOAEL} pendant la gestation et l'allaitement. En effet, une diminution de la perméabilité intestinale de 47% a été mise en évidence chez les femelles adultes de la génération F1, indépendamment de l'effet propre du cycle oestral car plus appuyées en oestrus du cycle (pour rappel, une baisse de perméabilité a été observée en phase folliculaire du cycle, dépendant des oestrogènes circulants). Concernant les paramètres inflammatoires, l'exposition périnatale aux BPA s'est révélée sans conséquences chez le mâle F1, mais délétère pour les femelles. Une augmentation importante de l'activité MPO et de l'expression de la cytokine MIF a été observée 24 heures après l'instillation intra-rectale de TNBS chez les femelles exposées au BPA par rapport au groupe contrôle non-exposé.

Le niveau d'expression des ERs au niveau de la muqueuse colique a révélé une diminution de l'expression de ER β chez les mâles exposés au BPA, sans effet sur l'expression de ER α , un déséquilibre pouvant expliquer le dimorphisme sexuel, le BPA ayant une activité oestrogénique essentiellement médié par les ER β dans le côlon. A l'inverse, l'expression de ERs est restée intacte chez les femelles exposées en période périnatale au BPA.

Les études sur la lignée cellulaire Caco-2 exposée 24h au BPA, a confirmé les résultats observés sur la muqueuse colique des rats, au moins sur la surexpression des protéines occludine et JAM-A dans les cellules épithéliales. La concentration de BPA utilisé pour cette expérience *in vitro* a été équivalente aux concentrations détectées dans les fluides humains (10nM).

Conclusion : Cette étude est la première à présenter l'intestin comme une cible du xénoestrogène BPA. Alors que la voie orale est la principale voie de contamination pour l'homme par le BPA, l'intestin n'a jusqu'ici été considéré que comme une voie d'absorption du produit avant sa distribution systémique vers les autres organes et fonctions naturellement sensibles aux hormones sexuelles (tractus génital, cerveau...). L'intérêt de cette étude a été de montrer que le BPA, aux doses de référence, est efficace pour moduler deux compartiments cellulaires oestrogéno-sensibles et impliqués dans la fonction de la barrière intestinale (réponse immunitaires et perméabilité), ainsi que la nociception intestinale à des stimuli périphériques. En particulier, nous révélons la très grande sensibilité de l'épithélium colique au BPA, avec un ED50 10 fois inférieur à la DJA en vigueur.

Par ailleurs, afin d'élargir la notion de la période critique d'exposition aux perturbateurs endocriniens, cette étude révèle des conséquences délétères du BPA dans le développement de l'intestin, se traduisant par une fragilité du système immunitaire à l'âge adulte, rendant les muqueuses coliques des femelles plus vulnérables face à un stimulus inflammatoire.

Impact of oral bisphenol A at reference doses on intestinal barrier function and sex differences after perinatal exposure in rats

Viorica Braniste^a, Aurore Jouault^a, Eric Gaultier^a, Arnaud Polizzi^b, Claire Buisson-Brenac^a, Mathilde Leveque^a, Pascal G. Martin^b, Vassilia Theodorou^a, Jean Fioramonti^a, and Eric Houdeau^{a,1}

^aNeuro-Gastroenterology and Nutrition Unit, Unité Mixte de Recherche 1054, and ^bPharmacology and Toxicology Laboratory, Unité de Recherche 66, ToxAlim Research Center, Institut National de la Recherche Agronomique, Toulouse 31027 cedex 3, France

Edited by Jan-Åke Gustafsson, Karolinska Institutet, Huddinge, Sweden, and approved November 17, 2009 (received for review July 10, 2009)

Bisphenol A (BPA), a chemical estrogen widely used in the food-packaging industry and baby bottles, is recovered in human fluids (0.1–10 nM). Recent studies have reported that BPA is hormonally active at low doses, emphasizing the debate of a risk for human health. Estrogen receptors are expressed in the colon, and although the major route of BPA exposure is food, the effects on gut have received no attention. We first examined the endocrine disrupting potency of BPA on colonic paracellular permeability (CPP), experimental colitis, and visceral sensitivity in ovariectomized rats orally exposed to 5 mg/kg/d BPA (i.e., the no observed adverse effect level), 50 µg/kg/d BPA (i.e., tolerable daily intake), or lower doses. BPA dose-dependently decreased basal CPP, with a half-maximal inhibitory dose of 5.2 µg/kg/d, 10-fold below the tolerable daily intake. This correlated with an increase in epithelial tight junction sealing, also observed in Caco-2 cells exposed to 10 nM BPA. When ovariectomized rats were fed with BPA at the no observed adverse effect level, the severity of colitis was reduced, whereas the same dose increased pain sensitivity to colorectal stimuli. We then examined the impact of perinatal exposure to BPA on intestinal permeability and inflammatory response in the offspring. In female rats, but not in male rats, perinatal BPA evoked a decrease of CPP in adulthood, whereas the proinflammatory response of colonic mucosa was strengthened. This study first demonstrates that the xenoestrogen BPA at reference doses influences intestinal barrier function and gut nociception. Moreover, perinatal exposure promotes the development of severe inflammation in adult female offspring only.

endocrine disruptor | gut permeability | inflammation | pain | estrogen

The xenoestrogen bisphenol A (BPA), a food contaminant with endocrine disruptor activity, is the monomer widely used to manufacture polycarbonate plastics including baby bottles, infant feeding containers or tableware (plates and mugs), and epoxy resin lining food and beverage cans (1, 2). Significant exposure of humans through diet is evidenced by the presence of BPA in urine, blood, fetal tissues, and amniotic fluid (3, 4). BPA leaches from the polymers into food and water under normal conditions, and exposure to elevated temperatures (boiling, heating) greatly increases its rate of migration (5, 6). There is a global concern for human health as BPA binds to estrogen receptors (ERs) (7), and can interfere with normal sex hormone balance. As a protective measure the US Environmental Protection Agency and European Food Safety Agency have established a tolerable daily intake (TDI) of 50 µg/kg/d, applying an uncertainty factor of 100 to the no observed adverse effect level (NOAEL) of 5 mg/kg/d. However, recent studies revealed that chronic exposure to these reference doses alters some biological endpoints (8, 9), warranting a request for reevaluation of human safe daily intake limits (4, 10). To date, most studies examining the estrogenic impact of BPA have focused on reproductive function (11–13) and, more recently, on brain development (14, 15). In contrast, although the gut is in direct contact with orally absorbed BPA, the endocrine impact on the intestinal barrier function remains an unexplored endpoint.

The intestinal barrier is a highly dynamic interface between external and internal environment of the body, playing an important role in maintaining mucosal immune homeostasis. Mainly dedicated to the absorption of nutrients and water (16, 17), the intestinal epithelium also provides a physical barrier designed to restrict the passage of a broad spectrum of noxious and immunogenic substances from the lumen (18). This is of particular importance in the colon, where the complex microbial composition provides an abundant source of potentially detrimental ligands and antigens that may cause chronic mucosal injury. Maturation of the intestinal barrier function occurs early in life, prenatally and postnatally, and is linked to increased intestinal permeability stimulating the development of the mucosal immune system (19–21). In recent years, several lines of clinical and experimental evidence have reported that estrogens are involved in the development and regulation of the gut barrier. Altogether, a sex difference in intestinal permeability and inflammation (22), the prevalence of irritable bowel syndrome in women (23), the fluctuations of irritable bowel syndrome-associated abdominal pain in women during their menstrual cycle (24), as well as the wide expression of estrogen receptors (ERs) in human fetal and adult colonic mucosa (25, 26) suggest that estrogens play a key role. In animal studies, estrogen action on intestinal permeability, inflammation, and viscerosensitivity are controlled by ERs in gut epithelial cells and sensory neurons, the latter conveying peripheral information to the central nervous system (27–29). Therefore, we assumed that BPA may target these receptors.

Accordingly, the present study aimed at comparing the impact of oral exposures to BPA and estradiol benzoate (EB) on the intestinal barrier function. In ovariectomized (OVX) rats exposed for 15 d to the NOAEL or the predicted safe dose TDI, we first examined colonic paracellular permeability under basal conditions (i.e., without inflammation), then inflammatory response through determination of neutrophil infiltration and colonic content of macrophage migration inhibitory factor (MIF), a proinflammatory cytokine targeted by estradiol in colitis (28). Second, we tested the hypothesis that daily oral exposure to BPA may impact pain perception in a model of visceral sensitivity in response to colorectal distension. Third, as low doses of BPA decreased intestinal permeability, which could adversely interfere with the maturing process of the gut, we also evaluated the effects of a perinatal exposure to BPA on intestinal barrier function in the offspring.

Author contributions: V.B., P.M., V.T., J.F., and E.H. designed research; V.B., A.J., E.G., A.P., C.B.-B., and M.L. performed research; V.B., A.J., E.G., A.P., C.B.-B., M.L., P.M., V.T., J.F., and E.H. analyzed data; and V.B. and E.H. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

¹To whom correspondence should be addressed. E-mail: eric.houdeau@toulouse.inra.fr.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/cgi/content/full/0907697107/DCSupplemental.

Results

Low Doses of BPA Decrease Intestinal Permeability in the OVX Rat.

Estradiol affects colonic paracellular permeability (CPP) through ERs in epithelial cells (27). OVX rats were used for complete depletion of endogenous sex hormones, and the influence of a daily oral exposure to BPA was examined on CPP in Ussing chambers. Relative to the vehicle-treated OVX controls, BPA caused a dose-dependent decrease of CPP (Fig. 1A), with a half-maximal inhibitory dose of 5.2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$ (95% CI, 0.8–32 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$), which is below the human TDI, and maximal inhibition at 0.5 mg/kg/d. To determine whether the decrease in CPP was related to the estrogenicity of BPA, the reference doses were tested in the presence versus the absence of the ER antagonist ICI 182,780, and compared with the effect of EB. As shown in Fig. 1B, the NOAEL and TDI of BPA significantly decreased the paracellular flux to dextran FITC by 55% and 46%, respectively, compared with vehicle-treated OVX controls ($P < 0.01$). The decrease in CPP was similar to the one observed in EB-treated rats (0.33 ± 0.03 vs. $0.71 \text{ nmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1} \pm 0.09$ in controls; $P < 0.01$), and both BPA and EB effects were prevented in the presence of ICI 182,780 (Fig. 1B).

Effect of BPA on Tight Junction Proteins and ER Expression in the Colon.

Estradiol enhances the expression of occludin and junctional adhesion molecule (JAM)-A, two transmembrane proteins that sealed intercellular spaces at apical tight junctions (TJs) (27). A dose-related increase in occludin and JAM-A protein levels was observed in the colon of OVX rats exposed to BPA, reaching statistical significance at NOAEL, and this effect was blocked by ICI 182,780 (Fig. 2A). Colonic mucosa analyzed for expression levels of ER α and ER β mRNA showed predominant expression of ER β , and BPA at NOAEL did not affect the expression levels of both ERs compared with OVX controls (Fig. 2B).

To further investigate whether BPA also affects paracellular sealing in human colonic cells, Caco-2 monolayers were immunostained for occludin and JAM-A. In control cells, labeling occurred as distinct continuous bands lining cell borders (Fig. 3). In BPA-exposed cells (10 nM), occludin and JAM-A staining were markedly increased at TJ level, and ICI 182,780 completely prevented this effect (Fig. 3).

Effects of BPA on the Inflammatory Response in the OVX Rat.

Using the rat model of trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced colitis, the neutrophil infiltration was assessed in the colon of OVX rats receiving EB, BPA, or the vehicle corn oil for 15 d before in-

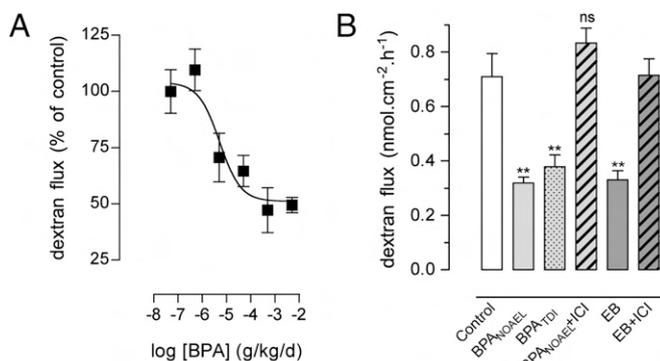


Fig. 1. Comparative effects of BPA and estradiol on intestinal permeability in OVX rats. (A) Dose effect of BPA (0.5 μg to 5 mg/kg/d for 15 d by mouth) on colonic paracellular permeability (six to eight rats per group; $P < 0.05$, one-way ANOVA). (B) Effects of 15-d treatment with corn oil (control), BPA NOAEL or TDI, or EB with or without ICI 182,780 (ICI) on paracellular dextran flux (5–13 rats per group). ** $P < 0.01$ vs. controls; ns, not significant on one-way ANOVA. Bars are means \pm SEM of triplicate measurements.

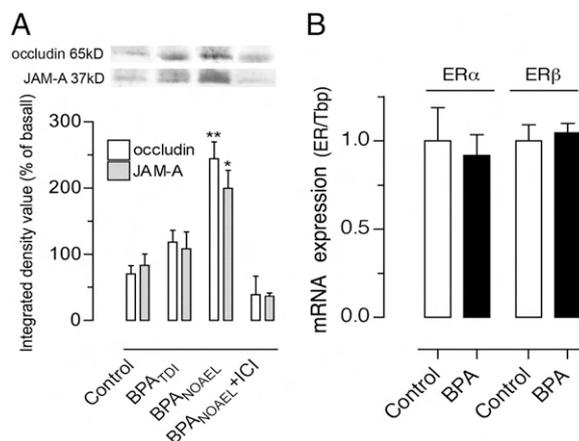


Fig. 2. Effects of BPA on TJ proteins and ER expression in OVX rats. (A) Representative Western blot lanes for occludin and JAM-A and corresponding densitometric analysis of protein levels in the colon of rats fed with BPA at NOAEL, TDI, or vehicle (control), with or without ICI 182,780. Note a dose-related increase of occludin and JAM-A in BPA-treated OVX rats. (B) Relative expression levels of ER α and ER β mRNA in the colon of OVX rats treated with vehicle (control, set to 1) or BPA NOAEL. Using the same threshold for both ERs, ER β exponential PCR amplification occurred at 4.2 ± 0.2 cycle thresholds earlier compared with ER α , consistent with predominant ER β expression. Bars are means \pm SEM of duplicate measurements (8–10 rats per group). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. vehicle controls (*t* test).

flammation. Compared with noninflamed rats, a sharp increase in colonic myeloperoxidase activity (MPO) was observed in all experimental groups 24 h after induction of colitis (Fig. 4A). In inflamed conditions, MPO activity in TDI-treated rats did not differ from controls, whereas, similar to EB treatment, the NOAEL for BPA significantly decreased MPO activity compared with control inflamed rats (-43% ; $P < 0.05$), and coadministration of ICI 182,780 prevented both BPA and EB effects (Fig. 4A). In addition, a 32% decrease in tissue MIF content was observed in BPA NOAEL-treated rats compared with inflamed controls ($P < 0.05$), and ICI 182,780 blocked this effect (Fig. 4B).

BPA Induces Visceral Hypersensitivity in the OVX Rat.

Colorectal distention (CRD) induces abdominal contractions, and this visceromotor response (VMR) is used to assess visceral pain. Estradiol induces hyperalgesia in response to CRD in rats (29). To test whether BPA affects colorectal sensitivity, we measured the VMR to graded intensities of CRD. Fig. 5A shows that the VMR in the TDI group of rats did not differ from controls. In contrast, at the NOAEL, BPA significantly increased the VMR to noxious stimuli (0.8–1.2 mL) compared with controls ($P < 0.001$), similarly to EB (Fig. 5A). Coadministration of ICI 182,780 completely prevented the enhanced VMR in the EB- and BPA-treated rats (Fig. 5B).

To further determine whether the enhanced VMR to noxious stimuli resulted from change in muscle tone after EB or BPA exposure, the colonic compliance was determined through the measurement of the pressure–volume relationship using a barostat. Fig. S1 shows a linear relationship between the volume and resulting pressure in all groups of rats. This indicates that neither BPA nor EB affect the muscular tone of colonic wall, and the increase in VMR induced by isovolumic distension did not result from changes in colonic compliance.

Perinatal BPA Alters Mucosal Immune Function in Female Offspring.

In rats perinatally exposed to the NOAEL of BPA, basal intestinal permeability assessed in adulthood revealed a significant decrease in the colonic dextran flux. This change was sex-specific, observed only in female rats compared with controls assessed at the same estrous stage (-47% ; $P < 0.01$; Fig. 6A). In contrast, perinatal BPA resulted in a marked decrease of ER β mRNA

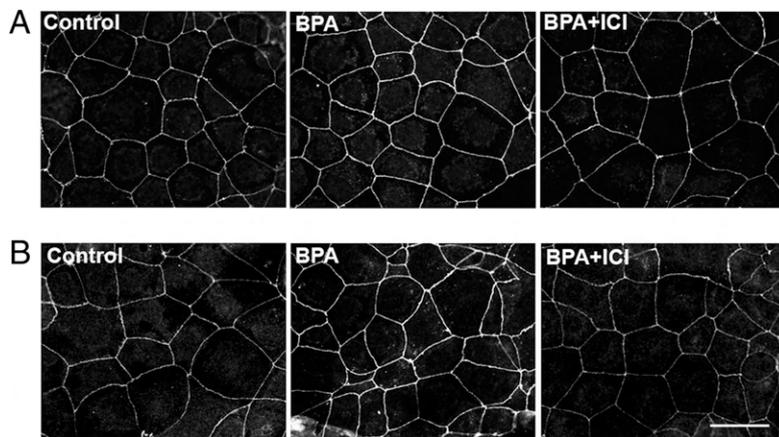


Fig. 3. Immunofluorescence detection of occludin (A) and JAM-A (B) in Caco-2 cells exposed for 24 h to ethanol vehicle (control) or BPA (10 nM) with or without ICI 182.780 (10 μM). Note that BPA increases occludin and JAM-A staining in epithelial cell membranes, and ICI 182.780 added 24 h before BPA blocked this effect. (Scale bars: 25 μm.)

levels in the colon of male offspring only, with no effects on ERα expression (Fig. 6B).

Twenty-four hours after induction of TNBS colitis, MPO activity significantly increased in all inflamed rats, and enhanced MPO activity was observed in females perinatally exposed to BPA compared with vehicle (+40%; $P < 0.05$), whereas no difference occurred in male rats (Fig. 7A). Similarly, MIF protein levels were increased in inflamed female rats with perinatal BPA compared with controls ($P = 0.01$), but not in male rats (Fig. 7B).

Discussion

Our study shows that the xenoestrogen BPA exerts estrogen-like activities in the intestine of rats orally exposed to reference doses. These effects were observed at the currently accepted NOAEL (5 mg/kg/d) derived from toxicological studies conducted for risk-assessment purposes. Our findings show that, similarly to estradiol, BPA at the NOAEL decreased basal epithelial permeability in the colon and enhanced nociceptive responses from the gut. The effect on intestinal permeability was further observed at the reference safe limit for human exposure (TDI, 50 μg/kg/d), demonstrating that gut epithelial barrier is highly sensitive to low doses of BPA.

In addition to transcellular exchanges, the paracellular flux is a major physiological component of the epithelial barrier function, and is controlled by the integrity of the apical TJs that seal paracellular spaces between cells (18). In physiological conditions, the

intestinal barrier is not impermeable but leaky, allowing fluid transport (17) and, at the colonic level, communication between the mucosal immune system and the commensal flora, playing a major role in antigen sampling and the development of tolerance (30). We have recently shown that the basal permeability in the female colon displays a high sensitivity to circulating estrogens, and is not static, but fluctuates during the reproductive cycle, being decreased in estrous stages under plasma estrogen dominance (27). In rodents as well as in humans, ERβ is the predominant ER in the colon, with very weak expression of ERα (25, 26), and estradiol acts primarily through ERβ to enhance expression of the TJ proteins occludin and JAM-A, thus reducing paracellular spaces (27). The present results show that oral BPA evokes similar ERβ activity, consistent with a higher binding affinity for this receptor (7). First, oral BPA in OVX rats did not affect the ER expression pattern in the colon, and BPA dose-dependently decreased paracellular permeability, an effect prevented by the ER antagonist ICI 182.780. Second, both occludin and JAM-A were found up-regulated in the colon of NOAEL- and TDI-treated rats, as well as in the human Caco-2 cell line exposed to 10 nM BPA [i.e., a concentration commonly found in human fluids (3, 4)], a situation reported only in the presence of an ERβ specific ligand in such cells (27).

Of particular interest is the observation that BPA impacts intestinal permeability at levels below the TDI, i.e., at exposure levels usually considered as safe for humans. There is now growing evidence showing endocrine-disrupting effects of BPA at doses lower than the reference limits (11, 12, 31, 32). The present dose–response study on intestinal permeability shows a half-maximal inhibitory dose for BPA 10 fold below the TDI.

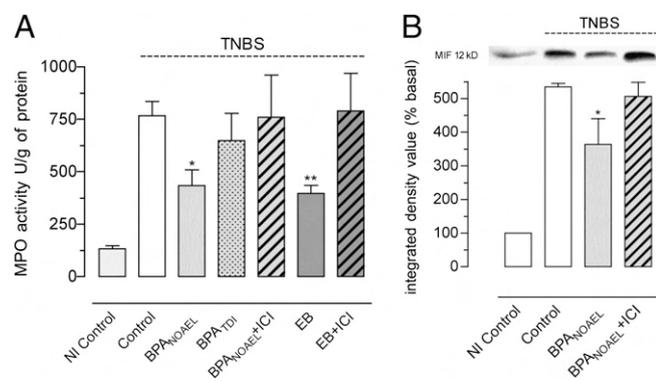


Fig. 4. Comparative effects of BPA and estradiol on colitis in OVX rats. (A) Colonic MPO 24 h after induction of TNBS colitis in OVX rats exposed for 15 d to corn oil (control), EB, or BPA at NOAEL or TDI with or without ICI 182.780 (ICI). Noninflamed (NI) controls received intracolonic saline solution. (B) Representative Western blot lanes and corresponding densitometric analysis of macrophage MIF in the same protein extracts. Bars are means ± SEM of duplicate measurements (5–13 rats per group). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. inflamed controls (one-way ANOVA).

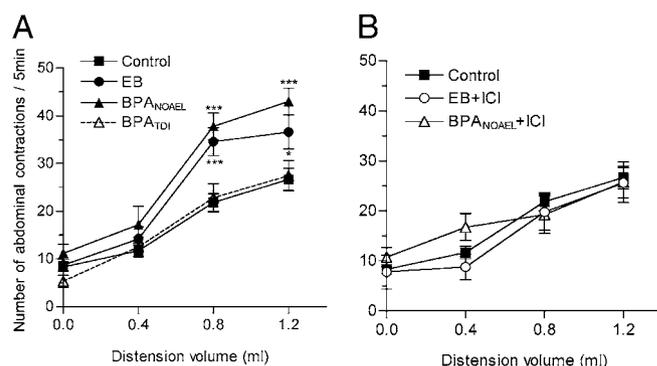


Fig. 5. Comparative effects of BPA and estradiol on VMR to colorectal distension in OVX rats exposed for 15 d to (A) corn oil (control), EB, or BPA NOAEL or TDI, and (B) with ICI 182.780 (ICI) (5–14 rats per group). * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs. controls (two-way ANOVA).

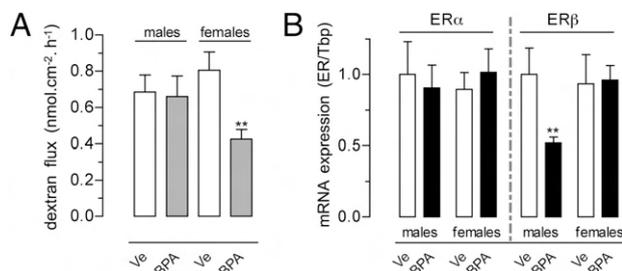


Fig. 6. (A) Intestinal permeability and (B) relative expression levels of ER α and ER β mRNA in the colon of rats perinatally exposed to BPA NOAEL or vehicle (Ve). For each ER, data were calibrated to male controls (set to 1). Bars are means \pm SEM of duplicate measurements (4–11 rats per group). ** $P < 0.01$ vs. corresponding controls (t test).

Moreover, this dose is threefold lower than the maximal exposition level of 14.7 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$ reported by the National Toxicology Program in children. It is thus questionable whether a daily gut exposure to low doses of BPA may have implications for human health. Estrogens show antiinflammatory activity in the gut, decreasing the severity of colitis in animal models of human inflammatory bowel diseases (28). Similarly, we showed that BPA at NOAEL in OVX rats provides anti-inflammatory activity at the onset of inflammation, in reducing neutrophil infiltration and tissue level of MIF, a proinflammatory cytokine involved in the pathogenesis of inflammatory bowel disease known as a target for estrogen-mediated protection in the colon (28). Because the TDI BPA had no effect, these findings suggest that a daily BPA exposure does not represent a risk factor in developing inflammation in the adult female gut. Conversely, the water-transporting capacity of the colon is of considerable physiological importance, particularly through its capacity to regulate the passive water secretion through the paracellular pathway (17, 33), and it can be assumed that BPA interferes with this process. Indeed, plasma estrogen dominance during the follicular period of the reproductive cycle inhibits chloride ion secretion in the colon (33), and decreases paracellular spaces (27), 2 mechanisms that limit the transport of water toward the gut lumen, thus leading to body fluid retention. On this basis, the ability of low doses of BPA to permanently decrease the paracellular permeability could enhance salt and water retention in women, as commonly observed in high estrogen states associated with the contraceptive pill or hormone replacement therapy or during pregnancy (34, 35).

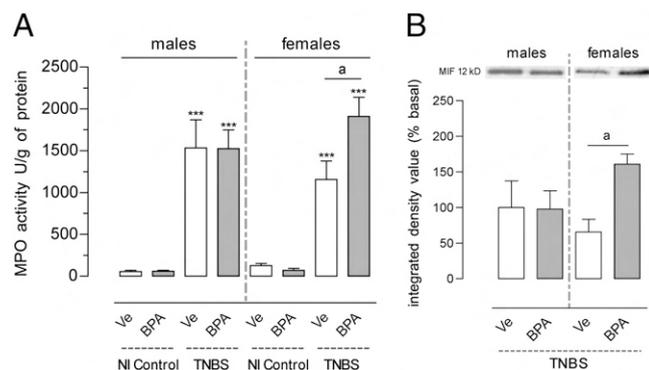


Fig. 7. (A) MPO and (B) Western blot analysis of MIF in the colon 24 h after induction of TNBS colitis in rats perinatally exposed to BPA NOAEL or vehicle (Ve). NI, noninflamed controls with intracolonic saline. Bars are means \pm SEM of duplicate measurements (five to eight rats per group). *** $P < 0.001$ vs. corresponding noninflamed controls; ^a $P < 0.05$ (t test).

Abdominal pain is a recurrent syndrome in intestinal functional disorders and sex hormones influence pain perception in women (23). However, visceral nociception has never been considered as a target for xenoestrogen chemicals such as BPA, although estrogens enhance visceral sensitivity to colorectal stimuli (29). The gastrointestinal tract is highly innervated, and primary sensory afferents convey information between intestine and central nervous system, adapting nociceptive behavior. Estrogen receptors are widely expressed throughout the sensory processing pathway, including dorsal root ganglia and spinal cord (36, 37). Our study showed that BPA induces visceral hypersensitivity to graded intensities of colorectal distension, an effect blocked by ICI 182,780, thus depending on ER binding activity. Because BPA as well as estradiol did not change the compliance of the colon, it is concluded that the hyperalgesic effect is neurally mediated, and not related to changes in the muscular tone of the colon. These data support a putative contribution of chronic low-level exposure to chemical estrogens in the genesis of visceral hypersensitivity states. In the present study, visceral pain was modulated only by a NOAEL dose regimen of BPA, and not by TDI. However, NOAEL is the reference dose in rodents for risk-assessment purposes in classical toxicological studies, considered without any effect in biological functions, and is used as a base to calculate the TDI considered safe for humans. These findings reinforce the idea that reevaluation of BPA's NOAEL would be necessary to better address public health issues related to this chemical (4, 10).

Toxicological Evaluation of Perinatal Exposure to BPA. Intestinal paracellular permeability is high at birth and mucosal immune mechanisms are immature in neonates. A high-permeability state in early infancy reflects the development of the gut mucosal barrier (38) that precedes a period of epithelial TJ sealing to provide an effective barrier against foreign agents (19, 20). BPA ingested by mothers is present in fetal tissues (39) and human milk (40), and leakage of BPA from polycarbonate baby bottles under real use conditions has been demonstrated (6). As ER β is the only ER detectable in human fetal colon (41), we speculated that a BPA-mediated alteration of gut permeability in the perinatal period of life may have restricting effects on the developing immune system in the colon. Indeed, the maturing gut is highly permeable to sugars and proteins from human milk to promote infant growth (19, 20), as well as to nucleotides that improve infant immune status (21). Mice perinatally exposed to BPA show immune system impairment, particularly regarding the developing T cell population (42). We showed that rats exposed in utero and during lactation to BPA NOAEL ingested by their dams exhibited intestinal barrier dysfunctions in adulthood, with sex-related differences in gut susceptibility to BPA effects. First, we observed decreased colonic paracellular permeability in the female offspring, as reported herein in OVX rats fed with oral BPA at NOAEL or TDI, but not in male offspring. Furthermore, we showed that neutrophil infiltration in the colon faced with inflammation was dramatically enhanced in female rats only. The latter correlated with an increase in the tissue levels of MIF, a stimulating factor of proinflammatory cytokines in acute colitis (28). It is noteworthy that, in contrast with the antiinflammatory effect of a direct NOAEL exposure in OVX rats, the same dose administered to pregnant and lactating mothers resulted in opposite effects in female offspring in adulthood. It is also remarkable that this deleterious impact was observed during estrus, i.e., at a time of the reproductive cycle when the colon of adult females is more resistant to injury, and produces less proinflammatory cytokines when challenged by experimental inflammation, as a result of a protective influence of plasma estrogen dominance (22, 28). Our results clearly show that the endocrine disruptor effects of BPA vary depending on age of the gut, and that a perinatal exposure has a long-term effect on mucosal immune defenses that predisposes female offspring to enhanced proinflammatory responses in the colon. Interestingly, male offspring perinatally exposed to BPA showed decreased ER β expression in the

colon, an effect not observed in female offspring. This finding supports our hypothesis that a dominant expression of ER β in the developing gut barrier is critical for the endocrine disruptor activity of BPA, and that a selective down-regulation of ER β in male offspring contributes to sex differences, making male offspring rats less sensitive to the intestinal effects of the xenoestrogen.

In summary, this study shows that the gastrointestinal tract is a sensitive target for estrogenic food contaminants such as BPA. Despite its weak estrogenic activity, BPA at the reference doses was found to affect the epithelial barrier function and to enhance visceral nociceptive response by binding to ERs. Importantly, our study shows that the perinatal development of the intestinal barrier represents a critical window for endocrine disruptor effects of BPA in the gut, and may represent a risk factor in female offspring for developing severe colonic inflammation in adulthood. In addition, based on high sensitivity to BPA exposure, the colon epithelium may serve as a valuable model for the risk evaluation of low doses of environmental estrogens, and contribute to establish accurate acceptable human exposure levels.

Materials and Methods

Animals and Treatment. Adult female Wistar rats (Janvier) weighing 180 to 200 g were housed in cages under a 12:12-h light–dark cycle, maintained at $21 \pm 1^\circ\text{C}$. They were fed a standard diet with free access to water. All protocols were approved by the local institutional animal care and use committee in compliance with the European laws on the protection of animals (86/609/EEC).

In a first series of experiments, OVX rats were treated for 15 d by oral gavage as follows: (i) corn oil as vehicle (control), (ii) BPA (Sigma) 5 mg/kg/d (BPA NOAEL), (iii) BPA 50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$ (BPA TDI), (iv) EB (Sigma) 0.6 mg/kg/d. Three groups of rats receiving BPA NOAEL and 2 groups treated with EB received a daily s.c. injection of the ER antagonist ICI 182,780 (2 mg/kg/d in olive oil; Tocris) for the last 5 d of treatment. Rats were used for permeability assay in Ussing chambers (5–13 rats per group), or induction of experimental colitis (5–13 rats per group), or assessment of visceral pain (5–14 rats per group). In a dose-dependent experiment, OVX rats were orally treated with BPA (0.5 μg to 5 mg/kg/d) for 15 d ($n = 6$ –8 rats per group) then used for permeability assay.

A second series of experiments was conducted in which BPA at NOAEL or vehicle (corn oil) was orally administered to pregnant females from d 15 of pregnancy until weaning on day 21 postpartum. Male and female offspring rats were then fed with standard diet until adulthood (10 weeks postpartum), and used for permeability assay (8–10 rats per group) or induction of experimental colitis (8–13 rats per group). In female rats, sexual cycle stages were assessed by daily vaginal smears, and only rats in estrus were used.

Ussing Chambers Experiments. Immediately after the rats were euthanized, 3 colonic strips from each rat were used to assess paracellular permeability as described by Braniste et al. (27). Strips were mounted in Ussing chambers (Easymount) with a flux area of 0.5 cm^2 and bathed in 5 mL of oxygenated Krebs-Henseleit solution (Sigma) at 37°C . Permeability was assessed by measuring mucosal to serosal flux of FITC-labeled 4-kDa dextran (Sigma) during 1 h, and expressed as the flux of dextran crossing 1 cm^2 of epithelium per hour ($\text{nmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$). Data are the means of triplicate measurements.

Induction of Experimental Colitis and Measurement of MPO. Under anesthesia, colitis was induced by intracolonic administration of TNBS (80 mg/kg in 50% ethanol; Sigma), and control rats received sterile saline solution (28). Rats were euthanized 24 h after treatment and 0.5-cm samples of distal colon were prepared for measurement of MPO activity, a marker of polymorphonuclear neutrophil primary granules (28). Tissues were suspended in potassium phosphate buffer and homogenized on ice. After 3 cycles of freezing and thawing, suspensions were centrifuged at $10,000 \times g$ for 15 min (4°C) and supernatants were discarded. Pellets were resuspended in the detergent hexadecyltrimethylammonium bromide buffer (Sigma) to release

MPO from the primary granules. After sonication on ice and centrifugation ($10,000 \times g$, 15 min, 4°C), supernatants were assayed spectrophotometrically for MPO activity. Results were expressed as MPO activity U/g protein.

Protein Extraction and Western Blot. Colons were homogenized in RIPA buffer (1% Igepal, 0.5% deoxycholic acid, and 0.1% SDS in Tris buffered saline solution 1 \times ; pH 7.4) with protease inhibitors (Roche Diagnostics), and centrifuged at $10,000 \times g$ for 10 min (4°C). Protein concentrations were assessed using the BC Assay Uptima kit (Interchim), and equal amounts of protein were separated by SDS/PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes. Blocking and incubation were performed as already described (27, 28) with polyclonal rabbit anti-MIF antibody (Torrey Pines Biolabs), anti-occludin or anti-JAM-A (Zymed Laboratories), and secondary peroxidase-labeled anti-rabbit IgG (Visualizer Detection Kit; Upstate). Bands were visualized using SuperSignal West Femto (Thermo Scientific). Relative values of band density were estimated using ImageJ software (National Institutes of Health).

Real-Time PCR. Total RNA from stripped colonic mucosa was extracted with TRIzol (Invitrogen) and reverse-transcribed with a high-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems). SYBR green real-time quantitative PCR assays (primers in Table S1) were performed on an ABI PRISM 7000 SDS (Applied Biosystems). All data were normalized by TATA box binding protein expression levels and were analyzed using LinRegPCR (43).

Colorectal Distension and Colonic Compliance. Five days before experiments, rats were surgically equipped with NiCr wire electrodes implanted bilaterally into the abdominal external oblique muscle and exteriorized on the back of the neck. Rats were accustomed for 3 d to be in polypropylene tunnels (diameter, 6 cm; length, 25 cm) before CRD. The balloon (2 mm diameter, 2 cm length) consisting of an arterial embolectomy catheter (Fogarty; Edwards) was inserted into the rectum at 1 cm from the anus, then inflated from 0 to 1.2 mL in increments of 0.4 mL, each lasting 5 min. Electromyographic signals of abdominal muscles in response to CRD were amplified (Bio Amp; AD Instruments), filtered (high frequency, 10 kHz; low frequency, 500 Hz), acquired by a PowerLab unit (AD Instruments) at a rate of 1,000 samples per second, then recorded in Chart software. The VMR was expressed as the number of abdominal contractions per 5 min. For compliance measurement, a 4-cm-long latex balloon was connected to computerized barostat (INRA). Colonic pressure and balloon volume were monitored on a potentiometric recorder (L6514; Linseis). For isobaric distensions, balloon was inflated from 0 to 60 mm Hg in increments of 15 mm Hg, each lasting 5 min.

Cell Culture and Immunofluorescence. Human colonic cell line Caco-2 were routinely grown in phenol-red free DMEM (MidiMed), as previously described (27). Cells plated on glass coverslips were exposed in triplicate to BPA (10 nM) for 24 h in charcoal stripped fetal bovine calf serum, with or without ICI 182,780 (10 μM) added 24 h before BPA. All chemicals were predissolved in 100% ethanol, then diluted with the medium to final concentration, whereas control cells were exposed to vehicle ethanol (final dilution $<0.1\%$). Caco-2 monolayers were fixed and permeabilized in methanol–acetic acid (95%/5%) for 20 min at -20°C . Blocking and incubation were performed as described (27) with polyclonal rabbit anti-occludin (1:100 in PBS solution) or anti-JAM-A (1:25 in PBS solution; Zymed Laboratories), and secondary Alexa fluor 488–conjugated donkey anti-rabbit (1:2,000 in PBS solution; Molecular Probes/Invitrogen). Cell monolayers were examined under a Nikon 90i fluorescence microscope.

Statistical Analysis. Results are expressed as means \pm SEM. Statistical significance was assessed by Student t test or ANOVA followed by Bonferroni post hoc test for multiple comparisons when appropriate (Prism 4 software; GraphPad). A P value <0.05 was considered significant.

ACKNOWLEDGMENTS. We thank Dr. Daniel Zalko for valuable comments on the manuscript. This work was supported by Grant ANR-06-PNRA-008-04 from Agence Nationale de la Recherche and by Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche and Institut National de la Recherche Agronomique (AP AlimH 2008).

1. Brede C, Fjeldal P, Skjevraak I, Herikstad H (2003) Increased migration levels of bisphenol A from polycarbonate baby bottles after dishwashing, boiling and brushing. *Food Addit Contam* 20:684–689.
2. Brotons JA, Olea-Serrano MF, Villalobos M, Pedraza V, Olea N (1995) Xenoestrogens released from lacquer coatings in food cans. *Environ Health Perspect* 103:608–612.
3. Calafat AM, et al. (2005) Urinary concentrations of bisphenol A and 4-nonylphenol in a human reference population. *Environ Health Perspect* 113:391–395.
4. vom Saal FS, Hughes C (2005) An extensive new literature concerning low-dose effects of bisphenol A shows the need for a new risk assessment. *Environ Health Perspect* 113:926–933.

5. Le HH, Carlson EM, Chua JP, Belcher SM (2008) Bisphenol A is released from polycarbonate drinking bottles and mimics the neurotoxic actions of estrogen in developing cerebellar neurons. *Toxicol Lett* 176:149–156.
6. Maragou NC, Makri A, Lampi EN, Thomaidis NS, Koupparis MA (2008) Migration of bisphenol A from polycarbonate baby bottles under real use conditions. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 25:373–383.
7. Kuiper GG, et al. (1997) Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 138:863–870.

8. Dairkee SH, et al. (2008) Bisphenol A induces a profile of tumor aggressiveness in high-risk cells from breast cancer patients. *Cancer Res* 68:2076–2080.
9. Wetherill YB, et al. (2006) Bisphenol A facilitates bypass of androgen ablation therapy in prostate cancer. *Mol Cancer Ther* 5:3181–3190.
10. Welshons WV, Nagel SC, vom Saal FS (2006) Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure. *Endocrinology* 147 (6, Suppl) S56–S69.
11. Akingbemi BT, Sottas CM, Koulova AI, Klinefelter GR, Hardy MP (2004) Inhibition of testicular steroidogenesis by the xenoestrogen bisphenol A is associated with reduced pituitary luteinizing hormone secretion and decreased steroidogenic enzyme gene expression in rat Leydig cells. *Endocrinology* 145:592–603.
12. Murray TJ, Maffini MV, Ucci AA, Sonnenschein C, Soto AM (2007) Induction of mammary gland ductal hyperplasias and carcinoma in situ following fetal bisphenol A exposure. *Reprod Toxicol* 23:383–390.
13. Timms BG, et al. (2005) Estrogenic chemicals in plastic and oral contraceptives disrupt development of the fetal mouse prostate and urethra. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 7014–7019.
14. Leranath C, Hajszan T, Szigeti-Buck K, Bober J, MacLusky NJ (2008) Bisphenol A prevents the synaptogenic response to estradiol in hippocampus and prefrontal cortex of ovariectomized nonhuman primates. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:14187–14191.
15. Rubin BS, et al. (2006) Evidence of altered brain sexual differentiation in mice exposed perinatally to low, environmentally relevant levels of bisphenol A. *Endocrinology* 147: 3681–3691.
16. Geibel JP (2005) Secretion and absorption by colonic crypts. *Annu Rev Physiol* 67: 471–490.
17. Masyuk AI, Marinelli RA, LaRusso NF (2002) Water transport by epithelia of the digestive tract. *Gastroenterology* 122:545–562.
18. Turner JR (2006) Molecular basis of epithelial barrier regulation: from basic mechanisms to clinical application. *Am J Pathol* 169:1901–1909.
19. Catassi C, Bonucci A, Coppa GV, Carlucci A, Giorgi PL (1995) Intestinal permeability changes during the first month: effect of natural versus artificial feeding. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 21:383–386.
20. Colomé G, et al. (2007) Intestinal permeability in different feedings in infancy. *Acta Paediatr* 96:69–72.
21. Schaller JP, et al. (2004) Effect of dietary ribonucleotides on infant immune status. Part 1: Humoral responses. *Pediatr Res* 56:883–890.
22. Homma H, et al. (2005) The female intestine is more resistant than the male intestine to gut injury and inflammation when subjected to conditions associated with shock states. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 288:G466–G472.
23. Heitkemper M, Jarrett M, Bond EF, Chang L (2003) Impact of sex and gender on irritable bowel syndrome. *Biol Res Nurs* 5:56–65.
24. Heitkemper MM, et al. (2003) Symptoms across the menstrual cycle in women with irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 98:420–430.
25. Campbell-Thompson M, Lynch IJ, Bhardwaj B (2001) Expression of estrogen receptor (ER) subtypes and ERbeta isoforms in colon cancer. *Cancer Res* 61:632–640.
26. Konstantinopoulos PA, et al. (2003) Oestrogen receptor beta (ERbeta) is abundantly expressed in normal colonic mucosa, but declines in colon adenocarcinoma paralleling the tumour's dedifferentiation. *Eur J Cancer* 39:1251–1258.
27. Braniste V, et al. (2009) Oestradiol decreases colonic permeability through oestrogen receptor beta-mediated up-regulation of occludin and junctional adhesion molecule-A in epithelial cells. *J Physiol* 587:3317–3328.
28. Houdeau E, et al. (2007) Sex steroid regulation of macrophage migration inhibitory factor in normal and inflamed colon in the female rat. *Gastroenterology* 132:982–993.
29. Ji Y, Murphy AZ, Traub RJ (2003) Estrogen modulates the visceromotor reflex and responses of spinal dorsal horn neurons to colorectal stimulation in the rat. *J Neurosci* 23:3908–3915.
30. Artis D (2008) Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nat Rev Immunol* 8:411–420.
31. Markey CM, Wadia PR, Rubin BS, Sonnenschein C, Soto AM (2005) Long-term effects of fetal exposure to low doses of the xenoestrogen bisphenol-A in the female mouse genital tract. *Biol Reprod* 72:1344–1351.
32. Rubin BS, Murray MK, Damassa DA, King JC, Soto AM (2001) Perinatal exposure to low doses of bisphenol A affects body weight, patterns of estrous cyclicity, and plasma LH levels. *Environ Health Perspect* 109:675–680.
33. O'Mahony F, Harvey BJ (2008) Sex and estrous cycle-dependent rapid protein kinase signaling actions of estrogen in distal colonic cells. *Steroids* 73:889–894.
34. Fruzzetti F, et al. (2007) Effect of an oral contraceptive containing 30 microg ethinylestradiol plus 3 mg drospirenone on body composition of young women affected by premenstrual syndrome with symptoms of water retention. *Contraception* 76:190–194.
35. Oelkers WK (1996) Effects of estrogens and progestogens on the renin-aldosterone system and blood pressure. *Steroids* 61:166–171.
36. Bereiter DA, Cioffi JL, Bereiter DF (2005) Oestrogen receptor-immunoreactive neurons in the trigeminal sensory system of male and cycling female rats. *Arch Oral Biol* 50:971–979.
37. Papka RE, et al. (2001) Estrogen receptor-alpha and beta- immunoreactivity and mRNA in neurons of sensory and autonomic ganglia and spinal cord. *Cell Tissue Res* 304:193–214.
38. Neu J (2007) Perinatal and neonatal manipulation of the intestinal microbiome: a note of caution. *Nutr Rev* 65:282–285.
39. Zalko D, et al. (2003) Biotransformations of bisphenol A in a mammalian model: answers and new questions raised by low-dose metabolic fate studies in pregnant CD1 mice. *Environ Health Perspect* 111:309–319.
40. Kuruto-Niwa R, Tateoka Y, Usuki Y, Nozawa R (2007) Measurement of bisphenol A concentrations in human colostrum. *Chemosphere* 66:1160–1164.
41. Takeyama J, et al. (2001) Expression and cellular localization of estrogen receptors alpha and beta in the human fetus. *J Clin Endocrinol Metab* 86:2258–2262.
42. Yan H, Takamoto M, Sugane K (2008) Exposure to bisphenol A prenatally or in adulthood promotes T(H)2 cytokine production associated with reduction of CD4CD25 regulatory T cells. *Environ Health Perspect* 116:514–519.
43. Ruijter JM, et al. (2009) Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res* 37:e45.

DISCUSSION GENERALE

Outre la fonction première de l'intestin, celle de l'absorption des nutriments et d'eau, une deuxième fonction intestinale toute aussi importante est celle de « barrière biologique », principalement organisée autour d'épithélium et du système immunitaire de l'intestin. La paroi de l'intestin est une de plus grandes surfaces d'échange entre l'environnement et l'organisme. Elle joue un rôle important dans la protection contre les antigènes potentiellement nocifs et présents dans le lumen intestinal (bactéries pathogènes, toxines et virus), tout en tolérant les bactéries de la flore commensale, un microbiote nécessaire à la digestibilité de nos aliments, et qui participe également au renouvellement de l'épithélium intestinal. La barrière intestinale, en conditions physiologiques, n'est pas étanche, car tout en assurant le transport des nutriments et de solutés (Masyuk et al. 2002), elle doit régulièrement échantillonner des bactéries présentes dans la lumière (Marchiando et al. 2010), afin d'assurer l'homéostasie immune de l'organisme, pour ensuite adapter la réponse inflammatoire quant un pathogène se présente. Des nombreuses études ont mis en évidence que le dysfonctionnement de la barrière intestinale associé à une perméabilité accrue d'antigènes, des toxines et des bactéries est impliqué dans la pathogenèse des pathologies intestinales. Cependant le nombre d'études sur la physiologie de la barrière intestinale en conditions non-inflammatoires reste limité.

Dans la vie quotidienne, la barrière intestinale est exposée à une multitude de facteurs environnementaux *via* l'alimentation. Ces intrants alimentaires, potentiellement contaminants, ne sont pas sans effet pour la barrière intestinale et l'organisme en général, en particulier lorsque ces xénobiotiques présentent des propriétés de perturbateur endocrinien, comme les phytoestrogènes, les phtalates et les bisphénols. Nos études ont été focalisées sur le bisphénol A (BPA), un monomère largement présent dans notre environnement quotidien, dont la contamination pour l'homme est avérée par son dosage dans le sang et l'urine des populations occidentales. A l'origine le BPA est un œstrogène de synthèse capable de se lier aux récepteurs nucléaires des œstrogènes α et β (ER α et β) (Kuiper et al. 1997). Utilisé depuis les années 50 comme monomère dans l'industrie des plastiques alimentaires au contact des aliments et de l'eau, les propriétés structurales du BPA le rendent capable d'activer une réponse hormonale dans l'organisme, largement considérée comme à la source de ses effets indésirables sur l'appareil génital (vom Saal et al. 1998; Rubin et al. 2001; Timms et al. 2005), la glande mammaire (Markey et al. 2001), ou encore le système nerveux (Leranth et al. 2008). Cependant l'impact du BPA sur la fonction de la barrière intestinale est resté non exploré jusqu'à présent. Or, en tant que

contaminant oral, l'intestin est la première barrière biologique au contact du BPA ingéré, alors que les deux récepteurs aux oestrogènes, ER α et β , sont présents dès ce niveau, en particulier ER β fortement exprimé dans les cellules épithéliales (Campbell-Thompson et al. 2001; Konstantinopoulos et al. 2003; Kawano et al. 2004). Au cours de la dernière décennie, un rôle modulateur des oestrogènes endogènes, en particulier pour le sexe femelle, a été mis en évidence dans le transit intestinal (Xiao et al. 2005), la formation de l'épithélium (Wada-Hiraike et al. 2006), les échanges ioniques dans le côlon (Condliffe et al. 2001; O'Mahony and Harvey 2008). En revanche, un rôle dans le contrôle de la perméabilité paracellulaire épithéliale, acteur clé de la fonction de barrière, n'a jamais reçu d'attention, alors que des travaux récents sur des souris invalidées pour ER β soulignent très clairement l'importance de cette voie de signalisation dans la cohésion intercellulaire, dès le développement précoce du tube digestif (Wada-Hiraike et al. 2006). Dans ce travail de thèse, un premier volet de recherche sur l'influence des œstrogènes endogènes sur la perméabilité intestinale a constitué la base fondamentale pour ensuite appréhender la question de l'impact du BPA sur la physiologie et le développement de la barrière intestinale.

I. Influence des oestrogènes sur la perméabilité intestinale : implications physiopathologiques

Dans notre première étude, nous avons mis en évidence une variation de la perméabilité paracellulaire dans le côlon de rate au cours du cycle sexuel, plus faible en phase folliculaire (dominance œstrogénique) en comparaison de la phase lutéale (dominance progestéronique). Ces fluctuations de la perméabilité paracellulaire colique reflètent essentiellement les variations plasmatiques des oestrogènes au cours du cycle oestral, non celle de la progestérone, un constat déjà rapporté au niveau de la perméabilité endothéliale des artères carotides chez le rat (Mullick et al. 2001). Récemment, une étude avait mis en évidence une barrière intestinale plus résistante face à un stimulus agressif chez la rate en proestrus par rapport au mâle, une protection chez la femelle supposée liée au haut statut oestrogénique qui caractérise cette période du cycle oestral, d'autant que l'administration d'oestradiol chez le mâle effaçait le dimorphisme sexuel (Homma et al. 2005). Dans notre étude, nous avons montré que cette protection chez la femelle relevait,

au moins pour partie, d'une diminution oestrogéno-dépendante de la perméabilité paracellulaire au niveau du côlon, un effet dose-dépendant médié par les ERs nucléaires car bloqué par l'administration de l'antagoniste ICI 182,780. L'ER β est le récepteur dominant au niveau du côlon, essentiellement exprimé par les cellules épithéliales (Campbell-Thompson et al. 2001; Konstantinopoulos et al. 2003). Dans notre étude, nous avons montré que la diminution oestrogéno-dépendante de la perméabilité paracellulaire colique était essentiellement dépendante d'une liaison aux ER β , car mimé par le DPN (diarylpropionitrile), un agoniste spécifique du récepteur β . Ce résultat complète les observations déjà obtenues chez les souris ER β ^{-/-}, où l'invalidation du gène aboutissait à un déséquilibre architectural de la barrière épithéliale, en partie due à une immaturité dans la formation des jonctions intercellulaires (Wada-Hiraike et al. 2006). Chez la rate, nous avons rapporté que l'oestradiol induisait une surexpression d'occludine et JAM-A, deux protéines transmembranaires associées au cytosquelette des cellules épithéliales au niveau des jonctions serrées, aboutissant à une réduction des espaces paracellulaires, donc de la perméabilité. Une influence par les oestrogènes de l'expression de l'occludine a également été observée au niveau de l'endothélium vasculaire (Ye et al. 2003; Kang et al. 2006a) et de l'épithélium vaginal (Gorodeski 2001). Dans notre étude, nous montrons que la sensibilité à l'oestradiol de la barrière épithéliale colique n'est pas propre aux rongeurs, car constatée également sur la lignée humaine de cellules épithéliales coliques Caco-2, où les protéines de jonctions serrées, JAM-A et occludine, apparaissent de nouveau comme cible de l'oestradiol.

L'épithélium intestinal joue un rôle très important dans le passage de fluides et d'électrolytes, tant par voie transcellulaire que par voie paracellulaire. Le côlon est le segment terminal pour la réabsorption d'eau avant son excrétion où, dans le but de maintenir un équilibre dans les échanges de solutés, une interaction complexe s'installe entre les processus de sécrétion et d'absorption. Les échanges de fluides par la voie paracellulaire y sont particulièrement importants et obéissent à un gradient osmotique où les molécules d'eau suivent les ions Na⁺ transportés passivement par voie paracellulaire *via* les jonctions serrées, pour maintenir une électroneutralité entre les compartiments muqueux et séreux en réponse aux ions Cl⁻ excrétés vers la lumière intestinale par des canaux chlores (Geibel 2005). Dans l'organisme, il est bien admis que les hauts statuts oestrogéniques s'accompagnent d'une rétention des fluides, apparaissant dans certains

stades du cycle menstruel (Michell 1981) ou encore durant la grossesse (Atherton et al. 1982). Une rétention des liquides est également observée chez les utilisatrices d'une contraception orale ou, chez les femmes post-ménopausées, d'une thérapie hormonale substitutive (Stevenson 2006). Dans l'exemple du cycle menstruel, les fluctuations des oestrogènes au cours du cycle menstruel induisent des modifications dans la structure et la fonction de l'appareil génital, en particulier pour l'expansion de l'environnement utérin afin de préparer l'endomètre à l'éventuelle implantation d'un blastocyste. Pour répondre à ce besoin en eau, les oestrogènes circulants déclenchent une rétention de fluides dans le corps, au niveau rénal par l'augmentation d'absorption du sodium (Harvey et al. 2001; Gambling et al. 2004) et au niveau pulmonaire par une inhibition de sécrétion des ions de chlore (Swezey et al. 1998). Des travaux récents ont démontré que l'intestin participait à cette rétention d'eau sous dominance oestrogénique. Chez la rate au cours du cycle, les oestrogènes diminuent par voie non-génomique la sécrétion transcellulaire d'ions Cl⁻, un mécanisme rapide réduisant l'excrétion d'eau vers la lumière intestinale, donc son élimination du corps (Condliffe et al. 2001; O'Mahony et al. 2007). En appui de ces mécanismes rapides, nos résultats montrent également que les oestrogènes au cours du cycle sexuel sont capables de limiter l'excrétion d'eau vers la lumière intestinale par la voie paracellulaire, en induisant une surexpression d'occludine et de JAM-A au niveau des jonctions serrées, une action génomique impliquant les ER β exprimés par les colonocytes.

Une réduction oestrogéno-dépendante du transport hydrique au travers de l'épithélium intestinal doit aussi contribuer à la prédominance de la constipation chez la femme (Heaton et al. 1992; Meier et al. 1995). Les périodes de constipation varient au cours du cycle menstruel, en relation avec les fluctuations naturelles des hormones sexuelles. Si une réduction de la motilité en phase lutéale résulte au moins d'une augmentation d'expression des récepteurs à la progestérone, accompagnée d'anormalités dans la contraction musculaire (Cheng et al. 2008), nous faisons également l'hypothèse qu'une diminution de la lubrification des selles sous l'effet des oestrogènes circulants peut contribuer à réduire le temps de transit intestinal. Un tel mécanisme pourrait expliquer la plus forte prévalence de la forme constipée du Syndrome de l'Intestin Irritable (SII-C) chez la femme par rapport à l'homme (Taub et al. 1995; Muller-Lissner et al. 2001), ainsi qu'aux variations symptomatiques du transit chez ces patientes SII-C. En particulier chez ces patientes (Figure 19), une aggravation de la constipation est observée après le pic préovulatoire d'oestrogènes en fin de phase folliculaire, maintenue pendant la phase lutéale

(Heitkemper et al. 2003), probablement sous l'influence de la progestérone dominante. De manière intéressante, le transit intestinal ré-accélère à l'approche des règles, une fenêtre d'imprégnation hormonale caractérisée par la chute brutale des taux plasmatiques à la fois de progestérone et d'oestrogènes (Heitkemper et al. 2003).

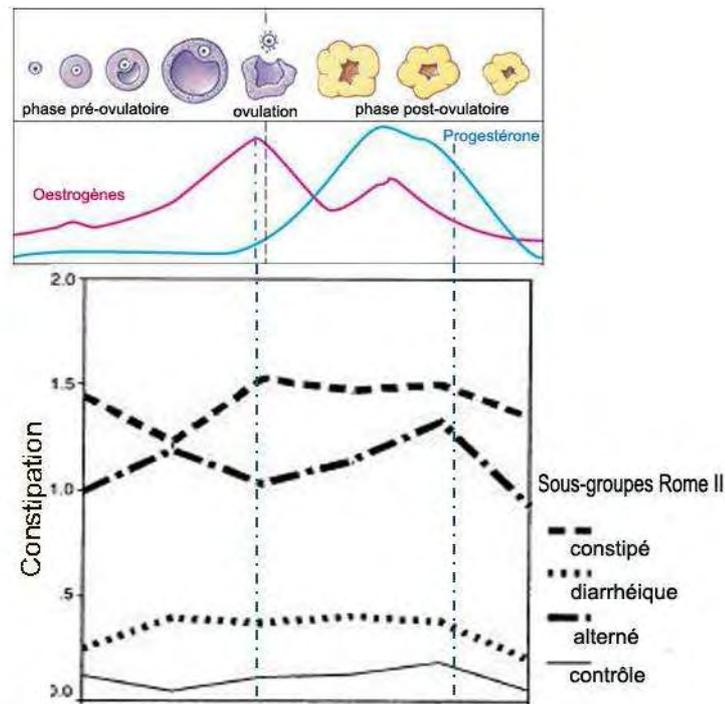


Figure 19: Corrélation entre les niveaux circulants des hormones ovariennes et la constipation.

Adapté de (Heitkemper et al. 2003)

La compréhension de l'étiologie et de la maintenance des pathologies intestinales se heurte à la méconnaissance de l'état inflammatoire des muqueuses, sous l'influence du statut hormonal. Une barrière intestinale normale assure au cours de la vie un passage au travers de l'épithélium de petites quantités d'antigènes, capable de maintenir un équilibre du système immunitaire et ainsi préparer l'organisme à une réponse adaptée si la stimulation se répète en plus agressive. Une altération de la structure des jonctions serrées entraîne le passage accru d'antigènes et de bactéries de la lumière intestinale vers le système immunitaire, favorisant l'apparition d'un état inflammatoire (Turner 2006). Ainsi l'importance de l'hyperperméabilité intestinale dans la pathogenèse et le maintien des Maladies Inflammatoires Chroniques (MICI) et du SII est aujourd'hui bien reconnue (Barbara et al. 2002; Clayburgh et al. 2004; Mankertz and Schulzke 2007; Gecse et al.

2008; Piche 2009). Malgré tout, dans ce contexte, le SII est deux fois plus fréquent chez les femmes par rapport aux hommes (Taub et al. 1995; Muller-Lissner et al. 2001), un constat soulignant que la prédominance des oestrogènes chez la femme ne s'accompagne pas d'une diminution du risque de développer la maladie. Par contre, une réduction induite par les oestrogènes du passage paracellulaire des antigènes et bactéries peut présenter une action bénéfique envers une inflammation sévère (i.e. baisse d'activité de la pathologie), et expliquer la variation liée au cycle menstruel dans les symptômes associés à la réponse inflammatoire.

Dans l'hypothèse d'un effet bénéfique des oestrogènes, une étude récente chez les femmes post-ménopausées et souffrants de MICI avance un rôle protecteur de la thérapie hormonale substitutive lorsque la pathologie est installée, supposé dû aux oestrogènes exogènes apportés par le traitement (Kane and Reddy 2008). Outre la limitation du passage trans-épithélial, il est bien connu que les oestrogènes possèdent également des propriétés anti-inflammatoires dans l'intestin. Les études réalisées chez le rat et la souris ont mis en évidence la capacité de l'oestradiol à réduire les lésions tissulaires dans une colite expérimentale, tout en diminuant l'expression de cytokines Th1 impliquées dans la réponse inflammatoire aigüe, telles que le *Macrophage Migration Inhibitory Factor* (MIF), le TNF α , l'IL-1 β et l'IFN- γ (Verdu et al. 2002; Harnish et al. 2004; Houdeau et al. 2007). Comme pour le contrôle de la perméabilité intestinale, les effets anti-inflammatoires des oestrogènes impliquent la voie de signalisation ER β (Harris et al. 2003). Il subsiste toutefois des controverses quant à la protection apportée par la thérapie hormonale substitutive envers les MICI, d'autres travaux présentant ces thérapies comme un facteur de risque dans le développement de la maladie de Crohn (Garcia Rodriguez et al. 2005). Face à ces conclusions divergentes, une hypothèse repose sur l'idée que la thérapie hormonale substitutive peut s'avérer protecteur si le traitement repose essentiellement en un apport d'oestrogènes, par l'additivité des actions bénéfiques sur la perméabilité et le profil cytokinique Th1, alors que l'apport simultané de progestérone en thérapie hormonale substitutive pourrait au contraire augmenter le risque de développer une MICI. Les données récentes du laboratoire ont conclu à un effet pro-inflammatoire puissant de la progestérone dans une colite expérimentale (Houdeau et al. 2007). A ce sujet, il est intéressant de noter que l'influence délétère de la progestérone sur l'intensité de la colite se retrouve en phase lutéale du cycle sexuel (Houdeau et al. 2007), à une période où nous

montrons que la perméabilité basale de l'intestin est naturellement élevée, donc permissive, en l'absence de niveaux circulants suffisant d'oestrogènes.

Chez la patiente SII en âge de fertilité, la perception exacerbée de la douleur abdominale en période pré-menstruelle (Figure 20) suggère que le seuil de sensibilité viscérale est abaissé en présence de faibles niveaux circulants d'oestrogènes et de progestérone, caractéristiques de la fin de cycle (Heitkemper et al. 2003). Dans cette hypothèse, une concentration plasmatique à l'inverse élevée en hormones dans les autres périodes du cycle menstruel apparaît protectrice vis-à-vis de l'hypersensibilité viscérale associée au SII (Heitkemper and Chang 2009).

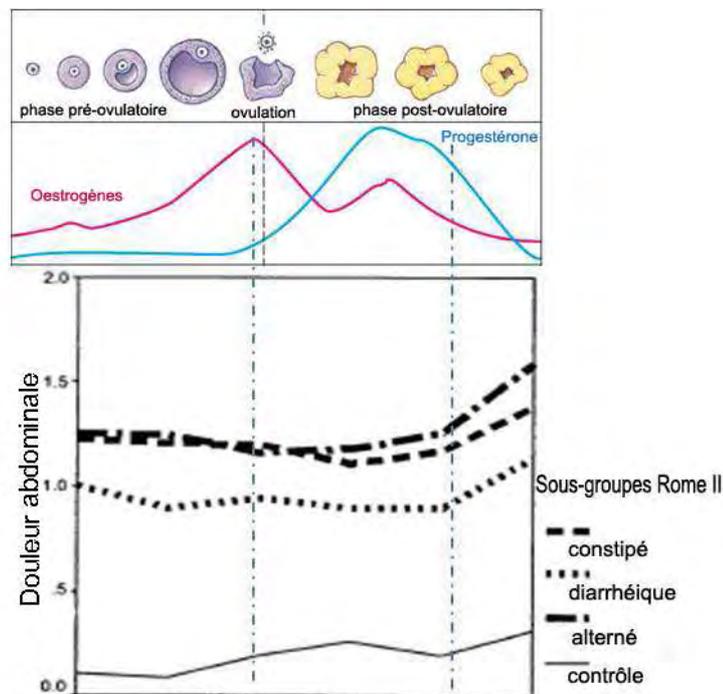


Figure 20: Corrélation entre les niveaux circulants des hormones ovariennes et la douleur abdominale chez les femmes souffrant de SII.

Adapté de (Heitkemper et al. 2003)

A l'approche des règles, l'idée que la chute d'oestrogènes plasmatiques puisse contribuer à abaisser les seuils de perception de la douleur n'est cependant pas soutenue par la littérature dans les études pharmacologiques chez l'animal castré. En effet, l'oestradiol apparaît pronociceptif chez la rate ovariectomisée sous distension colrectale par rapport aux contrôles non traités, un effet partiellement contrebalancé par la

progestérone lorsque l'animal reçoit les deux hormones (Ji et al. 2005). Cependant, ces mêmes auteurs ont récemment montré que des femelles intactes étaient beaucoup moins sensibles à la distension colrectale que l'animal ovariectomisé et supplémenté en oestradiol, montrant même une hypoalgésie en comparaison des femelles castrées sans stéroïdes (Ji et al. 2008). Pour expliquer ces différences dans les deux modèles, les auteurs ont conclu à un effet protecteur de la progestérone au cours du cycle oestral sur la perception de la douleur stimulée par l'oestradiol (Ji et al. 2005; 2008). Il apparaît cependant que l'influence du statut hormonal sur la sensibilité viscérale chez la femelle ne peut être extrapolée depuis des observations obtenues sur modèles animaux castrés et supplémentés. Nos plus récentes observations, développées ci-après, appuient cette hypothèse.

Récemment, des études réalisées au laboratoire dans un modèle animal de SII ont montré un lien entre la perméabilité intestinale et l'hypersensibilité viscérale (Ait-Belgnaoui et al. 2005). Chez la rate, l'application d'un stress de contrainte chez les rats est associée à une augmentation de perception de la douleur viscérale, qui apparaît consécutivement à l'augmentation de la perméabilité intestinale et non l'inverse (Ait-Belgnaoui et al. 2005). En effet, les auteurs ont observé qu'un blocage chimique des jonctions serrées (i.e. instillation intra-rectale de triaminopyrimidine - TAP) bloquait l'augmentation de la perméabilité paracellulaire induite par le stress de contrainte et, par conséquence, empêchait l'hypersensibilité viscérale. Les auteurs ont conclu qu'une augmentation de la perméabilité paracellulaire intestinale favorisait le passage d'agents indésirables vers les muqueuses, stimulant le système immunitaire local et libérant ainsi des médiateurs capables d'activer et/ou de sensibiliser les terminaisons nerveuses sensibles. Le modèle animal de stress de contrainte est un modèle accepté pour l'étude des mécanismes sous-tendant les altérations de la sensibilité viscérale chez les patients souffrant du SII. Dans ce contexte, nous avons fait l'hypothèse que les propriétés inhibitrices du DPN (l'agoniste des ER β) sur la perméabilité paracellulaire dans le côlon pouvaient être exploitées pour réduire la sensibilité à la douleur viscérale. Nos résultats préliminaires montrent que ni l'oestradiol, ni l'agoniste spécifique des ER α (PPT – propyl pyrazol triol) ne modifie l'hypersensibilité viscérale induite par le stress chez la rate en diœstrus du cycle (Figure 21), alors que l'administration de DPN a complètement bloqué l'augmentation de la douleur viscérale en réponse aux stimuli nociceptifs (0,8 et 1,2 ml). Ces effets anti-nociceptifs « indirects » du DPN - car passant probablement par la

réduction de l'hyperperméabilité intestinale induite par le stress - concourent à présenter la voie ER β comme une cible d'intérêt thérapeutique pour diminuer de façon concomitante la perméabilité intestinale et la douleur abdominale chez les patients SII.

En conclusion de cette première partie des travaux, nos observations ont apporté de nouveaux éléments dans la compréhension du contrôle hormonal de la fonction de barrière intestinale. Nous avons mis en évidence l'importance de la voie de signalisation ER β dans les propriétés de barrière de l'épithélium, un effet protecteur chez l'adulte qui complète les propriétés anti-inflammatoires déjà connus des oestrogènes. Dans un deuxième temps, ces résultats constituent une base d'étude pour présenter la voie ER β comme une cible thérapeutique potentielle dans les pathologies associées à une hyperperméabilité intestinale, notamment dans le SII. Enfin, ces observations nous ont apporté les bases fondamentales nécessaires pour appréhender l'impact du BPA d'origine alimentaire sur la fonction de barrière intestinale.

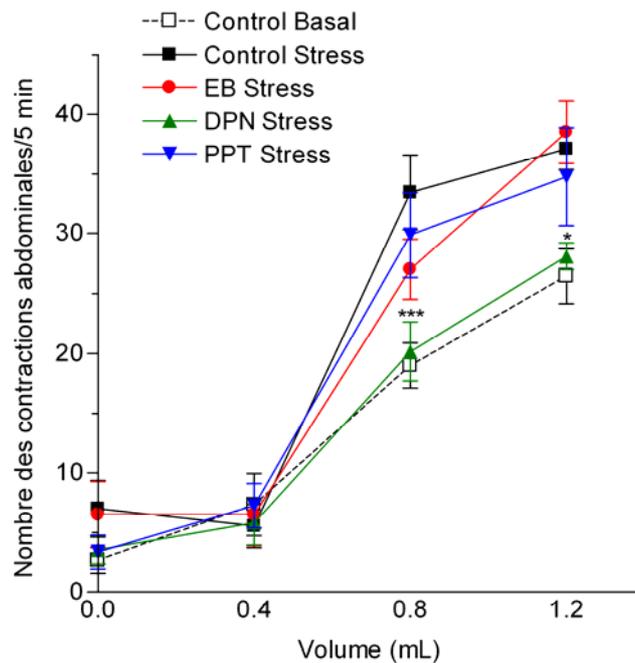


Figure 21: L'influence des oestrogènes et des agonistes d'ER α et β sur la sensibilité viscérale induite par un stress chez la rate adulte non castrée.

Les femelles cycliques ont été traitées pendant 5 jours par voie sous-cutanée avec de l'oestradiol (EB 0,6mg/kg/jour), de l'agoniste ER α (PPT - 4mg/kg/jour), de l'agoniste ER β (DPN - 4mg/kg/jour) ou de l'huile d'olive (contrôle). A la fin du traitement les rates en dioestrus de leur cycle ont été soumises à un stress de contrainte pendant 2 heures. La distension colorectale a été effectuée après la session du stress à l'aide d'une sonde d'embolectomie introduite à 1 cm de la marge anale. L'extrémité libre de la sonde était connectée à une seringue remplie d'eau, permettant d'appliquer par paliers successifs de 5 minutes des volumes de distension de 0,4ml à 1,2ml (incrément de 0,4ml). L'activité myoélectrique du muscle strié de l'abdomen, un index de sensibilité viscérale, a été enregistrée par électromyographie, pendant la session de distension colorectale.

II. Bisphénol A – quel impact sur la barrière intestinale adulte ?

Dans notre deuxième étude, nous nous sommes intéressé à vérifier si le contaminant alimentaire BPA pouvait induire des effets similaires aux oestrogènes au niveau de l'intestin, plus particulièrement au niveau de l'épithélium intestinal (perméabilité basale), du système immunitaire local (réponse inflammatoire) ainsi qu'au niveau du système nerveux associé (douleur viscérale). Nous avons montré dans le modèle pharmacologique de la rate adulte ovariectomisée (OVX) que l'exposition par voie orale au BPA pendant 15 jours diminuait la perméabilité paracellulaire au niveau du côlon, à l'identique de l'effet propre de l'oestradiol. Ces effets du BPA s'observent à la dose de référence en toxicologie considérée sans effet nocif chez les rongeurs, NOAEL (*No Observed Adverse Effect Level*) et persiste jusqu'à 0,5 µg/kg/jour. Des effets délétères aux faibles doses de BPA (inférieures à la NOAEL) ont été mis en évidence *in vivo* au niveau d'autres tissus oestrogéno-sensibles, tels que l'appareil génital (Akingbemi et al. 2004), le système nerveux (Leranth et al. 2008), le pancréas (Ropero et al. 2008). La grande majorité des études démontrant des effets à base-doses ont cependant administré le BPA par voie sous-cutanée, qu'il s'agisse d'injections ou à l'aide de capsules à libération continue. Or, la population humaine est exposée au BPA principalement par voie orale, *via* l'alimentation. Ceci explique souvent l'impossibilité d'extrapoler ces résultats à l'espèce humaine pour l'évaluation du risque par les agences sanitaires. Notre étude montre que l'administration orale du BPA chez la femelle adulte OVX induit une diminution dose-dépendante de la perméabilité intestinale paracellulaire, avec une dose efficace nécessaire pour produire 50% de l'effet maximal (ED₅₀) de 5,2 µg/kg/jour, une valeur dix fois inférieure à la dose définie comme sans risque pour l'homme (DJA – Dose Journalière Admissible ou DJT – Dose Journalière Tolérable). Cette réduction du passage trans-épithélial est médié par les ERs, car bloquée complètement par l'antagoniste ICI 182, 780. Curieusement, les effets du BPA sont tout aussi puissants que ceux de l'oestradiol administré à de plus fortes doses (0,6 mg/kg/j), et ce malgré la très faible affinité du BPA pour les ERs nucléaires, de 1 000 à 10 000 inférieure à celle de l'hormone mère (Kuiper et al. 1997; Vandenberg et al. 2007a). Il est maintenant prouvé que le BPA agit comme un SERM (*Selective Estrogen Receptor Modulator*) et, par rapport à l'oestradiol, interagit différemment avec les domaines de fixation du ligand des ERs nucléaires et leurs co-régulateurs (Gould et al.

1998), tout en présentant une affinité de liaison différente dans les tissus cibles selon le type d'ER présent (Welshons et al. 2006). Ainsi, la fixation du BPA à l'ER β induit un meilleur recrutement des co-activateurs, tels que le TIF2 (*Transcriptional Intermediary Factor2*) et le SRC-1a (*Steroid Receptor Coactivator-1a*) (Routledge et al. 2000), augmentant d'un facteur de 500 la réponse génomique estimée (Welshons et al. 2006), une particularité pouvant expliquer le fort potentiel d'effet du BPA dans les tissus sur-exprimant ER β , comme dans le côlon.

Comme pour l'oestradiol, nous avons mis en évidence que la modulation de la perméabilité paracellulaire colique par le BPA était due à une surexpression des protéines transmembranaires des jonctions serrées, occludine et JAM-A. Il est intéressant de noter qu'une modulation par le BPA de la perméabilité paracellulaire a également été rapportée au niveau de la barrière hémato-testiculaire, un effet passant également par une modification d'expression de l'occludine (Fiorini et al. 2004; Li et al. 2009b). Nos observations dans l'intestin de rates ont été validées sur des lignées humaines de cellules épithéliales coliques (T84 et Caco-2). Dans le modèle T84, une diminution significative du passage trans-épithélial a été observée après seulement deux heures d'exposition au BPA, confirmant un effet lent, probablement génomique comme chez l'animal (Figure 22). Les effets du BPA ont été observés dès 0,1 nM, une concentration qui correspond à la quantité minimale du BPA retrouvée dans les fluides humains (vom Saal and Hughes 2005; Calafat et al. 2008). Comme chez les rongeurs, le renforcement de la barrière épithéliale par le BPA dans les cellules Caco-2 est dû, au moins en partie, à la surexpression des protéines des jonctions serrées, occludine et JAM-A.

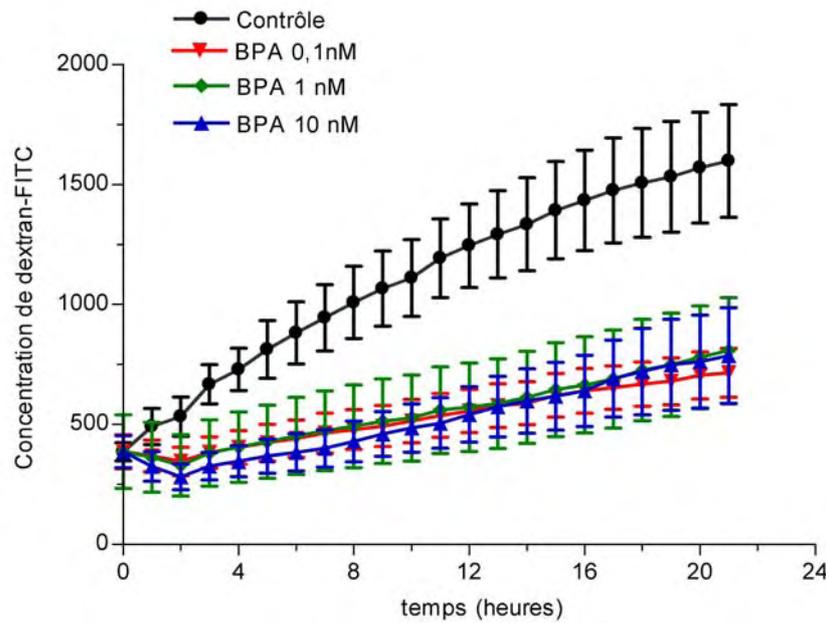


Figure 22: Effets du BPA sur la perméabilité paracellulaire de cellules coliques humaines T84

Les monocouches des cellules épithéliales coliques T84 ont été cultivées en présence de BPA à trois concentrations (0,1 ; 1 et 10 nM). Le flux paracellulaire du dextran-FITC a été enregistré pendant 24 heures dès le dépôt de BPA (T0). Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au temps initial et sont les moyennes de 3 expériences séparées.

Comme discuté précédemment, une diminution de la perméabilité intestinale en présence de BPA pourrait s'ajouter aux effets propres des oestrogènes, appuyant ainsi la réduction du transport hydrique lorsque les oestrogènes circulants sont dominants. Dans de telles conditions, il est fait l'hypothèse qu'un apport chronique de BPA par l'alimentation, même à de faibles doses, pourrait exacerber la rétention d'eau chez la femme, en particulier chez les utilisatrices d'une contraception orale ou d'une thérapie hormonale substitutive, voire même pendant la grossesse (Oelkers 1996; Fruzzetti et al. 2007). En revanche, dans les pathologies associées à une hyperperméabilité intestinale, telles que SII ou MICI, on peut supposer que, comme pour l'oestradiol, le BPA pourrait jouer un rôle protecteur en réduisant le passage des antigènes et des bactéries vers les muqueuses et l'organisme, tout en ayant le potentiel de réduire les lésions tissulaires. En effet, nous avons mis en évidence la capacité du BPA à moduler la réponse inflammatoire dans une colite expérimentale. Comme avec l'oestradiol, dans le modèle pharmacologique de la rate adulte OVX, l'administration orale de BPA a réduit l'expression des cytokines pro-inflammatoires de phase aiguë de type Th1, telle que le MIF et l'IL-1 β , tout en diminuant l'infiltration neutrophilaire et la sévérité des lésions macroscopiques. Ces effets

immunomodulateurs et anti-inflammatoires du BPA ont été bloqués par l'antagoniste des ERs, le ICI 182,780, confirmant une voie d'action oestrogénique. La question reste cependant posée si cette action immunomodulatrice est réellement protectrice pour l'organisme sur le long terme. En effet, d'autres études chez la souris ont aussi montré un effet immunosuppresseur du BPA au niveau splénique. Ainsi, une exposition pendant 5 jours seulement à cette molécule a réduit en conditions basales la quantité de macrophages et de lymphocytes produits par la rate, fragilisant ainsi le système immunitaire rendu incapable de se protéger d'une attaque bactérienne (Sugita-Konishi et al. 2003).

En outre, nous avons observé précédemment que la diminution de la perméabilité intestinale paracellulaire par l'agoniste de ER β (DPN) s'accompagnait d'une réduction marquée de l'hypersensibilité viscérale en réponse à une distension colrectale chez la rate adulte non castrée. Malgré la bonne affinité du BPA pour l'ER β et sa capacité importante à réduire la perméabilité paracellulaire, l'exposition *per os* de rates OVX au BPA_{NOAEL} (où à l'oestradiol utilisé comme témoin) s'est au contraire accompagnée d'une exacerbation de la sensibilité viscérale en conditions basales, un effet perdu à la DJA. De plus, cet effet pro-nociceptif du BPA s'installe une fois de plus par les ERs, car bloqués par le ICI 182,780. Il convient de préciser qu'un effet hyperalgésiant de l'oestradiol chez la rate OVX est en accord avec de précédentes études utilisant le même modèle animal (Ji et al. 2005). Comme déjà abordé, les différences d'effets des oestrogènes sur la nociception sont étroitement liés au modèle animal utilisé, intact ou gonadectomisé (Greenspan et al. 2007), différence que nous confirmons ici. En effet, la gonadectomie modifie le système de nociception de l'animal, en affectant le seuil de douleur (Sanoja and Cervero 2005; Juhl et al. 2006) et la sensibilité aux analgésiques (Craft et al. 2004; Greenspan et al. 2007). A ce stade de notre étude, il restera donc à confirmer ou infirmer les effets pronociceptifs du BPA chez la femelle entière au cours du cycle oestral. De ce fait, nos résultats actuels chez la rate OVX ne peuvent être extrapolés à l'espèce humaine, le modèle expérimental sans gonades n'étant pas représentatif de la population générale, d'autant que la dose efficace de BPA (NOAEL) sur la perception de la douleur reste très au-dessus des niveaux d'exposition estimés chez l'homme ($\leq 10\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$). On ne peut cependant exclure l'hypothèse que le BPA à de plus faibles doses puisse avoir un effet hyperalgésiant chez l'animal dans d'autres situations d'exposition, périnatale par exemple, et qu'il conviendra d'étudier pour l'intestin. En effet, dans le modèle expérimental de nociception induite par injection d'une substance irritante au niveau de la patte (formaline), une perception plus

importante de la douleur a été constatée chez le rat à l'âge adulte après exposition au BPA pendant la vie fœtale et l'allaitement (40µg/kg/j administrées aux mères) (Aloisi et al. 2002).

En première conclusion, et contrairement à l'épithélium, le système immunitaire de la barrière intestinale et le système nerveux associé se sont avérés moins sensibles aux faibles doses de BPA chez l'adulte exposé 15 jours à la molécule par voie orale. En effet, les propriétés anti-inflammatoires et pronociceptives du BPA n'ont été observées qu'à la dose NOAEL, sans effet de la DJA. Toutefois, cette étude apporte néanmoins la preuve que la NOAEL, pour rappel la dose expérimentale de référence considérée sans effet chez le rongeur, est au contraire très active dans l'intestin, sur trois compartiments cellulaires naturellement sensibles aux oestrogènes : la cellule épithéliale, le système nerveux sensitif et le système immunitaire. Ces observations illustrent pour la première fois la très grande sensibilité de l'intestin au xénoestrogène BPA et ouvrent de nouvelles voies de recherches sur la caractérisation et l'évaluation des effets des perturbateurs endocriniens d'origine alimentaire. Ils pourront contribuer à l'évaluation des risques et à la définition de nouveaux seuils acceptables d'exposition pour ces molécules.

III. Exposition périnatale au bisphénol A et développement de la fonction de barrière intestinale

La période périnatale est une étape primordiale dans le développement de l'organisme, où les propriétés anti- et/ou pro-hormonales des perturbateurs endocriniens sont susceptibles d'avoir des effets délétères, en raison de la très grande sensibilité de cette période de vie à l'effet organisationnel des stéroïdes sexuels (Vom Saal and Moyer 1985). Durant cette période, il est bien admis que l'expression de certains récepteurs et co-régulateurs, ainsi que molécules de signalisation varient considérablement en fonction des stades du développement et selon le type cellulaire (Vandenberg et al. 2009). Ainsi il n'est pas surprenant que les perturbateurs endocriniens puissent exercer une activité dans un système aussi versatile et sensible, tout en ayant des effets différents selon l'âge d'exposition et le type tissulaire exposé. Dans ce contexte, il existe aujourd'hui un consensus pour présenter la période périnatale comme la période à risque en ce que concerne l'exposition au xénoestrogène BPA. Un point essentiel dans le potentiel « perturbateur » de la molécule repose sur le métabolisme du BPA dans le foie foetal, moins important par rapport à l'adulte en raison d'une activité réduite de l'enzyme l'uridine diphosphate glucuronyltransférase (UDPGT) hépatique qui conduit normalement à la formation du métabolite inactif sur les ERs, le conjugué BPA-glucuronide (BPA-Gluc) (Taylor et al. 2010). Une étude récente montre également que le passage transplacentaire du BPA libre est supérieur à celui du BPA-Gluc (Balakrishnan et al. 2010). De plus, le BPA-Gluc qui traverse la barrière placentaire est, au moins pour partie, déconjugué dans les tissus fœtaux, délivrant ainsi du BPA parent actif au plan oestrogénique (Nishikawa et al. 2010). Enfin, chez des rates au 18^{ème} jour de gestation et recevant une dose orale unique de BPA marqué au ¹⁴C (500µg/kg), la radioactivité est retrouvée dans l'intestin des fœtus, dès 24 heures après le traitement de la mère (Kurebayashi et al. 2005). Les auteurs montrent également qu'après une même dose orale de BPA-C14 chez la rate allaitante, la plupart de la radioactivité retrouvée chez le nouveau-né après 24 heures d'allaitement est localisée dans l'intestin. L'intestin foetal puis du nouveau-né apparaît ainsi comme une cible privilégié du BPA d'origine maternel.

Rappelons que l'intestin est un système complexe qui protège l'hôte de l'entrée d'antigènes bactériens indésirables, tout en assurant le transport des fluides et des nutriments essentiels à l'homéostasie de l'organisme (Masyuk et al. 2002; Turner 2009).

Cette fonction de barrière biologique et de filtre sélectif se développe très tôt dans la vie. Elle s'organise autour d'un épithélium trophique en renouvellement permanent, d'une couche protectrice du mucus et d'un système immunitaire qui se prépare dès la naissance à identifier et mémoriser les agents pathogènes, tout en tolérant la flore bactérienne qui colonise progressivement le tube digestif (Wagner et al. 2008). Une dérégulation dans ces processus d'acquisition et d'homéostasie peut favoriser le développement de maladies inflammatoires chroniques, de troubles fonctionnels, ou encore de tumeurs (Turner 2009). Ainsi nous avons montré que l'exposition dès la période fœtale et pendant l'allaitement au BPA_{NOAEL} fragilisait la barrière intestinale de la descendance F1 à l'âge adulte, un effet essentiellement observé chez les femelles. Cette fragilité de la barrière intestinale s'est traduite par une diminution significative de la perméabilité paracellulaire intestinale, mais contrairement à l'exposition directe à l'âge adulte, l'exposition dès la vie fœtale a induit un effet délétère sur l'évolution de la colite expérimentale, en exacerbant la réponse inflammatoire. En effet, nous avons observé une augmentation significative de l'infiltration neutrophilaire et une surproduction de la cytokine proinflammatoire MIF chez les femelles F1 exposées au BPA en période périnatale par rapport aux femelles F1 témoins. Cette surproduction de MIF est à corrélérer à l'augmentation des niveaux tissulaires de cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et TNF α dans le côlon enflammé (données non publiées ; Figure 23). Ces observations sont intéressantes à rapprocher des données de la littérature concernant l'exposition orale aux isoflavones du soja, un autre groupe de xénoestrogènes : une valence double est également constatée, similaire à celle observée avec le BPA, dans les conséquences sur la colite selon la période d'exposition (Seibel et al. 2008; Seibel et al. 2009). Les isoflavones du soja contiennent en grande majorité de génistéine et de daidzéine, deux molécules présentant une bonne affinité pour les ERs, en particulier pour ER β (Kuiper et al. 1997). Un régime riche en phytoestrogènes administré à des rats adultes s'accompagne de propriétés anti-inflammatoires dans une colite au TNBS (Seibel et al. 2009). En revanche, un régime riche en phytoestrogènes pendant la période périnatale possède un effet délétère pour la descendance, en induisant des lésions tissulaires sévères lorsque la colite est induite à l'âge adulte, traduites par une augmentation d'infiltration neutrophilaire et la diminution d'expression de l'enzyme COX-2 normalement rapidement induite dans la zone inflammée (Seibel et al. 2008).

Dans notre étude, nous avons constaté que la barrière intestinale chez les mâles F1 apparaissait protégée des effets perturbateurs du BPA périnatal. En effet dans ce sexe, les

paramètres de sévérité de la colite induite à l'âge adulte ne différaient pas de ceux relevés chez les mâles F1 contrôles. Un dimorphisme sexuel dans les effets du BPA a été également observé dans d'autres fonctions, extra-intestinale (Rubin et al. 2001). Au niveau du côlon, nous avons supposé que ce dimorphisme d'effets du BPA relevait d'une différence dans la balance d'expression basale des ERs entre les deux sexes. Dans l'exemple de l'espèce humaine, bien qu'ER β soit le récepteur dominant au niveau du côlon quelque soit le sexe, l'expression chez les hommes est approximativement deux fois moins importante comparée aux femmes (Campbell-Thompson et al. 2001). De plus, chez le rat, nous avons observé chez les mâles adultes exposés en période périnatale au BPA une réduction d'approximativement 50% de l'expression d'ER β au niveau du côlon. Dans l'ensemble, il est fait l'hypothèse qu'une expression basale réduite de ER β par rapport au sexe femelle, accompagnée d'une réduction supplémentaire consécutive à l'exposition au BPA a globalement protégé la barrière intestinale chez le mâle des effets perturbateurs du xénoestrogène.

Un élément qui n'avait pas été discuté dans notre article concerne des niveaux tissulaires de la cytokine TNF α élevés dans le côlon des adultes F1 après l'exposition périnatale au BPA_{NOAEL}. Cette élévation a été observée en conditions basales, quel que soit le sexe et sans modification d'autres cytokines comme IL-1 β (Figure 23). Il est connu que TNF α possède une activité pro-inflammatoire importante lors des premières étapes de la réponse inflammatoire, particulièrement dans la pathogenèse des MICI (Rijnierse et al. 2006). Des niveaux élevés sont retrouvés tant au niveau du foyer inflammatoire qu'au niveau plasmatique (Murch et al. 1991; Murch et al. 1993). Cependant, dans notre étude, les niveaux plus élevés dans les muqueuses coliques ne s'accompagnaient pas d'une augmentation de l'infiltration neutrophilaire, preuve qu'un micro-terrain inflammatoire ne s'est pas développé dans les muqueuses, ou tout du moins n'as pas été constaté sur ce seul paramètre mesuré (activité de l'enzyme myéloperoxidase). Il apparaît toutefois improbable qu'une élévation de la concentration basale de TNF α ait prédisposé les animaux à développer une colite plus sévère, puisque seules les femelles F1 ont répondu dans ce sens. Par ailleurs, le recrutement des chimiokines chez les femelles est plus important par rapport aux mâles, une différence due aux oestrogènes circulants (Mo et al. 2005). Cela pourrait aussi expliquer la présence de la réponse inflammatoire seulement chez les femelles. A ce stade de nos observations sur le dimorphisme sexuel, nous avons orienté la suite de nos travaux sur le développement de la barrière intestinale chez la femelle.

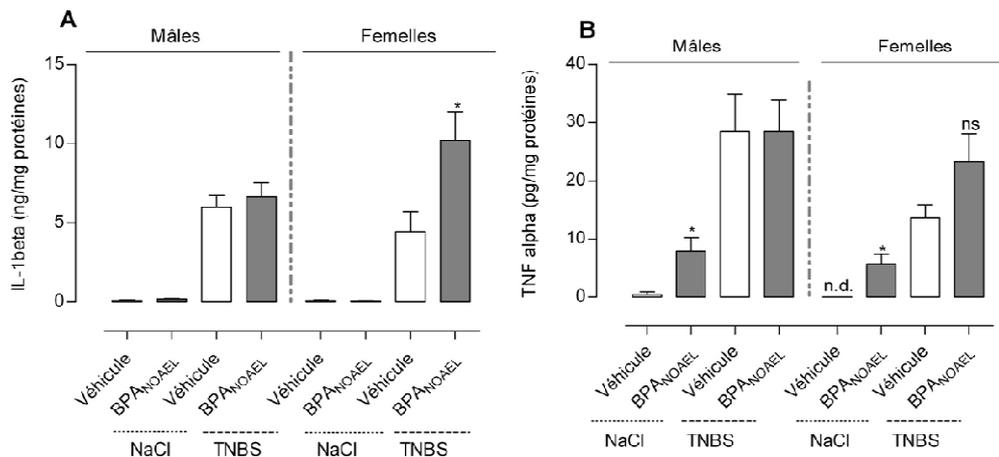


Figure 23 : Conséquences d'une exposition périnatale au BPA_{NOAEL} sur la réponse inflammatoire dans le côlon des rats adultes.

Le BPA_{NOAEL} a été administré quotidiennement par gavage oral aux femelles gestantes dès la mi-gestation et jusqu'à la fin de lactation. A l'âge adulte, la descendance F1 a reçu par instillation intra-rectale de TNBS (acide trinitrobenzène sulfonique, conditions inflammatoires) ou sérum physiologique (NaCl, conditions basales). Les concentrations tissulaires de IL-1 β (**A**) et de TNF α (**B**) ont été mesurés par ELISA dans le côlon prélevé 24 heures plus tard. * $p < 0,05$ vs le Véhicule correspondant ; ns : non significatif ; n.d. : non détectable.

Avec le plus grand nombre de cellules immunitaires de l'organisme et les plus fortes concentrations d'antigènes, l'intestin représente le principal site d'éducation du système immunitaire. L'exposition du tractus gastro-intestinal aux antigènes d'origine bactérienne commence dès la naissance avec le passage par les voies génitales et continue ensuite avec l'alimentation par le lait maternel (Kelly et al. 2007; Newburg and Walker 2007; Perez et al. 2007). Cette étape de la vie est caractérisée par une hyperperméabilité intestinale, mise en évidence chez les enfants en utilisant des marqueurs de la perméabilité intestinale (exemple : mannitol et lactulose). Ces marqueurs administrés par voie orale, traversent la paroi épithéliale par voie paracellulaire via les jonctions serrées pour le lactulose et par voie transcellulaire pour le mannitol, leurs concentrations étant ensuite dosées au niveau urinaire. Ainsi le rapport lactulose/mannitol est élevé à la naissance, témoignant d'une perméabilité intestinale paracellulaire élevée, puis les valeurs diminuent progressivement jusqu'à des valeurs similaires aux adultes, phénomène connu sous le nom de « gut closure » garant d'une maturation complète de la barrière épithéliale (Catassi et al. 1995; Colome et al. 2007). Cette hyperperméabilité intestinale en période périnatale est un processus physiologique indispensable à l'éducation du système immunitaire intestinal, présent mais naïf à la naissance, et progressivement stimulé par les bactéries qui colonisent

peu à peu le tube digestif (Wagner et al. 2008). Un tel mécanisme est nécessaire pour l'activation des cellules immunitaires, en particulier de l'immunité innée et la synthèse des cytokines, au niveau intestinal et systémique. L'hyperperméabilité intestinale joue un rôle important dans l'éducation de certaines réponses immunes, par exemple la tolérance orale, la balance Th1/Th2, deux processus immunitaires de régulation très importants protégeant l'organisme de certaines pathologies, comme les allergies alimentaires et respiratoires, les MICI et vraisemblablement un certain nombre de maladies auto-immunes (Neu 2007; Newburg and Walker 2007). Nous avons mis en évidence que cette hyperperméabilité intestinale s'accompagne d'une faible expression des protéines transmembranaires de jonctions serrées qui contrôlent les espaces paracellulaires, occludine et JAM-A (Figure 24A et B). L'expression de ces deux protéines a été très faible dès la période fœtale (deux fois moins importante par rapport à l'adulte) pour atteindre juste avant le sevrage (à 21 jours) des niveaux équivalents aux adultes. Par contre l'expression d'une autre protéine transmembranaire, la claudine-8, ainsi que de la protéine cytoplasmique, ZO-1, n'a pas été modifiée de manière significative au cours de la maturation de la barrière intestinale (Figure 24C et D).

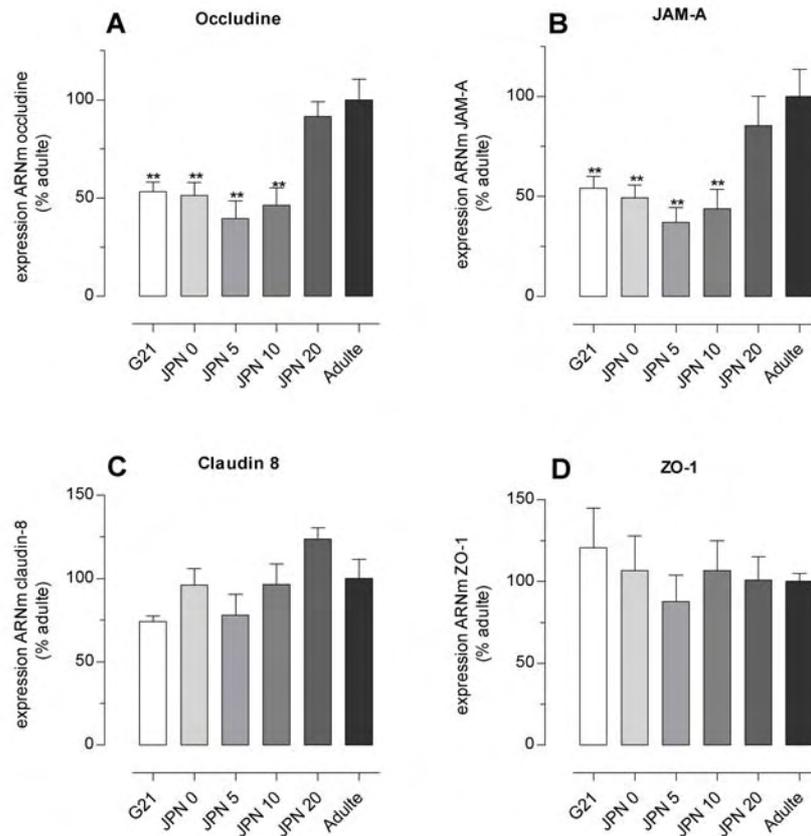


Figure 24: Evolution d'expression des protéines de jonctions serrées au cours du développement.

L'expression des protéines de jonctions serrées a été déterminée par PCR quantitative dans le côlon de rates dès l'âge fœtal (jour 21 de gestation – G21), pendant la lactation (les premières 24 heures de vie (JPN 0) ainsi qu'à 5, 10, 20 jours postnataux (JPN) et à l'âge adulte. Les résultats ont été exprimés par rapport à 100% d'expression chez l'adulte. ** $p < 0,01$; par rapport à l'expression dans le côlon de l'adulte correspondant. (8-15 animaux par groupe).

Concernant l'expression des ERs, nous confirmons que dans l'intestin, les deux récepteurs α et β sont présents dès le stade fœtal (Takeyama et al. 2001). Notre étude montre par ailleurs que chez le fœtus, ER β apparaît prédominant dans l'épithélium colique comme chez l'adulte. De plus, nous avons observé que l'expression d'ER β au niveau de l'intestin fœtal était maximale en fin de période fœtale, pour ensuite diminuer progressivement chez le nouveau-né et atteindre au sevrage (21 jours) un niveau constant conservé tout au long de la vie (Figure 25A). En revanche les niveaux tissulaires d'ER α dans l'intestin du foetus ont été similaires aux valeurs des adultes (Figure 25B). Une expression variable des ERs au cours du développement a également été mise en évidence au niveau du tissu cardiaque (Jankowski et al. 2001). Ces auteurs supposent que chez les

nouveau-nés la forte expression d'ER β joue un rôle important dans la maturation cardiaque.

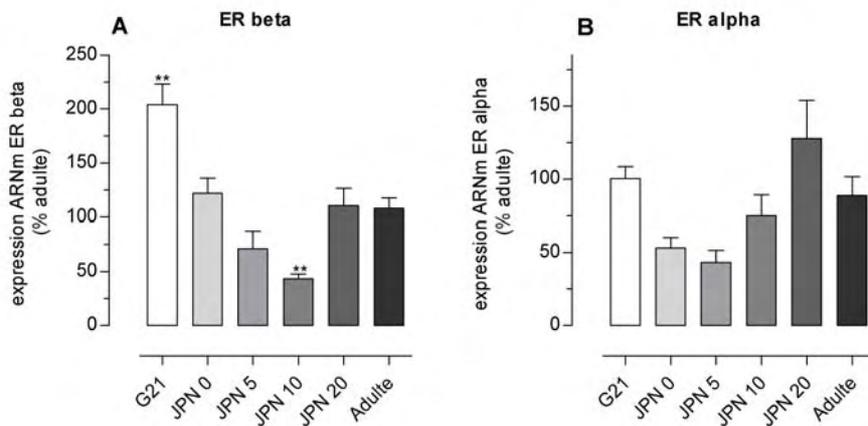


Figure 25: Evolution d'expression colique des récepteurs aux œstrogènes chez la femelle au cours du développement.

L'expression de ERs a été déterminée par PCR quantitative et les résultats ont été exprimés par rapport à 100% de l'expression de ARNm au niveau du côlon l'adulte ** $p < 0,01$ par rapport à l'expression dans le colon de l'adulte correspondant. (8-15 animaux par groupe).

Dans l'intestin, la très forte expression d'ER β à la naissance apparaît importante à souligner compte tenu de liaison préférentielle du BPA à ce type de récepteur. Nous avons récemment vérifié que les ERs intestinaux étaient fonctionnels à la naissance, l'injection sous-cutanée d'oestradiol (5 μ g/kg/j pendant 10 jours) étant efficace pour abaisser *in vivo* la perméabilité paracellulaire totale chez le nouveau-né de 40% par rapport aux témoins (Figure 26), à un niveau normalement observé chez l'adulte. Ce résultat met en évidence pour la première fois la très grande sensibilité de la barrière intestinale aux oestrogènes en période périnatale, et conforte notre hypothèse du potentiel d'effet des xénoestrogènes possédant une bonne affinité pour ER β , comme le BPA (notre étude) ou la génistéine (Seibel et al. 2008). Notre observation sera complétée par une étude dose-réponse pour déterminer l'EC₅₀ de l'oestradiol chez le nouveau-né de 10 jours.

Cependant en conditions physiologiques, malgré la forte expression des ERs en période périnatale, les ovaires à la naissance ne possèdent pas l'équipement enzymatique nécessaire à la production d'oestrogènes. L'enzyme aromatase qui permet la synthèse de l'oestradiol à partir de la testostérone n'est exprimée que vers la fin de la première semaine de vie chez les rongeurs, dès la maturation des premiers follicules, et ne produit que de

faibles niveaux d'oestradiol circulants (Weniger 1993). Une hypothèse sur la maturation épithéliale dans l'intestin est la corrélation entre la production progressive d'oestrogènes endogènes et les niveaux croissants d'expression des protéines transmembranaires occludine et JAM-A après 10 jours post-nataux (Figure 24). Ainsi les oestrogènes endogènes pourraient jouer un rôle dans le processus de « fermeture » de la barrière intestinale. En outre, de nombreuses autres hormones telles que les glucocorticoïdes, la thyroxine et l'insuline sont également capables de moduler le transport intestinal en période post-natale, malgré la présence de mécanismes de synchronisation locale (Harada et al. 1990; Hough et al. 1990; Harada and Syuto 1991). Probablement qu'une coordination complexe entre les oestrogènes et ces hormones est d'une importance majeure lorsque le développement intestinal doit être accéléré et coordonné avec les changements développementaux dans tout l'organisme (par exemple, le sevrage) (Pacha 2000).

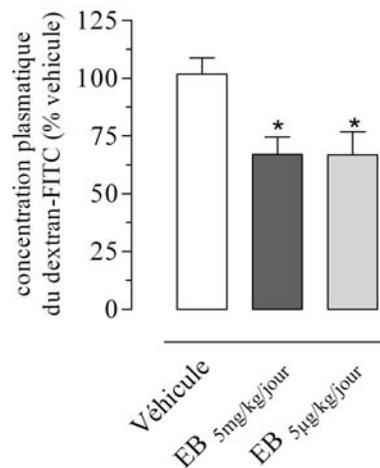


Figure 26: Conséquences d'un traitement oestradiol sur la perméabilité intestinale totale chez la rate de 10 jours

L'oestradiol (injections sous-cutanées) a été administré quotidiennement chez les jeunes femelles dès la naissance. Le 10^{ème} jour du traitement, la perméabilité paracellulaire intestinale totale a été évaluée par la mesure du passage d'une macromolécule fluorescente, dextran-FITC 4kDa administré par gavage oral, de la lumière intestinale vers la circulation sanguine (6-9 animaux par groupe).

En période périnatale, il convient de souligner que l' α -foetoprotéine, une protéine plasmatique de liaison des stéroïdes produite par le foie foetal et qui décroît en quelques jours après la naissance, protège le fœtus des oestrogènes d'origine maternelle et d'une différenciation sexuelle inappropriée du cerveau de la femelle (Mannan and O'Shaughnessy 1991; Nunez 1994). En revanche, l' α -foetoprotéine n'est pas capable de fixer le BPA

(Milligan et al. 1998), soulignant ainsi que l'exposition des fœtus et des nouveau-nés même à de faibles doses peut induire des altérations pendant le développement (Nagel et al. 1999). Ainsi au niveau du côlon, tant la surexpression d'ER β que l'absence d'oestrogènes circulants et l'incapacité pour l' α -foetoprotéine à bloquer la bioactivité du BPA apparaissent favorables pour les effets perturbateurs de cette substance. Dans ce contexte, nos plus récentes données montrent que l'exposition dès la période fœtale au BPA administré à la mère induit une réduction significative de la perméabilité intestinale totale chez le nouveau-né femelle âgé de 10 jours de vie (Figure 27A) à l'identique de l'effet propre de l'oestradiol (Figure 26). La diminution de la perméabilité paracellulaire a également été confirmée dans le seul segment du côlon (Figure 27B) comme déjà observé chez l'adulte F1, suggérant un effet persistant sur le long terme. De plus, la diminution de perméabilité intestinale (totale et colique) a été maximale (-40%) dès 5 μ g/kg/j de traitement maternel, soit à la dose dix fois inférieure à la DJA chez l'homme, confirmant la grande sensibilité de l'intestin du nouveau-né au xénoestrogène transmis par la mère. En conclusion, notre étude montre que l'exposition périnatale aux faibles doses de BPA bloque l'hyperperméabilité naturelle contemporaine de la maturation de l'intestin.

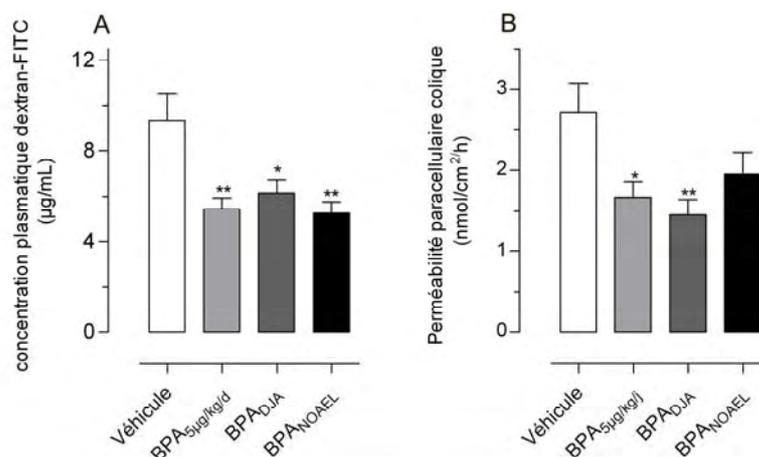


Figure 27: Conséquences d'une exposition périnatale au BPA sur la perméabilité paracellulaire intestinale totale (A) et colique (B).

Les rates gestantes ont été exposées au BPA par voie orale de la mi-gestation jusqu'à 10 jours post-nataux. La perméabilité intestinale a été mesurée chez les femelles de la descendance F1 en fin d'exposition. (A) La perméabilité intestinale totale a été déterminée par la mesure du passage du dextran-FITC de la lumière intestinale vers la circulation sanguine sur quatre heures. (B) La perméabilité paracellulaire colique a été mesurée sur des segments de côlon montés en chambre de Ussing par le passage de la macromolécule dextran-FITC du pôle muqueux vers le pôle séreux. ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ par rapport au groupe contrôle correspondant (Véhicule) (8-11 animaux par groupe).

Des études récentes ont suggéré que le flux de fluides au travers de l'épithélium peut aussi jouer un rôle important dans le développement du système de défense intestinal (Morris et al. 1998; Asfaha et al. 2001). Outre l'effet réducteur puissant du BPA sur le passage paracellulaire, constaté dès la naissance, un effet du perturbateur sur la voie transcellulaire ne peut être écarté, d'autant plus qu'au niveau intestinal cette voie joue un rôle très important dans le transport des fluides. Le passage des fluides à travers la membrane des cellules épithéliales est réalisé par diffusion, mais cette voie a une vitesse relativement faible (Agre et al. 2002). L'identification récente d'une famille de canaux membranaires intrinsèques, affichant une conductivité et une sélectivité élevée pour l'eau, a provoqué de nombreuses recherches sur l'expression et la fonction de ces protéines, appelées aquaporines (AQPs) (Kozono et al. 2002; Benga 2009). Les AQPs sont des protéines transmembranaires qui s'assemblent à plusieurs pour former des tunnels en forme de sablier dont l'intérieur est hydrophile et assure le transport bidirectionnel des fluides (Ma and Verkman 1999). Il existe des AQPs différentes selon les types cellulaires. Certaines ne laissent passer que l'eau (AQP 1, 2, 4, 5...) alors que d'autres permettent aussi le passage des substances hydrophiles comme le glycérol (AQP 3, 7, 9, 10), également appelées aquaglycéroporines. Parmi les AQPs exprimées au niveau intestinal, les AQP 1, 3, 4 et 8 jouent un rôle régulateur important dans la fonction de barrière intestinale.

L'AQP-1 est exprimée dans cellules endothéliales des capillaires au niveau de l'intestin et est impliquée dans le transport trans-endothélial d'eau (Matsuzaki et al. 2004). Nous avons observé une réduction significative de l'expression de l'AQP1 (-49% par rapport aux témoins) dans le côlon des femelles exposées au BPA_{NOAEL}, sans aucune modification aux plus faibles doses (Figure 28A). Par ailleurs, l'AQP1 est impliquée dans la plasticité cellulaire (Mobasher and Marples 2004; Hu and Verkman 2006; Papadopoulos et al. 2008). La déplétion de l'AQP1 réduit la migration cellulaire, empêche l'angiogénèse et retarde la cicatrisation des plaies (Saadoun et al. 2005; Papadopoulos et al. 2008). Ces capacités sont favorables à l'organisme adulte en limitant les processus tumoraux (Otterbach et al. 2008; Verkman 2009; Otterbach et al. 2010). En revanche, l'inhibition de l'AQP1 à une étape du développement intestinal pourrait induire un retard ou une maturation imparfaite de la barrière intestinale en le rendant plus vulnérable aux stimuli agressifs.

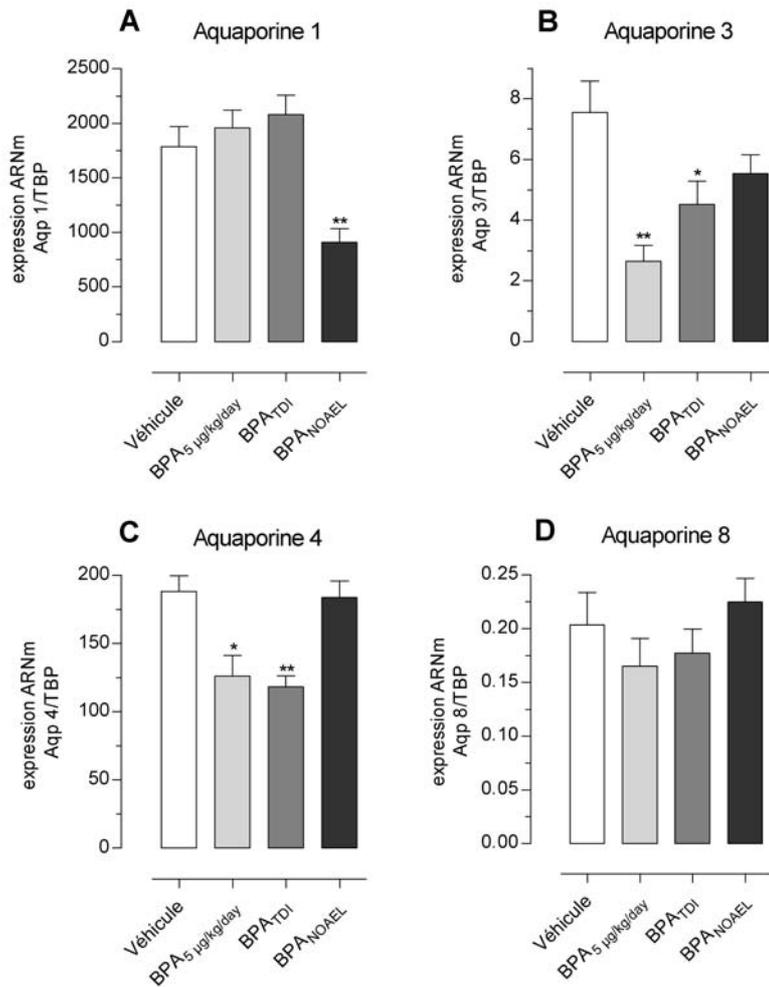


Figure 28: Modulation d'expression des aquaporines après exposition périnatale au BPA.

L'expression d'ARNm des AQP 1, 3, 4 et 8 a été déterminée par PCR quantitative dans le côlon des nouveau-nés femelles âgées de 10 jours et exposées via leur mère à trois doses de BPA (NOAEL, DJA et 5 µg/kg/j). ** p < 0,01 ; * p < 0,05 par rapport au groupe contrôle correspondant (8-11 animaux par groupe).

Par ailleurs, un rôle important est joué par les AQP4 et AQP8 dans le développement d'une inflammation intestinale (Hardin et al. 2004). Les deux AQPs sont exprimées au niveau des cellules épithéliales intestinales, où l'AQP4 est présente au niveau de la membrane baso-latérale, tandis que l'AQP8 l'est au niveau de la membrane apicale, toutes les deux jouant un rôle important dans le transport trans-cellulaire d'eau (Matsuzaki et al. 2004). Une diminution d'expression de ces deux AQPs est cependant associée à une augmentation de l'activité de MICI (Hardin et al. 2004). Or nous avons observé une diminution significative d'expression de l'AQP4 chez les femelles âgées de 10 jours et ayant reçu le BPA dès la période fœtale (-33% pour BPA₅µg/kg/jour et -37% pour BPA_{DJA}

comparé au groupe contrôle) (Figure 28C), en conditions basales non-inflammatoires. En revanche, aucune modification dans l'expression de l'AQP4 n'a été relevée au niveau du côlon de rates exposées au BPA_{NOAEL}. Cette observation souligne encore une fois un effet non monotone du xénoestrogène, puissant aux faibles doses (DJA et inférieures) mais non observé aux plus fortes (NOAEL). Malgré l'absence de modifications morphologiques au niveau de la muqueuse colique chez ces animaux, on peut néanmoins supposer une fragilité de la barrière intestinale en voie de développement, pouvant prédisposer au développement d'une inflammation lorsqu'un stimulus agressif se présente. Contrairement à nos attentes, l'exposition périnatale au BPA n'a pas modifié l'expression de l'AQP8, quelle que soit la dose d'exposition (Figure 28D).

Enfin, l'exposition périnatale au BPA a induit une forte diminution de l'expression colique de l'aquaglycéroporine AQP3 dès la dose de 5µg/kg/jour chez la rate âgée de 10 jours (Figure 28B). L'AQP3 est une protéine exprimée dans les cellules épithéliales tout au long de tractus gastro-intestinal, avec une plus forte expression au niveau du côlon et de l'iléon (Ramirez-Lorca et al. 1999; Silberstein et al. 1999), confirmant son rôle important dans le transport hydrique à ces niveaux. Comme précisé plus haut, en complément du passage d'eau, l'AQP3 est aussi une voie de transport du glycérol. Cette dernière capacité lui confère un rôle important dans la plasticité cellulaire, particulièrement dans la stimulation de la prolifération et de la migration cellulaire (Hara et al. 2002; Hara-Chikuma and Verkman 2008; Verkman 2009). L'inactivation du gène codant pour l'AQP3 chez la souris induit un ralentissement considérable du renouvellement de l'épithélium intestinal après l'induction d'une colite expérimentale au DSS (Thiagarajah et al. 2007), un processus de dérégulation déjà observé chez les patients souffrant de MICI. De plus, ces souris KO développent une inflammation intestinale plus sévère par rapport aux souris sauvages (Thiagarajah et al. 2007). Cette dernière caractéristique est comparable à l'exacerbation de l'inflammation observée dans notre étude chez les rates adultes exposées en période périnatale au BPA. Ainsi nous pourrions supposer l'existence d'un lien entre la réduction BPA-dépendante de l'expression de l'AQP3 dans l'intestin en développement et la fragilité de la barrière intestinale chez la femelle, possiblement due à un défaut de prolifération et de maturation de l'épithélium. Après exposition périnatale au BPA à la dose de 5µg/kg/jour, nos résultats préliminaires témoignent en effet d'une réduction significative de la prolifération des cellules épithéliales (-10%) parallèle à l'inhibition d'expression d'AQP3 chez le nouveau-né femelle de 10 jours (Figure 29). Par ailleurs, la

réduction de la prolifération cellulaire intestinale induite par le BPA pourrait résulter d'un effet direct sur ER β . En effet, les données de la littérature sur les souris KO pour ER β ont mis en évidence l'importance de cette voie de signalisation des oestrogènes dans le contrôle du renouvellement de l'épithélium intestinal (Wada-Hiraike et al. 2006). L'épithélium colique intestinal chez ces souris ER β -/- présente un défaut de développement et de maturation de l'épithélium, traduit par une hyperprolifération cellulaire, un ralentissement de la migration cellulaire le long de la crypte, une perte de la différenciation des cellules épithéliales et une inhibition des voies apoptotiques. Ces observations révèlent le rôle de frein de la voie ER β sur le renouvellement épithélial, opposé à l'effet proliférateur de ER α (Cho et al. 2007). Pour rappel, nous avons observé que ER β était présent dès l'âge fœtal dans le côlon, avec un niveau d'expression deux fois plus important à la naissance par rapport à l'adulte. Mais cette surexpression à la naissance n'est probablement pas délétère pour le processus de prolifération cellulaire qui prépare l'intestin à son nouvel environnement, tenant compte de l'incapacité enzymatique de l'ovaire fœtal à produire de l'œstradiol et de l'action « tampon » de l' α -foetoprotéine sur les oestrogènes maternels. Par contre, nous avons vu que l'exposition au BPA durant cette période vulnérable freinait la prolifération et le renouvellement des cellules coliques dans un contexte où la présence de cellules PCNA positives à la base de cryptes témoigne d'une prolifération intense à cette étape de la vie (Figure 29). Il en est de même avec d'autres xénoestrogènes comme la génistéine du soja. En effet chez le porcelet, l'administration dès 48 heures suivant la naissance de formules infantiles à base des protéines de soja altère également le développement de l'intestin en exerçant une activité anti-proliférative, dès le 3^{ème} jour de traitement (Chen et al. 2005). La génistéine est un flavonoïde de soja présentant une bonne capacité de liaison aux ERs, en particulier pour ER β (Kuiper et al. 1997). Dans notre étude, outre son action sur les ERs, l'activité anti-proliférative du BPA pourrait aussi résulter d'une diminution de facteurs de croissances. Des études récentes ont en effet mis en évidence chez la truite la capacité du BPA à réduire l'expression d'IGF (*Insulin-like Growth Factors*) dès la période embryonnaire (Aluru et al. 2010). Or, l'expression d'IGF est très élevée dès la naissance au niveau de l'intestin et suivie d'une diminution progressive (Young et al. 1990; Sklar et al. 1992). Cette forte expression d'IGF chez le nouveau-né est nécessaire pour assurer le transport des aminoacides au niveau intestinal et stimuler la prolifération cellulaire (Fholenhog et al. 1996).

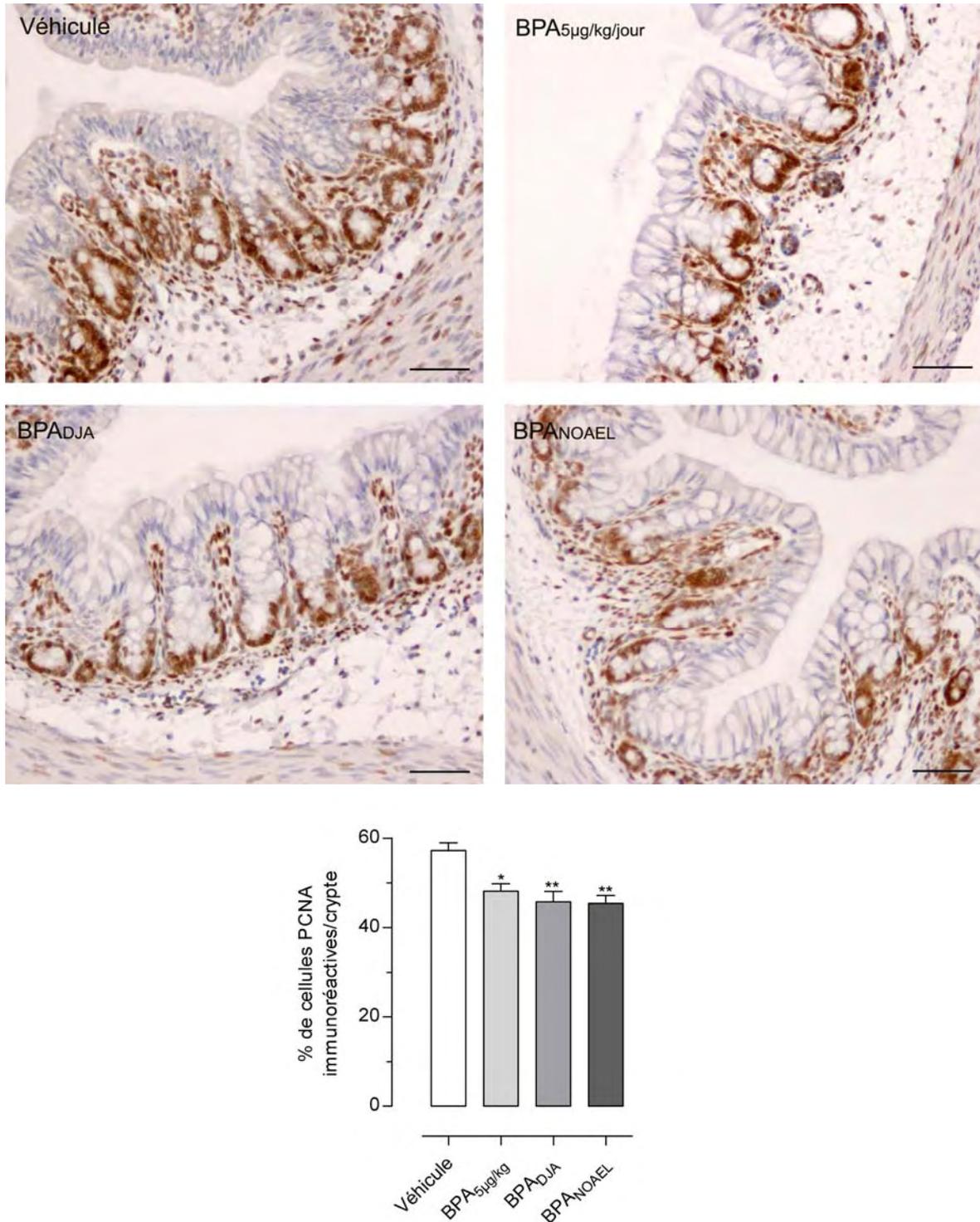


Figure 29: Conséquences d'une exposition périnatale au BPA sur la prolifération des cellules épithéliales coliques.

La prolifération cellulaire a été évaluée par le marquage immunohistochimique des cellules PCNA (*Proliferating cell nuclear antigen*). Les anticorps anti-PCNA se fixent sur des protéines exprimées dans les cellules entrées en division. Le nombre moyen de cellules totales comptées par crypte a été similaire dans tous les groupes. Les résultats ont été exprimés en pourcentage de cellules PCNA immunoreactives par rapport au nombre total des cellules par crypte. ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ par rapport au groupe contrôle (4-6 animaux par groupe).

CONCLUSION GENERALE

Si la présence de récepteurs aux oestrogènes dans le tube digestif était connue depuis le début des années 90 et les données cliniques nombreuses pour témoigner d'une influence du statut hormonal sur la symptomatologie intestinale, l'importance du statut hormonal dans le contrôle de la fonction de barrière digestive reste un domaine peu étudié. Les travaux entrepris au cours de cette thèse s'inscrivent dans cette thématique. Ils ont permis de mettre en évidence une modulation de la perméabilité épithéliale chez la femelle au cours du cycle sexuel, un effet essentiellement dû aux fluctuations des concentrations circulantes d'oestrogènes. Ces derniers sont capables, par la voie de signalisation ER β localisée au niveau des cellules épithéliales, d'induire une surexpression des protéines transmembranaires de jonctions serrées, s'accompagnant d'une diminution de la perméabilité paracellulaire dans l'intestin. Chez la femme, un tel mécanisme pourrait contribuer à la rétention des fluides corporels, une situation souvent observée à certains stades du cycle menstruel ou dans les hauts statuts oestrogéniques (contraception, traitement hormonal substitutif). En revanche, en conditions pathologiques, la modulation de la perméabilité intestinale par les oestrogènes circulants pourrait contribuer aux variations des symptômes intestinaux (ex. douleur viscérale), une symptomatologie rapportée par les patientes SII et MICI au cours de leur cycle menstruel. En partant de ce constat clinique et de nos résultats expérimentaux, nous avons mis en évidence dans un modèle animal de SII (stress aigu) que l'administration d'un agoniste de ER β chez la rate adulte réduisait l'hypersensibilité viscérale induite par le stress. Cette observation s'accorde bien avec de précédentes observations obtenues chez le rat au laboratoire et montrant que l'hyperperméabilité intestinale est responsable de l'augmentation de la perception de la douleur viscérale. Sachant que l'altération de la barrière intestinale est un facteur clé dans la pathogenèse du SII, une suite intéressante à notre étude serait d'évaluer le potentiel thérapeutique des agonistes de ER β dans le renforcement de la barrière intestinale chez les patients souffrant de SII.

Dans un second temps, nous avons apporté la preuve que la barrière intestinale était une cible du BPA, avec des effets différents selon la période d'exposition (périnatale ou adulte) et le sexe. Le BPA est contaminant alimentaire connu comme perturbateur endocrinien et présentant des propriétés oestrogéno-mimétiques. Si les effets du BPA sur la barrière épithéliale chez l'adulte s'apparentent à ceux déjà énoncés de l'oestradiol au cours du cycle sexuel (réduction de perméabilité *via* ER β), il est important de noter que l'activité

du xénoestrogène s'établit de façon chronique, contrairement aux oestrogènes endogènes dont les concentrations circulantes, donc les effets, varient au cours du cycle. Il apparaît donc difficile d'extrapoler les propriétés bénéfiques des oestrogènes (baisse de perméabilité = renforcement de la fonction de barrière) aux effets du BPA ingéré par la voie orale, même si ce dernier présente une meilleure affinité pour ER β . En témoigne les conséquences d'une exposition en période périnatale aux faibles doses de BPA, qui s'accompagnent d'une fragilité de la fonction de barrière intestinale dans la descendance femelle, déséquilibrant la réponse immunitaire face à un stimulus agressif. Nous avons fait l'hypothèse qu'une réduction de la perméabilité intestinale à une période où celle-ci est naturellement élevée affecte la maturation du système immunitaire intestinal, un processus dépendant des échanges entre les antigènes présents dans la lumière et les cellules immunitaires naïves à la naissance. De plus, le BPA en période périnatale réduit la prolifération cellulaire et affecte ainsi le renouvellement de l'épithélium, un effet que l'on suspecte lié à son activité sur ER β fortement exprimé dès la période fœtale. Ainsi nous montrons que le développement de la barrière intestinale en période périnatale est une fenêtre d'exposition critique au BPA, et constitue un facteur de risque de développer une réponse inflammatoire sévère plus tard à l'âge adulte, mais non spontanée. D'autres études sont nécessaires pour déterminer si une telle exposition prépare à un terrain propice à développer des maladies chroniques de l'intestin, telles que les SII ou MICI.

L'ensemble de ces travaux illustrent la très grande sensibilité de l'intestin au BPA et ouvrent de nouvelles voies de recherches sur la caractérisation et l'évaluation des effets des perturbateurs endocriniens d'origine alimentaire. Ils pourront contribuer à l'évaluation des risques et à la définition de nouveaux seuils acceptables d'exposition pour ces molécules.

REFERENCES

A

- Acconcia F, Ascenzi P, Bocedi A, Spisni E, Tomasi V, Trentalance A, Visca P, Marino M. Palmitoylation-dependent estrogen receptor alpha membrane localization: regulation by 17beta-estradiol. *Mol Biol Cell* 2005;16(1):231-237.
- AFSSA. Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à des précisions suite à l'avis de l'Afssa du 29 janvier 2010 sur le bisphénol A. Afssa – Saisine n° 2010-SA-0040. . 2010a.
- AFSSA. Communiqué de presse Bisphénol A : l'Afssa préconise le développement de nouvelles méthodes d'évaluation. 2010b.
- Agre P, King LS, Yasui M, Guggino WB, Ottersen OP, Fujiyoshi Y, Engel A, Nielsen S. Aquaporin water channels--from atomic structure to clinical medicine. *J Physiol* 2002;542(Pt 1):3-16.
- Ait-Belgnaoui A, Bradesi S, Fioramonti J, Theodorou V, Bueno L. Acute stress-induced hypersensitivity to colonic distension depends upon increase in paracellular permeability: role of myosin light chain kinase. *Pain* 2005;113(1-2):141-147.
- Akingbemi BT, Sottas CM, Koulova AI, Klinefelter GR, Hardy MP. Inhibition of testicular steroidogenesis by the xenoestrogen bisphenol A is associated with reduced pituitary luteinizing hormone secretion and decreased steroidogenic enzyme gene expression in rat Leydig cells. *Endocrinology* 2004;145(2):592-603.
- Alexandre MD, Lu Q, Chen YH. Overexpression of claudin-7 decreases the paracellular Cl⁻ conductance and increases the paracellular Na⁺ conductance in LLC-PK1 cells. *J Cell Sci* 2005;118(Pt 12):2683-2693.
- Aloisi AM, Della Seta D, Rendo C, Ceccarelli I, Scaramuzzino A, Farabollini F. Exposure to the estrogenic pollutant bisphenol A affects pain behavior induced by subcutaneous formalin injection in male and female rats. *Brain Res* 2002;937(1-2):1-7.
- Alonso-Magdalena P, Morimoto S, Ripoll C, Fuentes E, Nadal A. The estrogenic effect of bisphenol A disrupts pancreatic beta-cell function in vivo and induces insulin resistance. *Environ Health Perspect* 2006;114(1):106-112.
- Aluru N, Leatherland JF, Vijayan MM. Bisphenol A in oocytes leads to growth suppression and altered stress performance in juvenile rainbow trout. *PLoS One* 2010;5(5):e10741.
- Amasheh S, Fromm M, Gunzel D. Claudins of intestine and nephron - a correlation of molecular tight junction structure and barrier function. *Acta Physiol (Oxf)* 2010.
- Amasheh S, Meiri N, Gitter AH, Schoneberg T, Mankertz J, Schulzke JD, Fromm M. Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *J Cell Sci* 2002;115(Pt 24):4969-4976.

- Amasheh S, Schmidt T, Mahn M, Florian P, Mankertz J, Tavalali S, Gitter AH, Schulzke JD, Fromm M. Contribution of claudin-5 to barrier properties in tight junctions of epithelial cells. *Cell Tissue Res* 2005;321(1):89-96.
- Ariazi EA, Brailoiu E, Yerrum S, Shupp HA, Slifker MJ, Cunliffe HE, Black MA, Donato AL, Arterburn JB, Oprea TI, Prossnitz ER, Dun NJ, Jordan VC. The G protein-coupled receptor GPR30 inhibits proliferation of estrogen receptor-positive breast cancer cells. *Cancer Res* 2010;70(3):1184-1194.
- Asfaha S, MacNaughton WK, Appleyard CB, Chadee K, Wallace JL. Persistent epithelial dysfunction and bacterial translocation after resolution of intestinal inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;281(3):G635-644.
- Atherton JC, Dark JM, Garland HO, Morgan MR, Pidgeon J, Soni S. Changes in water and electrolyte balance, plasma volume and composition during pregnancy in the rat. *J Physiol* 1982;330:81-93.

B

- Bakker J, De Mees C, Douhard Q, Balthazart J, Gabant P, Szpirer J, Szpirer C. Alpha-fetoprotein protects the developing female mouse brain from masculinization and defeminization by estrogens. *Nat Neurosci* 2006;9(2):220-226.
- Balakrishnan B, Henare K, Thorstensen EB, Ponnampalam AP, Mitchell MD. Transfer of bisphenol A across the human placenta. *Am J Obstet Gynecol* 2010;202(4):393 e391-397.
- Balda MS, Whitney JA, Flores C, Gonzalez S, Cerejido M, Matter K. Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein. *J Cell Biol* 1996;134(4):1031-1049.
- Baranao RI, Tenenbaum A, Sales ME, Rumi LS. Functional alterations of murine peritoneal macrophages during pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 1992;27(1-2):82-86.
- Barbara G, De Giorgio R, Stanghellini V, Cremon C, Corinaldesi R. A role for inflammation in irritable bowel syndrome? *Gut* 2002;51 Suppl 1:i41-44.
- Bardin A, Boulle N, Lazennec G, Vignon F, Pujol P. Loss of ERbeta expression as a common step in estrogen-dependent tumor progression. *Endocr Relat Cancer* 2004;11(3):537-551.
- Basheer C, Lee HK, Tan KS. Endocrine disrupting alkylphenols and bisphenol-A in coastal waters and supermarket seafood from Singapore. *Mar Pollut Bull* 2004;48(11-12):1161-1167.
- Baugh JA, Donnelly SC. Macrophage migration inhibitory factor: a neuroendocrine modulator of chronic inflammation. *J Endocrinol* 2003;179(1):15-23.

- Bazzoni G, Martinez-Estrada OM, Orsenigo F, Cordenonsi M, Citi S, Dejana E. Interaction of junctional adhesion molecule with the tight junction components ZO-1, cingulin, and occludin. *J Biol Chem* 2000;275(27):20520-20526.
- Becker K, Goen T, Seiwert M, Conrad A, Pick-Fuss H, Muller J, Wittassek M, Schulz C, Kolossa-Gehring M. GerES IV: phthalate metabolites and bisphenol A in urine of German children. *Int J Hyg Environ Health* 2009;212(6):685-692.
- Belfroid A, van Velzen M, van der Horst B, Vethaak D. Occurrence of bisphenol A in surface water and uptake in fish: evaluation of field measurements. *Chemosphere* 2002;49(1):97-103.
- Benga G. Water channel proteins (later called aquaporins) and relatives: past, present, and future. *IUBMB Life* 2009;61(2):112-133.
- Bernard JF, Besson JM. The spino(trigemino)pontoamygdaloid pathway: electrophysiological evidence for an involvement in pain processes. *J Neurophysiol* 1990;63(3):473-490.
- Biedermann S, Tschudin P, Grob K. Transfer of bisphenol A from thermal printer paper to the skin. *Anal Bioanal Chem* 2010;398(1):571-576.
- Bouskine A, Nebout M, Brucker-Davis F, Benahmed M, Fenichel P. Low doses of bisphenol A promote human seminoma cell proliferation by activating PKA and PKG via a membrane G-protein-coupled estrogen receptor. *Environ Health Perspect* 2009;117(7):1053-1058.
- Bradesi S, Eutamene H, Garcia-Villar R, Fioramonti J, Bueno L. Stress-induced visceral hypersensitivity in female rats is estrogen-dependent and involves tachykinin NK1 receptors. *Pain* 2003;102(3):227-234.
- Breese E, Braegger CP, Corrigan CJ, Walker-Smith JA, MacDonald TT. Interleukin-2- and interferon-gamma-secreting T cells in normal and diseased human intestinal mucosa. *Immunology* 1993;78(1):127-131.

C

- Cain KC, Jarrett ME, Burr RL, Rosen S, Hertig VL, Heitkemper MM. Gender differences in gastrointestinal, psychological, and somatic symptoms in irritable bowel syndrome. *Dig Dis Sci* 2009;54(7):1542-1549.
- Calafat AM, Weuve J, Ye X, Jia LT, Hu H, Ringer S, Huttner K, Hauser R. Exposure to bisphenol A and other phenols in neonatal intensive care unit premature infants. *Environ Health Perspect* 2009;117(4):639-644.
- Calafat AM, Ye X, Wong LY, Reidy JA, Needham LL. Exposure of the U.S. population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003-2004. *Environ Health Perspect* 2008;116(1):39-44.

- Calandra T, Roger T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2003;3(10):791-800.
- Campbell-Thompson M, Lynch IJ, Bhardwaj B. Expression of estrogen receptor (ER) subtypes and ERbeta isoforms in colon cancer. *Cancer Res* 2001;61(2):632-640.
- Catassi C, Bonucci A, Coppa GV, Carlucci A, Giorgi PL. Intestinal permeability changes during the first month: effect of natural versus artificial feeding. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1995;21(4):383-386.
- Cebra JJ, Periwal SB, Lee G, Lee F, Shroff KE. Development and maintenance of the gut-associated lymphoid tissue (GALT): the roles of enteric bacteria and viruses. *Dev Immunol* 1998;6(1-2):13-18.
- Ceccarelli I, Della Seta D, Fiorenzani P, Farabollini F, Aloisi AM. Estrogenic chemicals at puberty change ERalpha in the hypothalamus of male and female rats. *Neurotoxicol Teratol* 2007;29(1):108-115.
- Chang L, Mayer EA, Labus JS, Schmulson M, Lee OY, Olivas TI, Stains J, Naliboff BD. Effect of sex on perception of rectosigmoid stimuli in irritable bowel syndrome. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006;291(2):R277-284.
- Chen AC, Berhow MA, Tappenden KA, Donovan SM. Genistein inhibits intestinal cell proliferation in piglets. *Pediatr Res* 2005;57(2):192-200.
- Cheng L, Pricolo V, Biancani P, Behar J. Overexpression of progesterone receptor B increases sensitivity of human colon muscle cells to progesterone. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008;295(3):G493-502.
- Cho NL, Javid SH, Carothers AM, Redston M, Bertagnolli MM. Estrogen receptors alpha and beta are inhibitory modifiers of Apc-dependent tumorigenesis in the proximal colon of Min/+ mice. *Cancer Res* 2007;67(5):2366-2372.
- Clayburgh DR, Shen L, Turner JR. A porous defense: the leaky epithelial barrier in intestinal disease. *Lab Invest* 2004;84(3):282-291.
- Colome G, Sierra C, Blasco J, Garcia MV, Valverde E, Sanchez E. Intestinal permeability in different feedings in infancy. *Acta Paediatr* 2007;96(1):69-72.
- Condliffe SB, Doolan CM, Harvey BJ. 17beta-oestradiol acutely regulates Cl⁻ secretion in rat distal colonic epithelium. *J Physiol* 2001;530(Pt 1):47-54.
- Coombes JL, Powrie F. Dendritic cells in intestinal immune regulation. *Nat Rev Immunol* 2008;8(6):435-446.
- Coughtrie MW, Burchell B, Leakey JE, Hume R. The inadequacy of perinatal glucuronidation: immunoblot analysis of the developmental expression of individual UDP-glucuronosyltransferase isoenzymes in rat and human liver microsomes. *Mol Pharmacol* 1988;34(6):729-735.

Craft RM, Mogil JS, Aloisi AM. Sex differences in pain and analgesia: the role of gonadal hormones. *Eur J Pain* 2004;8(5):397-411.

Craig AD, Jr., Burton H. Spinal and medullary lamina I projection to nucleus submedius in medial thalamus: a possible pain center. *J Neurophysiol* 1981;45(3):443-466.

Curran EM, Berghaus LJ, Verneti NJ, Saporita AJ, Lubahn DB, Estes DM. Natural killer cells express estrogen receptor-alpha and estrogen receptor-beta and can respond to estrogen via a non-estrogen receptor-alpha-mediated pathway. *Cell Immunol* 2001;214(1):12-20.

D

de Jong YP, Abadia-Molina AC, Satoskar AR, Clarke K, Rietdijk ST, Faubion WA, Mizoguchi E, Metz CN, Alsahli M, ten Hove T, Keates AC, Lubetsky JB, Farrell RJ, Michetti P, van Deventer SJ, Lolis E, David JR, Bhan AK, Terhorst C. Development of chronic colitis is dependent on the cytokine MIF. *Nat Immunol* 2001;2(11):1061-1066.

Delluc C, Benamouzig R. [Hormone replacement therapy and colorectal cancer]. *Gastroenterol Clin Biol* 2008;32(1 Pt. 1):19-28.

E

Ebnet K, Schulz CU, Meyer Zu Brickwedde MK, Pendl GG, Vestweber D. Junctional adhesion molecule interacts with the PDZ domain-containing proteins AF-6 and ZO-1. *J Biol Chem* 2000;275(36):27979-27988.

EFSA. Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food on a request from the Commission related to 2,2-BIS(4-HYDROXYPHENYL)PROPANE (Bisphenol A) Question number EFSA-Q-2005-100. Adopted on 29 November 2006. *The EFSA Journal* 2006;428:1-75.

EFSA. Toxicokinetics of Bisphenol A. Scientific Opinion of the Panel on Food additives, Flavourings, Processing aids and Materials in Contact with Food (AFC) (Question No EFSA-Q-2008-382). Adopted on 9 July 2008. *The EFSA Journal* 2008;759:1-10.

El-Tawil AM. Oestrogens and Crohn's disease: the missed link. *Andrologia* 2008;40(3):141-145.

Emanuele MA, Wezeman F, Emanuele NV. Alcohol's effects on female reproductive function. *Alcohol Res Health* 2002;26(4):274-281.

Engel SM, Levy B, Liu Z, Kaplan D, Wolff MS. Xenobiotic phenols in early pregnancy amniotic fluid. *Reprod Toxicol* 2006;21(1):110-112.

European Commission. Final opinion of the Scientific Committee on Food on Bisphenol A (Expressed on 17 April 2002) SCF/CS/PM/3936

F

- Fanning AS, Jameson BJ, Jesaitis LA, Anderson JM. The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 1998;273(45):29745-29753.
- Fent G, Hein WJ, Moendel MJ, Kubiak R. Fate of ¹⁴C-bisphenol A in soils. *Chemosphere* 2003;51(8):735-746.
- Fholenhog K, Malmlof K, Saxerholt H, Klingstrom G, Skottner A, Nyberg F. Effects of insulin-like growth factor I (IGF-I) on the porto-arterial concentration differences of amino acids and glucose: a comparison between oral and intraperitoneal administration in the newborn piglet. *Horm Metab Res* 1996;28(11):582-587.
- Filardo EJ, Thomas P. GPR30: a seven-transmembrane-spanning estrogen receptor that triggers EGF release. *Trends Endocrinol Metab* 2005;16(8):362-367.
- Fiorini C, Tilloy-Ellul A, Chevalier S, Charuel C, Pointis G. Sertoli cell junctional proteins as early targets for different classes of reproductive toxicants. *Reprod Toxicol* 2004;18(3):413-421.
- Foley EF, Jazaeri AA, Shupnik MA, Jazaeri O, Rice LW. Selective loss of estrogen receptor beta in malignant human colon. *Cancer Res* 2000;60(2):245-248.
- Fruzzetti F, Lazzarini V, Ricci C, Quirici B, Gambacciani M, Paoletti AM, Genazzani AR. Effect of an oral contraceptive containing 30 microg ethinylestradiol plus 3 mg drospirenone on body composition of young women affected by premenstrual syndrome with symptoms of water retention. *Contraception* 2007;76(3):190-194.
- Furuse M, Hata M, Furuse K, Yoshida Y, Haratake A, Sugitani Y, Noda T, Kubo A, Tsukita S. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol* 2002;156(6):1099-1111.
- Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* 1993;123(6 Pt 2):1777-1788.
- Furuse M, Itoh M, Hirase T, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S. Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions. *J Cell Biol* 1994;127(6 Pt 1):1617-1626.
- Furuse M, Sasaki H, Fujimoto K, Tsukita S. A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. *J Cell Biol* 1998;143(2):391-401.

G

- Gambling L, Dunford S, Wilson CA, McArdle HJ, Baines DL. Estrogen and progesterone regulate alpha, beta, and gammaENaC subunit mRNA levels in female rat kidney. *Kidney Int* 2004;65(5):1774-1781.
- Garcia Rodriguez LA, Gonzalez-Perez A, Johansson S, Wallander MA. Risk factors for inflammatory bowel disease in the general population. *Aliment Pharmacol Ther* 2005;22(4):309-315.
- Gassler N, Rohr C, Schneider A, Kartenbeck J, Bach A, Obermuller N, Otto HF, Autschbach F. Inflammatory bowel disease is associated with changes of enterocytic junctions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;281(1):G216-228.
- Gebhart GF. Peripheral contributions to visceral hyperalgesia. *Can J Gastroenterol* 1999;13 Suppl A:37A-41A.
- Gecse K, Roka R, Ferrier L, Leveque M, Eutamene H, Cartier C, Ait-Belgnaoui A, Rosztoczy A, Izbeki F, Fioramonti J, Wittmann T, Bueno L. Increased faecal serine protease activity in diarrhoeic IBS patients: a colonic luminal factor impairing colonic permeability and sensitivity. *Gut* 2008;57(5):591-599.
- Geibel JP. Secretion and absorption by colonic crypts. *Annu Rev Physiol* 2005;67:471-490.
- Ghassemifar MR, Sheth B, Papenbrock T, Leese HJ, Houghton FD, Fleming TP. Occludin TM4(-): an isoform of the tight junction protein present in primates lacking the fourth transmembrane domain. *J Cell Sci* 2002;115(Pt 15):3171-3180.
- Giannone PJ, Schanbacher BL, Bauer JA, Reber KM. Effects of prenatal lipopolysaccharide exposure on epithelial development and function in newborn rat intestine. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006;43(3):284-290.
- Ginsberg G, Rice DC. Does rapid metabolism ensure negligible risk from bisphenol A? *Environ Health Perspect* 2009;117(11):1639-1643.
- Gordon JI, Hooper LV, McNevin MS, Wong M, Bry L. Epithelial cell growth and differentiation. III. Promoting diversity in the intestine: conversations between the microflora, epithelium, and diffuse GALT. *Am J Physiol* 1997;273(3 Pt 1):G565-570.
- Gorodeski GI. Estrogen biphasic regulation of paracellular permeability of cultured human vaginal-cervical epithelia. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(9):4233-4243.
- Gould JC, Leonard LS, Maness SC, Wagner BL, Conner K, Zacharewski T, Safe S, McDonnell DP, Gaido KW. Bisphenol A interacts with the estrogen receptor alpha in a distinct manner from estradiol. *Mol Cell Endocrinol* 1998;142(1-2):203-214.

- Greenspan JD, Craft RM, LeResche L, Arendt-Nielsen L, Berkley KJ, Fillingim RB, Gold MS, Holdcroft A, Lautenbacher S, Mayer EA, Mogil JS, Murphy AZ, Traub RJ. Studying sex and gender differences in pain and analgesia: a consensus report. *Pain* 2007;132 Suppl 1:S26-45.
- Grewal IS, Flavell RA. CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu Rev Immunol* 1998;16:111-135.
- Grimaldi CM, Cleary J, Dagtas AS, Moussai D, Diamond B. Estrogen alters thresholds for B cell apoptosis and activation. *J Clin Invest* 2002;109(12):1625-1633.
- Grumbach MM. The neuroendocrinology of human puberty revisited. *Horm Res* 2002;57 Suppl 2:2-14.
- Gurbuz AK, Gurbuz B, Salas L, Rosenshein NB, Donowitz M, Giardiello FM. Premarin-induced ischemic colitis. *J Clin Gastroenterol* 1994;19(2):108-111.

H

- Hall JM, Couse JF, Korach KS. The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *J Biol Chem* 2001;276(40):36869-36872.
- Hall JM, McDonnell DP. Coregulators in nuclear estrogen receptor action: from concept to therapeutic targeting. *Mol Interv* 2005;5(6):343-357.
- Hara-Chikuma M, Verkman AS. Aquaporin-3 facilitates epidermal cell migration and proliferation during wound healing. *J Mol Med* 2008;86(2):221-231.
- Hara M, Ma T, Verkman AS. Selectively reduced glycerol in skin of aquaporin-3-deficient mice may account for impaired skin hydration, elasticity, and barrier recovery. *J Biol Chem* 2002;277(48):46616-46621.
- Harada E, Hashimoto Y, Syuto B. Epidermal growth factor accelerates the intestinal cessation of macromolecular transmission in the suckling rat. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 1990;97(2):201-204.
- Harada E, Syuto B. Precocious cessation of intestinal macromolecular transmission and sucrase development induced by insulin in adrenalectomized suckling rat. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 1991;99(3):327-331.
- Hardin JA, Wallace LE, Wong JF, O'Loughlin EV, Urbanski SJ, Gall DG, MacNaughton WK, Beck PL. Aquaporin expression is downregulated in a murine model of colitis and in patients with ulcerative colitis, Crohn's disease and infectious colitis. *Cell Tissue Res* 2004;318(2):313-323.
- Harnish DC, Albert LM, Leathurby Y, Eckert AM, Ciarletta A, Kasaian M, Keith JC, Jr. Beneficial effects of estrogen treatment in the HLA-B27 transgenic rat model of inflammatory bowel disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;286(1):G118-125.

- Harris HA, Albert LM, Leathurby Y, Malamas MS, Mewshaw RE, Miller CP, Kharode YP, Marzolf J, Komm BS, Winneker RC, Frail DE, Henderson RA, Zhu Y, Keith JC, Jr. Evaluation of an estrogen receptor-beta agonist in animal models of human disease. *Endocrinology* 2003;144(10):4241-4249.
- Harvey BJ, Condliffe S, Doolan CM. Sex and salt hormones: rapid effects in epithelia. *News Physiol Sci* 2001;16:174-177.
- Heaton KW, Radvan J, Cripps H, Mountford RA, Braddon FE, Hughes AO. Defecation frequency and timing, and stool form in the general population: a prospective study. *Gut* 1992;33(6):818-824.
- Heitkemper MM, Cain KC, Jarrett ME, Burr RL, Hertig V, Bond EF. Symptoms across the menstrual cycle in women with irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2003;98(2):420-430.
- Heitkemper MM, Chang L. Do fluctuations in ovarian hormones affect gastrointestinal symptoms in women with irritable bowel syndrome? *Gend Med* 2009;6 Suppl 2:152-167.
- Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, Tujague M, Strom A, Treuter E, Warner M, Gustafsson JA. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev* 2007;87(3):905-931.
- Helgeland L, Dissen E, Dai KZ, Midtvedt T, Brandtzaeg P, Vaage JT. Microbial colonization induces oligoclonal expansions of intraepithelial CD8 T cells in the gut. *Eur J Immunol* 2004;34(12):3389-3400.
- Herath CB, Jin W, Watanabe G, Arai K, Suzuki AK, Taya K. Adverse effects of environmental toxicants, octylphenol and bisphenol A, on male reproductive functions in pubertal rats. *Endocrine* 2004;25(2):163-172.
- Hess RA. Estrogen in the adult male reproductive tract: a review. *Reprod Biol Endocrinol* 2003;1:52.
- Hiroi H, Tsutsumi O, Takeuchi T, Momoeda M, Ikezuki Y, Okamura A, Yokota H, Taketani Y. Differences in serum bisphenol a concentrations in premenopausal normal women and women with endometrial hyperplasia. *Endocr J* 2004;51(6):595-600.
- Homma H, Hoy E, Xu DZ, Lu Q, Feinman R, Deitch EA. The female intestine is more resistant than the male intestine to gut injury and inflammation when subjected to conditions associated with shock states. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005;288(3):G466-472.
- Hooper LV, Gordon JI. Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science* 2001;292(5519):1115-1118.
- Houdeau E, Moriez R, Leveque M, Salvador-Cartier C, Waget A, Leng L, Bueno L, Bucala R, Fioramonti J. Sex steroid regulation of macrophage migration inhibitory

factor in normal and inflamed colon in the female rat. *Gastroenterology* 2007;132(3):982-993.

Hough RL, McCarthy FD, Thatcher CD, Kent HD, Eversole DE. Influence of glucocorticoid on macromolecular absorption and passive immunity in neonatal lambs. *J Anim Sci* 1990;68(8):2459-2464.

Howdeshell KL, Furr J, Lambright CR, Wilson VS, Ryan BC, Gray LE, Jr. Gestational and lactational exposure to ethinyl estradiol, but not bisphenol A, decreases androgen-dependent reproductive organ weights and epididymal sperm abundance in the male long evans hooded rat. *Toxicol Sci* 2008;102(2):371-382.

Hu J, Verkman AS. Increased migration and metastatic potential of tumor cells expressing aquaporin water channels. *FASEB J* 2006;20(11):1892-1894.

I

Ikezuki Y, Tsutsumi O, Takai Y, Kamei Y, Taketani Y. Determination of bisphenol A concentrations in human biological fluids reveals significant early prenatal exposure. *Hum Reprod* 2002;17(11):2839-2841.

Inoue H, Yuki G, Yokota H, Kato S. Bisphenol A glucuronidation and absorption in rat intestine. *Drug Metab Dispos* 2003;31(1):140-144.

Inoue K, Kato K, Yoshimura Y, Makino T, Nakazawa H. Determination of bisphenol A in human serum by high-performance liquid chromatography with multi-electrode electrochemical detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2000;749(1):17-23.

Isensee J, Meoli L, Zazzu V, Nabzdyk C, Witt H, Soewarto D, Effertz K, Fuchs H, Gailus-Durner V, Busch D, Adler T, de Angelis MH, Irgang M, Otto C, Noppinger PR. Expression pattern of G protein-coupled receptor 30 in LacZ reporter mice. *Endocrinology* 2009;150(4):1722-1730.

Ito R, Shin-Ya M, Kishida T, Urano A, Takada R, Sakagami J, Imanishi J, Kita M, Ueda Y, Iwakura Y, Kataoka K, Okanou T, Mazda O. Interferon-gamma is causatively involved in experimental inflammatory bowel disease in mice. *Clin Exp Immunol* 2006;146(2):330-338.

Itoh M, Furuse M, Morita K, Kubota K, Saitou M, Tsukita S. Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *J Cell Biol* 1999;147(6):1351-1363.

J

Jankowski M, Rachelska G, Donghao W, McCann SM, Gutkowska J. Estrogen receptors activate atrial natriuretic peptide in the rat heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(20):11765-11770.

- Jensen EV, Jacobson HI. Basic guides to the mechanism of estrogen action. *Recent Prog Horm Res* 1962;18:387-414.
- Ji Y, Murphy AZ, Traub RJ. Estrogen modulates the visceromotor reflex and responses of spinal dorsal horn neurons to colorectal stimulation in the rat. *J Neurosci* 2003;23(9):3908-3915.
- Ji Y, Tang B, Traub RJ. Modulatory effects of estrogen and progesterone on colorectal hyperalgesia in the rat. *Pain* 2005;117(3):433-442.
- Ji Y, Tang B, Traub RJ. The visceromotor response to colorectal distention fluctuates with the estrous cycle in rats. *Neuroscience* 2008;154(4):1562-1567.
- Juhl GI, Svensson P, Norholt SE, Jensen TS. Long-lasting mechanical sensitization following third molar surgery. *J Orofac Pain* 2006;20(1):59-73.

K

- Kane SV, Reddy D. Hormonal replacement therapy after menopause is protective of disease activity in women with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2008;103(5):1193-1196.
- Kang HS, Ahn HS, Kang HJ, Gye MC. Effect of estrogen on the expression of occludin in ovariectomized mouse brain. *Neurosci Lett* 2006a;402(1-2):30-34.
- Kang JH, Kondo F, Katayama Y. Human exposure to bisphenol A. *Toxicology* 2006b;226(2-3):79-89.
- Kapus A, Szaszi K. Coupling between apical and paracellular transport processes. *Biochem Cell Biol* 2006;84(6):870-880.
- Katayama M, Xu D, Specian RD, Deitch EA. Role of bacterial adherence and the mucus barrier on bacterial translocation: effects of protein malnutrition and endotoxin in rats. *Ann Surg* 1997;225(3):317-326.
- Kawahata H, Ohta H, Inoue M, Suzuki A. Endocrine disrupter nonylphenol and bisphenol A contamination in Okinawa and Ishigaki Islands, Japan--within coral reefs and adjacent river mouths. *Chemosphere* 2004;55(11):1519-1527.
- Kawano N, Koji T, Hishikawa Y, Murase K, Murata I, Kohno S. Identification and localization of estrogen receptor alpha- and beta-positive cells in adult male and female mouse intestine at various estrogen levels. *Histochem Cell Biol* 2004;121(5):399-405.
- Keita AV, Soderholm JD. The intestinal barrier and its regulation by neuroimmune factors. *Neurogastroenterol Motil*;22(7):718-733.
- Keita AV, Soderholm JD. The intestinal barrier and its regulation by neuroimmune factors. *Neurogastroenterol Motil* 2010;22(7):718-733.

- Kelly D, King T, Aminov R. Importance of microbial colonization of the gut in early life to the development of immunity. *Mutat Res* 2007;622(1-2):58-69.
- Konstantinopoulos PA, Kominea A, VANDOROS G, Sykiotis GP, Andricopoulos P, Varakis I, Sotiropoulou-Bonikou G, Papavassiliou AG. Oestrogen receptor beta (ERbeta) is abundantly expressed in normal colonic mucosa, but declines in colon adenocarcinoma paralleling the tumour's dedifferentiation. *Eur J Cancer* 2003;39(9):1251-1258.
- Kozono D, Yasui M, King LS, Agre P. Aquaporin water channels: atomic structure molecular dynamics meet clinical medicine. *J Clin Invest* 2002;109(11):1395-1399.
- Kubo K, Arai O, Omura M, Watanabe R, Ogata R, Aou S. Low dose effects of bisphenol A on sexual differentiation of the brain and behavior in rats. *Neurosci Res* 2003;45(3):345-356.
- Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 1997;138(3):863-870.
- Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(12):5925-5930.
- Kumar V, Green S, Stack G, Berry M, Jin JR, Chambon P. Functional domains of the human estrogen receptor. *Cell* 1987;51(6):941-951.
- Kurebayashi H, Nagatsuka S, Nemoto H, Noguchi H, Ohno Y. Disposition of low doses of ¹⁴C-bisphenol A in male, female, pregnant, fetal, and neonatal rats. *Arch Toxicol* 2005;79(5):243-252.
- Kuruto-Niwa R, Tateoka Y, Usuki Y, Nozawa R. Measurement of bisphenol A concentrations in human colostrum. *Chemosphere* 2007;66(6):1160-1164.

L

- Lakind JS, Naiman DQ. Bisphenol A (BPA) daily intakes in the United States: estimates from the 2003-2004 NHANES urinary BPA data. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 2008;18(6):608-615.
- Lang IA, Galloway TS, Scarlett A, Henley WE, Depledge M, Wallace RB, Melzer D. Association of urinary bisphenol A concentration with medical disorders and laboratory abnormalities in adults. *JAMA* 2008;300(11):1303-1310.
- Laukoetter MG, Nava P, Lee WY, Severson EA, Capaldo CT, Babbin BA, Williams IR, Koval M, Peatman E, Campbell JA, Dermody TS, Nusrat A, Parkos CA. JAM-A regulates permeability and inflammation in the intestine in vivo. *J Exp Med* 2007;204(13):3067-3076.

- Le Romancer M, Treilleux I, Leconte N, Robin-Lespinasse Y, Sentis S, Bouchekioua-Bouzaghrou K, Goddard S, Gobert-Gosse S, Corbo L. Regulation of estrogen rapid signaling through arginine methylation by PRMT1. *Mol Cell* 2008;31(2):212-221.
- Lee HJ, Chattopadhyay S, Gong EY, Ahn RS, Lee K. Antiandrogenic effects of bisphenol A and nonylphenol on the function of androgen receptor. *Toxicol Sci* 2003;75(1):40-46.
- Lee YJ, Ryu HY, Kim HK, Min CS, Lee JH, Kim E, Nam BH, Park JH, Jung JY, Jang DD, Park EY, Lee KH, Ma JY, Won HS, Im MW, Leem JH, Hong YC, Yoon HS. Maternal and fetal exposure to bisphenol A in Korea. *Reprod Toxicol* 2008;25(4):413-419.
- Leranth C, Hajszan T, Szigeti-Buck K, Bober J, MacLusky NJ. Bisphenol A prevents the synaptogenic response to estradiol in hippocampus and prefrontal cortex of ovariectomized nonhuman primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105(37):14187-14191.
- Li D, Zhou Z, Qing D, He Y, Wu T, Miao M, Wang J, Weng X, Ferber JR, Herrinton LJ, Zhu Q, Gao E, Checkoway H, Yuan W. Occupational exposure to bisphenol-A (BPA) and the risk of self-reported male sexual dysfunction. *Hum Reprod* 2010;25(2):519-527.
- Li L, Fan X, Warner M, Xu XJ, Gustafsson JA, Wiesenfeld-Hallin Z. Ablation of estrogen receptor alpha or beta eliminates sex differences in mechanical pain threshold in normal and inflamed mice. *Pain* 2009a;143(1-2):37-40.
- Li MW, Mruk DD, Lee WM, Cheng CY. Disruption of the blood-testis barrier integrity by bisphenol A in vitro: is this a suitable model for studying blood-testis barrier dynamics? *Int J Biochem Cell Biol* 2009b;41(11):2302-2314.
- Lievertz RW. Pharmacology and pharmacokinetics of estrogens. *Am J Obstet Gynecol* 1987;156(5):1289-1293.
- Lim DS, Kwack SJ, Kim KB, Kim HS, Lee BM. Risk assessment of bisphenol A migrated from canned foods in Korea. *J Toxicol Environ Health A* 2009;72(21-22):1327-1335.
- Loftus EV, Jr. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology* 2004;126(6):1504-1517.
- Longstreth GF, Thompson WG, Chey WD, Houghton LA, Mearin F, Spiller RC. Functional bowel disorders. *Gastroenterology* 2006;130(5):1480-1491.
- Losel RM, Falkenstein E, Feuring M, Schultz A, Tillmann HC, Rossol-Haseroth K, Wehling M. Nongenomic steroid action: controversies, questions, and answers. *Physiol Rev* 2003;83(3):965-1016.

Lu CL, Hsieh JC, Tsaor ML, Huang YH, Wang PS, Wu LL, Liu PY, Chang FY, Lee SD. Estrogen rapidly modulates mustard oil-induced visceral hypersensitivity in conscious female rats: A role of CREB phosphorylation in spinal dorsal horn neurons. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007;292(1):G438-446.

M

Ma T, Verkman AS. Aquaporin water channels in gastrointestinal physiology. *J Physiol* 1999;517 (Pt 2):317-326.

Maaser C, Eckmann L, Paesold G, Kim HS, Kagnoff MF. Ubiquitous production of macrophage migration inhibitory factor by human gastric and intestinal epithelium. *Gastroenterology* 2002;122(3):667-680.

Mahalingaiah S, Meeker JD, Pearson KR, Calafat AM, Ye X, Petrozza J, Hauser R. Temporal variability and predictors of urinary bisphenol A concentrations in men and women. *Environ Health Perspect* 2008;116(2):173-178.

Mankertz J, Schulzke JD. Altered permeability in inflammatory bowel disease: pathophysiology and clinical implications. *Curr Opin Gastroenterol* 2007;23(4):379-383.

Mannan MA, O'Shaughnessy PJ. Steroidogenesis during postnatal development in the mouse ovary. *J Endocrinol* 1991;130(1):101-106.

Marchiando AM, Graham WV, Turner JR. Epithelial barriers in homeostasis and disease. *Annu Rev Pathol* 2010;5:119-144.

Markey CM, Luque EH, Munoz De Toro M, Sonnenschein C, Soto AM. In utero exposure to bisphenol A alters the development and tissue organization of the mouse mammary gland. *Biol Reprod* 2001;65(4):1215-1223.

Markey CM, Wadia PR, Rubin BS, Sonnenschein C, Soto AM. Long-term effects of fetal exposure to low doses of the xenoestrogen bisphenol-A in the female mouse genital tract. *Biol Reprod* 2005;72(6):1344-1351.

Markov AG, Veshnyakova A, Fromm M, Amasheh M, Amasheh S. Segmental expression of claudin proteins correlates with tight junction barrier properties in rat intestine. *J Comp Physiol B* 2010;180(4):591-598.

Martensson UE, Salehi SA, Windahl S, Gomez MF, Sward K, Daszkiewicz-Nilsson J, Wendt A, Andersson N, Hellstrand P, Grande PO, Owman C, Rosen CJ, Adamo ML, Lundquist I, Rorsman P, Nilsson BO, Ohlsson C, Olde B, Leeb-Lundberg LM. Deletion of the G protein-coupled receptor 30 impairs glucose tolerance, reduces bone growth, increases blood pressure, and eliminates estradiol-stimulated insulin release in female mice. *Endocrinology* 2009;150(2):687-698.

Masyuk AI, Marinelli RA, LaRusso NF. Water transport by epithelia of the digestive tract. *Gastroenterology* 2002;122(2):545-562.

- Matsuzaki T, Tajika Y, Ablimit A, Aoki T, Hagiwara H, Takata K. Aquaporins in the digestive system. *Med Electron Microsc* 2004;37(2):71-80.
- Mazaud Guittot S, Guigon CJ, Coudouel N, Magre S. Consequences of fetal irradiation on follicle histogenesis and early follicle development in rat ovaries. *Biol Reprod* 2006;75(5):749-759.
- Meeker JD, Ehrlich S, Toth TL, Wright DL, Calafat AM, Trisini AT, Ye X, Hauser R. Semen quality and sperm DNA damage in relation to urinary bisphenol A among men from an infertility clinic. *Reprod Toxicol* 2010.
- Meier R, Beglinger C, Dederding JP, Meyer-Wyss B, Fumagalli M, Rowedder A, Turberg Y, Brignoli R. Influence of age, gender, hormonal status and smoking habits on colonic transit time. *Neurogastroenterol Motil* 1995;7(4):235-238.
- Melzer D, Rice NE, Lewis C, Henley WE, Galloway TS. Association of urinary bisphenol a concentration with heart disease: evidence from NHANES 2003/06. *PLoS One* 2010;5(1):e8673.
- Metcalf DD, Baram D, Mekori YA. Mast cells. *Physiol Rev* 1997;77(4):1033-1079.
- Michell AR. Fluid and electrolyte excretion in sheep: comparison of the effect of reduced food and water intake with oestrus. *Q J Exp Physiol* 1981;66(4):515-524.
- Mielke H, Gundert-Remy U. Bisphenol A levels in blood depend on age and exposure. *Toxicol Lett* 2009;190(1):32-40.
- Milligan SR, Khan O, Nash M. Competitive binding of xenobiotic oestrogens to rat alpha-fetoprotein and to sex steroid binding proteins in human and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) plasma. *Gen Comp Endocrinol* 1998;112(1):89-95.
- Miyawaki J, Sakayama K, Kato H, Yamamoto H, Masuno H. Perinatal and postnatal exposure to bisphenol a increases adipose tissue mass and serum cholesterol level in mice. *J Atheroscler Thromb* 2007;14(5):245-252.
- Mo R, Chen J, Grolleau-Julius A, Murphy HS, Richardson BC, Yung RL. Estrogen regulates CCR gene expression and function in T lymphocytes. *J Immunol* 2005;174(10):6023-6029.
- Mobasher A, Marples D. Expression of the AQP-1 water channel in normal human tissues: a semiquantitative study using tissue microarray technology. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;286(3):C529-537.
- Montano MM, Welshons WV, vom Saal FS. Free estradiol in serum and brain uptake of estradiol during fetal and neonatal sexual differentiation in female rats. *Biol Reprod* 1995;53(5):1198-1207.
- Morita K, Furuse M, Fujimoto K, Tsukita S. Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(2):511-516.

- Moriyama K, Tagami T, Akamizu T, Usui T, Saijo M, Kanamoto N, Hataya Y, Shimatsu A, Kuzuya H, Nakao K. Thyroid hormone action is disrupted by bisphenol A as an antagonist. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87(11):5185-5190.
- Morris GP, Fallone CA, Pringle GC, MacNaughton WK. Gastric cytoprotection is secondary to increased mucosal fluid secretion: a study of six cytoprotective agents in the rat. *J Clin Gastroenterol* 1998;27 Suppl 1:S53-63.
- Muller-Lissner SA, Bollani S, Brummer RJ, Coremans G, Dapoigny M, Marshall JK, Muris JW, Oberndorff-Klein Wolthuis A, Pace F, Rodrigo L, Stockbrugger R, Vatn MH. Epidemiological aspects of irritable bowel syndrome in Europe and North America. *Digestion* 2001;64(3):200-204.
- Mullick AE, Walsh BA, Reiser KM, Rutledge JC. Chronic estradiol treatment attenuates stiffening, glycooxidation, and permeability in rat carotid arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;281(5):H2204-2210.
- Murakami H, Akbar SM, Matsui H, Onji M. Macrophage migration inhibitory factor in the sera and at the colonic mucosa in patients with ulcerative colitis: clinical implications and pathogenic significance. *Eur J Clin Invest* 2001;31(4):337-343.
- Murch SH, Braegger CP, Walker-Smith JA, MacDonald TT. Location of tumour necrosis factor alpha by immunohistochemistry in chronic inflammatory bowel disease. *Gut* 1993;34(12):1705-1709.
- Murch SH, Lamkin VA, Savage MO, Walker-Smith JA, MacDonald TT. Serum concentrations of tumour necrosis factor alpha in childhood chronic inflammatory bowel disease. *Gut* 1991;32(8):913-917.
- Muresan Z, Paul DL, Goodenough DA. Occludin 1B, a variant of the tight junction protein occludin. *Mol Biol Cell* 2000;11(2):627-634.

N

- Nagel SC, vom Saal FS, Welshons WV. Developmental effects of estrogenic chemicals are predicted by an in vitro assay incorporating modification of cell uptake by serum. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1999;69(1-6):343-357.
- Nanda K, Bastian LA, Hasselblad V, Simel DL. Hormone replacement therapy and the risk of colorectal cancer: a meta-analysis. *Obstet Gynecol* 1999;93(5 Pt 2):880-888.
- Neu J. Gastrointestinal maturation and implications for infant feeding. *Early Hum Dev* 2007;83(12):767-775.
- Newbold RR, Jefferson WN, Padilla-Banks E. Prenatal exposure to bisphenol a at environmentally relevant doses adversely affects the murine female reproductive tract later in life. *Environ Health Perspect* 2009;117(6):879-885.

-
- Newburg DS, Walker WA. Protection of the neonate by the innate immune system of developing gut and of human milk. *Pediatr Res* 2007;61(1):2-8.
- Nieuwenhuijs VB, Verheem A, van Duijvenbode-Beumer H, Visser MR, Verhoef J, Gooszen HG, Akkermans LM. The role of interdigestive small bowel motility in the regulation of gut microflora, bacterial overgrowth, and bacterial translocation in rats. *Ann Surg* 1998;228(2):188-193.
- Nikaido Y, Yoshizawa K, Danbara N, Tsujita-Kyutoku M, Yuri T, Uehara N, Tsubura A. Effects of maternal xenoestrogen exposure on development of the reproductive tract and mammary gland in female CD-1 mouse offspring. *Reprod Toxicol* 2004;18(6):803-811.
- Nishikawa M, Iwano H, Yanagisawa R, Koike N, Inoue H, Yokota H. Placental transfer of conjugated bisphenol A and subsequent reactivation in the rat fetus. *Environ Health Perspect* 2010;118(9):1196-1203.
- NTP. NTP-CERHR Monograph on the potential human reproductive and developmental effects of Bisphenol A. NIH Publication No. 08-5994. 2008.
- NTP. Update on Bisphenol A for Use in Food Contact Applications U.S. Food and Drug Administration. 2010.
- Nunez EA. Biological role of alpha-fetoprotein in the endocrinological field: data and hypotheses. *Tumour Biol* 1994;15(2):63-72.

O

- O'Mahony F, Alzamora R, Betts V, LaPaix F, Carter D, Imaten M, Harvey BJ. Female gender-specific inhibition of KCNQ1 channels and chloride secretion by 17beta-estradiol in rat distal colonic crypts. *J Biol Chem* 2007;282(34):24563-24573.
- O'Mahony F, Alzamora R, Chung HL, Thomas W, Harvey BJ. Genomic priming of the antisecretory response to estrogen in rat distal colon throughout the estrous cycle. *Mol Endocrinol* 2009;23(11):1885-1899.
- O'Mahony F, Harvey BJ. Sex and estrous cycle-dependent rapid protein kinase signaling actions of estrogen in distal colonic cells. *Steroids* 2008;73(9-10):889-894.
- Oelkers WK. Effects of estrogens and progestogens on the renin-aldosterone system and blood pressure. *Steroids* 1996;61(4):166-171.
- Ohkawara T, Miyashita K, Nishihira J, Mitsuyama K, Takeda H, Kato M, Kondo N, Yamasaki Y, Sata M, Yoshiki T, Sugiyama T, Asaka M. Transgenic over-expression of macrophage migration inhibitory factor renders mice markedly more susceptible to experimental colitis. *Clin Exp Immunol* 2005;140(2):241-248.
- Ohkawara T, Nishihira J, Takeda H, Hige S, Kato M, Sugiyama T, Iwanaga T, Nakamura H, Mizue Y, Asaka M. Amelioration of dextran sulfate sodium-induced colitis by

anti-macrophage migration inhibitory factor antibody in mice. *Gastroenterology* 2002;123(1):256-270.

Olea N, Pulgar R, Perez P, Olea-Serrano F, Rivas A, Novillo-Fertrell A, Pedraza V, Soto AM, Sonnenschein C. Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. *Environ Health Perspect* 1996;104(3):298-305.

Otterbach F, Callies R, Adamzik M, Kimmig R, Siffert W, Schmid KW, Bankfalvi A. Aquaporin 1 (AQP1) expression is a novel characteristic feature of a particularly aggressive subgroup of basal-like breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 2010;120(1):67-76.

Otterbach F, Callies R, Kimmig R, Schmid KW, Bankfalvi A. [Aquaporin 1 expression in invasive breast carcinomas]. *Pathologie* 2008;29 Suppl 2:357-362.

P

Pabst O, Herbrand H, Worbs T, Friedrichsen M, Yan S, Hoffmann MW, Korner H, Bernhardt G, Pabst R, Forster R. Cryptopatches and isolated lymphoid follicles: dynamic lymphoid tissues dispensable for the generation of intraepithelial lymphocytes. *Eur J Immunol* 2005;35(1):98-107.

Pacha J. Development of intestinal transport function in mammals. *Physiol Rev* 2000;80(4):1633-1667.

Papadopoulos MC, Saadoun S, Verkman AS. Aquaporins and cell migration. *Pflugers Arch* 2008;456(4):693-700.

Papka RE, Storey-Workley M, Shughrue PJ, Merchenthaler I, Collins JJ, Usip S, Saunders PT, Shupnik M. Estrogen receptor-alpha and beta- immunoreactivity and mRNA in neurons of sensory and autonomic ganglia and spinal cord. *Cell Tissue Res* 2001;304(2):193-214.

Pedram A, Razandi M, Levin ER. Nature of functional estrogen receptors at the plasma membrane. *Mol Endocrinol* 2006;20(9):1996-2009.

Perez P, Pulgar R, Olea-Serrano F, Villalobos M, Rivas A, Metzler M, Pedraza V, Olea N. The estrogenicity of bisphenol A-related diphenylalkanes with various substituents at the central carbon and the hydroxy groups. *Environ Health Perspect* 1998;106(3):167-174.

Perez PF, Dore J, Leclerc M, Levenez F, Benyacoub J, Serrant P, Segura-Roggero I, Schiffrin EJ, Donnet-Hughes A. Bacterial imprinting of the neonatal immune system: lessons from maternal cells? *Pediatrics* 2007;119(3):e724-732.

Peters GA, Khan SA. Estrogen receptor domains E and F: role in dimerization and interaction with coactivator RIP-140. *Mol Endocrinol* 1999;13(2):286-296.

- Phiel KL, Henderson RA, Adelman SJ, Elloso MM. Differential estrogen receptor gene expression in human peripheral blood mononuclear cell populations. *Immunol Lett* 2005;97(1):107-113.
- Picard D, Yamamoto KR. Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *EMBO J* 1987;6(11):3333-3340.
- Piche T. [Alterations of intestinal epithelial barrier and flora in the irritable bowel syndrome]. *Gastroenterol Clin Biol* 2009;33 Suppl 1:S40-47.
- Platt AM, Mowat AM. Mucosal macrophages and the regulation of immune responses in the intestine. *Immunol Lett* 2008;119(1-2):22-31.
- Pottenger LH, Domoradzki JY, Markham DA, Hansen SC, Cagen SZ, Waechter JM, Jr. The relative bioavailability and metabolism of bisphenol A in rats is dependent upon the route of administration. *Toxicol Sci* 2000;54(1):3-18.
- Prasanth GK, Divya LM, Sadasivan C. Bisphenol-A can bind to human glucocorticoid receptor as an agonist: an in silico study. *J Appl Toxicol* 2010.

R

- Rahner C, Mitic LL, Anderson JM. Heterogeneity in expression and subcellular localization of claudins 2, 3, 4, and 5 in the rat liver, pancreas, and gut. *Gastroenterology* 2001;120(2):411-422.
- Ramirez-Lorca R, Vizuete ML, Venero JL, Revuelta M, Cano J, Ilundain AA, Echevarria M. Localization of aquaporin-3 mRNA and protein along the gastrointestinal tract of Wistar rats. *Pflugers Arch* 1999;438(1):94-100.
- Ramos JG, Varayoud J, Kass L, Rodriguez H, Costabel L, Munoz-De-Toro M, Luque EH. Bisphenol a induces both transient and permanent histofunctional alterations of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in prenatally exposed male rats. *Endocrinology* 2003;144(7):3206-3215.
- Reimund JM, Wittersheim C, Dumont S, Muller CD, Baumann R, Poindron P, Duclos B. Mucosal inflammatory cytokine production by intestinal biopsies in patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *J Clin Immunol* 1996;16(3):144-150.
- Rescigno M, Lopatin U, Chieppa M. Interactions among dendritic cells, macrophages, and epithelial cells in the gut: implications for immune tolerance. *Curr Opin Immunol* 2008;20(6):669-675.
- Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R, Granucci F, Kraehenbuhl JP, Ricciardi-Castagnoli P. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol* 2001;2(4):361-367.

- Richter CA, Birnbaum LS, Farabollini F, Newbold RR, Rubin BS, Talsness CE, Vandenberg JG, Walser-Kuntz DR, vom Saal FS. In vivo effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. *Reprod Toxicol* 2007;24(2):199-224.
- Rijnierse A, Koster AS, Nijkamp FP, Kraneveld AD. TNF-alpha is crucial for the development of mast cell-dependent colitis in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;291(5):G969-976.
- Ring JA, Ghabrial H, Ching MS, Smallwood RA, Morgan DJ. Fetal hepatic drug elimination. *Pharmacol Ther* 1999;84(3):429-445.
- Roger P, Sahla ME, Makela S, Gustafsson JA, Baldet P, Rochefort H. Decreased expression of estrogen receptor beta protein in proliferative preinvasive mammary tumors. *Cancer Res* 2001;61(6):2537-2541.
- Ropero AB, Alonso-Magdalena P, Garcia-Garcia E, Ripoll C, Fuentes E, Nadal A. Bisphenol-A disruption of the endocrine pancreas and blood glucose homeostasis. *Int J Androl* 2008;31(2):194-200.
- Rosenthal R, Milatz S, Krug SM, Oelrich B, Schulzke JD, Amasheh S, Gunzel D, Fromm M. Claudin-2, a component of the tight junction, forms a paracellular water channel. *J Cell Sci* 2010;123(Pt 11):1913-1921.
- Routledge EJ, White R, Parker MG, Sumpter JP. Differential effects of xenoestrogens on coactivator recruitment by estrogen receptor (ER) alpha and ERbeta. *J Biol Chem* 2000;275(46):35986-35993.
- Rubin BS, Murray MK, Damassa DA, King JC, Soto AM. Perinatal exposure to low doses of bisphenol A affects body weight, patterns of estrous cyclicity, and plasma LH levels. *Environ Health Perspect* 2001;109(7):675-680.
- Rudel RA, Brody JG, Spengler JD, Vallarino J, Geno PW, Sun G, Yau A. Identification of selected hormonally active agents and animal mammary carcinogens in commercial and residential air and dust samples. *J Air Waste Manag Assoc* 2001;51(4):499-513.

S

- Saadoun S, Papadopoulos MC, Hara-Chikuma M, Verkman AS. Impairment of angiogenesis and cell migration by targeted aquaporin-1 gene disruption. *Nature* 2005;434(7034):786-792.
- Saitou M, Furuse M, Sasaki H, Schulzke JD, Fromm M, Takano H, Noda T, Tsukita S. Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol Biol Cell* 2000;11(12):4131-4142.
- Sakamoto H, Yokota H, Kibe R, Sayama Y, Yuasa A. Excretion of bisphenol A-glucuronide into the small intestine and deconjugation in the cecum of the rat. *Biochim Biophys Acta* 2002;1573(2):171-176.

- Salzman NH, Underwood MA, Bevins CL. Paneth cells, defensins, and the commensal microbiota: a hypothesis on intimate interplay at the intestinal mucosa. *Semin Immunol* 2007;19(2):70-83.
- Sanoja R, Cervero F. Estrogen-dependent abdominal hyperalgesia induced by ovariectomy in adult mice: a model of functional abdominal pain. *Pain* 2005;118(1-2):243-253.
- Schulzke JD, Gitter AH, Mankertz J, Spiegel S, Seidler U, Amasheh S, Saitou M, Tsukita S, Fromm M. Epithelial transport and barrier function in occludin-deficient mice. *Biochim Biophys Acta* 2005;1669(1):34-42.
- Seibel J, Molzberger AF, Hertrampf T, Laudenbach-Leschowski U, Degen GH, Diel P. In utero and postnatal exposure to a phytoestrogen-enriched diet increases parameters of acute inflammation in a rat model of TNBS-induced colitis. *Arch Toxicol* 2008;82(12):941-950.
- Seibel J, Molzberger AF, Hertrampf T, Laudenbach-Leschowski U, Diel P. Oral treatment with genistein reduces the expression of molecular and biochemical markers of inflammation in a rat model of chronic TNBS-induced colitis. *Eur J Nutr* 2009;48(4):213-220.
- Sener G, Arbak S, Kurtaran P, Gedik N, Yegen BC. Estrogen protects the liver and intestines against sepsis-induced injury in rats. *J Surg Res* 2005;128(1):70-78.
- Shughrue PJ, Lane MV, Merchenthaler I. Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 1997;388(4):507-525.
- Silberstein C, Kierbel A, Amodeo G, Zotta E, Bigi F, Berkowski D, Ibarra C. Functional characterization and localization of AQP3 in the human colon. *Braz J Med Biol Res* 1999;32(10):1303-1313.
- Simon DB, Lu Y, Choate KA, Velazquez H, Al-Sabban E, Praga M, Casari G, Bettinelli A, Colussi G, Rodriguez-Soriano J, McCredie D, Milford D, Sanjad S, Lifton RP. Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg²⁺ resorption. *Science* 1999;285(5424):103-106.
- Sklar MM, Thomas CL, Municchi G, Roberts CT, Jr., LeRoith D, Kiess W, Nissley P. Developmental expression of rat insulin-like growth factor-II/mannose 6-phosphate receptor messenger ribonucleic acid. *Endocrinology* 1992;130(6):3484-3491.
- Smith PD, Ochsenbauer-Jambor C, Smythies LE. Intestinal macrophages: unique effector cells of the innate immune system. *Immunol Rev* 2005;206:149-159.
- Sohoni P, Sumpter JP. Several environmental oestrogens are also anti-androgens. *J Endocrinol* 1998;158(3):327-339.
- Somm E, Schwitzgebel VM, Toulotte A, Cederroth CR, Combescure C, Nef S, Aubert ML, Huppi PS. Perinatal exposure to bisphenol a alters early adipogenesis in the rat. *Environ Health Perspect* 2009;117(10):1549-1555.

- Spahn TW, Kucharzik T. Modulating the intestinal immune system: the role of lymphotoxin and GALT organs. *Gut* 2004;53(3):456-465.
- Spiller R, Aziz Q, Creed F, Emmanuel A, Houghton L, Hungin P, Jones R, Kumar D, Rubin G, Trudgill N, Whorwell P. Guidelines on the irritable bowel syndrome: mechanisms and practical management. *Gut* 2007;56(12):1770-1798.
- Spooner MF, Robichaud P, Carrier JC, Marchand S. Endogenous pain modulation during the formalin test in estrogen receptor beta knockout mice. *Neuroscience* 2007;150(3):675-680.
- Staley K, Scharfman H. A woman's prerogative. *Nat Neurosci* 2005;8(6):697-699.
- Stevenson JC. A new hormone replacement therapy containing a progestogen with anti-mineralocorticoid activity. *J Br Menopause Soc* 2006;12 Suppl 1:8-10.
- Strolin Benedetti M, Baltes EL. Drug metabolism and disposition in children. *Fundam Clin Pharmacol* 2003;17(3):281-299.
- Sugita-Konishi Y, Shimura S, Nishikawa T, Sunaga F, Naito H, Suzuki Y. Effect of Bisphenol A on non-specific immunodefenses against non-pathogenic *Escherichia coli*. *Toxicol Lett* 2003;136(3):217-227.
- Sun Y, Irie M, Kishikawa N, Wada M, Kuroda N, Nakashima K. Determination of bisphenol A in human breast milk by HPLC with column-switching and fluorescence detection. *Biomed Chromatogr* 2004;18(8):501-507.
- Swezey N, Tchepichev S, Gagnon S, Fertuck K, O'Brodivich H. Female gender hormones regulate mRNA levels and function of the rat lung epithelial Na channel. *Am J Physiol* 1998;274(2 Pt 1):C379-386.

T

- Takeuchi T, Tsutsumi O, Ikezuki Y, Takai Y, Taketani Y. Positive relationship between androgen and the endocrine disruptor, bisphenol A, in normal women and women with ovarian dysfunction. *Endocr J* 2004;51(2):165-169.
- Takeyama J, Suzuki T, Inoue S, Kaneko C, Nagura H, Harada N, Sasano H. Expression and cellular localization of estrogen receptors alpha and beta in the human fetus. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(5):2258-2262.
- Tamura A, Kitano Y, Hata M, Katsuno T, Moriwaki K, Sasaki H, Hayashi H, Suzuki Y, Noda T, Furuse M, Tsukita S. Megaintestine in claudin-15-deficient mice. *Gastroenterology* 2008;134(2):523-534.
- Taub E, Cuevas JL, Cook EW, 3rd, Crowell M, Whitehead WE. Irritable bowel syndrome defined by factor analysis. Gender and race comparisons. *Dig Dis Sci* 1995;40(12):2647-2655.

- Taylor JA, Vom Saal FS, Welshons WV, Drury B, Rottinghaus G, Hunt PA, Vandervoort CA. Similarity of Bisphenol A Pharmacokinetics in Rhesus Monkeys and Mice: Relevance for Human Exposure. *Environ Health Perspect* 2010.
- Thiagarajah JR, Zhao D, Verkman AS. Impaired enterocyte proliferation in aquaporin-3 deficiency in mouse models of colitis. *Gut* 2007;56(11):1529-1535.
- Thomas ML, Xu X, Norfleet AM, Watson CS. The presence of functional estrogen receptors in intestinal epithelial cells. *Endocrinology* 1993;132(1):426-430.
- 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;102(1-5):175-179.
- Timmer A, Sutherland LR, Martin F. Oral contraceptive use and smoking are risk factors for relapse in Crohn's disease. The Canadian Mesalamine for Remission of Crohn's Disease Study Group. *Gastroenterology* 1998;114(6):1143-1150.
- Timms BG, Howdeshell KL, Barton L, Bradley S, Richter CA, vom Saal FS. Estrogenic chemicals in plastic and oral contraceptives disrupt development of the fetal mouse prostate and urethra. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(19):7014-7019.
- Tsukita S, Furuse M, Itoh M. Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2(4):285-293.
- Turner JR. Molecular basis of epithelial barrier regulation: from basic mechanisms to clinical application. *Am J Pathol* 2006;169(6):1901-1909.
- Turner JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol* 2009;9(11):799-809.

V

- Van Itallie C, Rahner C, Anderson JM. Regulated expression of claudin-4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability. *J Clin Invest* 2001;107(10):1319-1327.
- Vandenberg LN, Hauser R, Marcus M, Olea N, Welshons WV. Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reprod Toxicol* 2007a;24(2):139-177.
- Vandenberg LN, Maffini MV, Sonnenschein C, Rubin BS, Soto AM. Bisphenol-A and the great divide: a review of controversies in the field of endocrine disruption. *Endocr Rev* 2009;30(1):75-95.
- Vandenberg LN, Maffini MV, Wadia PR, Sonnenschein C, Rubin BS, Soto AM. Exposure to environmentally relevant doses of the xenoestrogen bisphenol-A alters development of the fetal mouse mammary gland. *Endocrinology* 2007b;148(1):116-127.

- Varayoud J, Ramos JG, Bosquiazzo VL, Munoz-de-Toro M, Luque EH. Developmental exposure to Bisphenol a impairs the uterine response to ovarian steroids in the adult. *Endocrinology* 2008;149(11):5848-5860.
- Verdu EF, Deng Y, Bercik P, Collins SM. Modulatory effects of estrogen in two murine models of experimental colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;283(1):G27-36.
- Verkman AS. Aquaporins: translating bench research to human disease. *J Exp Biol* 2009;212(Pt 11):1707-1715.
- Vetrano S, Danese S. The role of JAM-A in inflammatory bowel disease: unrevealing the ties that bind. *Ann N Y Acad Sci* 2009;1165:308-313.
- Vetrano S, Rescigno M, Cera MR, Correale C, Rumio C, Doni A, Fantini M, Sturm A, Borroni E, Repici A, Locati M, Malesci A, Dejana E, Danese S. Unique role of junctional adhesion molecule-a in maintaining mucosal homeostasis in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2008;135(1):173-184.
- Vivacqua A, Bonofiglio D, Recchia AG, Musti AM, Picard D, Ando S, Maggiolini M. The G protein-coupled receptor GPR30 mediates the proliferative effects induced by 17beta-estradiol and hydroxytamoxifen in endometrial cancer cells. *Mol Endocrinol* 2006;20(3):631-646.
- Volkel W, Colnot T, Csanady GA, Filser JG, Dekant W. Metabolism and kinetics of bisphenol a in humans at low doses following oral administration. *Chem Res Toxicol* 2002;15(10):1281-1287.
- vom Saal FS, Cooke PS, Buchanan DL, Palanza P, Thayer KA, Nagel SC, Parmigiani S, Welshons WV. A physiologically based approach to the study of bisphenol A and other estrogenic chemicals on the size of reproductive organs, daily sperm production, and behavior. *Toxicol Ind Health* 1998;14(1-2):239-260.
- vom Saal FS, Hughes C. An extensive new literature concerning low-dose effects of bisphenol A shows the need for a new risk assessment. *Environ Health Perspect* 2005;113(8):926-933.
- Vom Saal FS, Moyer CL. Prenatal effects on reproductive capacity during aging in female mice. *Biol Reprod* 1985;32(5):1116-1126.

W

- Wada-Hiraike O, Imamov O, Hiraike H, Hultenby K, Schwend T, Omoto Y, Warner M, Gustafsson JA. Role of estrogen receptor beta in colonic epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(8):2959-2964.
- Wagner CL, Taylor SN, Johnson D. Host factors in amniotic fluid and breast milk that contribute to gut maturation. *Clin Rev Allergy Immunol* 2008;34(2):191-204.

- Walter P, Green S, Greene G, Krust A, Bornert JM, Jeltsch JM, Staub A, Jensen E, Scrace G, Waterfield M, et al. Cloning of the human estrogen receptor cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82(23):7889-7893.
- Watanabe S, Wang RS, Miyagawa M, Kobayashi K, Suda M, Sekiguchi S, Honma T. Imbalance of testosterone level in male offspring of rats perinatally exposed to bisphenol A. *Ind Health* 2003;41(4):338-341.
- Watson CS, Bulayeva NN, Wozniak AL, Alyea RA. Xenoestrogens are potent activators of nongenomic estrogenic responses. *Steroids* 2007;72(2):124-134.
- Welshons WV, Nagel SC, vom Saal FS. Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure. *Endocrinology* 2006;147(6 Suppl):S56-69.
- Weniger JP. Estrogen production by fetal rat gonads. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1993;44(4-6):459-462.
- Westwood FR. The female rat reproductive cycle: a practical histological guide to staging. *Toxicol Pathol* 2008;36(3):375-384.
- Will C, Fromm M, Muller D. Claudin tight junction proteins: novel aspects in paracellular transport. *Perit Dial Int* 2008;28(6):577-584.
- Wray S, Noble K. Sex hormones and excitation-contraction coupling in the uterus: the effects of oestrous and hormones. *J Neuroendocrinol* 2008;20(4):451-461.

X

- Xiao ZL, Pricolo V, Biancani P, Behar J. Role of progesterone signaling in the regulation of G-protein levels in female chronic constipation. *Gastroenterology* 2005;128(3):667-675.

Y

- Yang GS, Wang Y, Wang P, Chen ZD. Expression of oestrogen receptor-alpha and oestrogen receptor-beta in prostate cancer. *Chin Med J (Engl)* 2007;120(18):1611-1615.
- Yang L, Hu Y, Hou Y. Effects of 17beta-estradiol on the maturation, nuclear factor kappa B p65 and functions of murine spleen CD11c-positive dendritic cells. *Mol Immunol* 2006;43(4):357-366.
- Ye L, Martin TA, Parr C, Harrison GM, Mansel RE, Jiang WG. Biphasic effects of 17-beta-estradiol on expression of occludin and transendothelial resistance and paracellular permeability in human vascular endothelial cells. *J Cell Physiol* 2003;196(2):362-369.

-
- Ye X, Kuklennyik Z, Needham LL, Calafat AM. Measuring environmental phenols and chlorinated organic chemicals in breast milk using automated on-line column-switching-high performance liquid chromatography-isotope dilution tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2006;831(1-2):110-115.
- Ye X, Pierik FH, Angerer J, Meltzer HM, Jaddoe VW, Tiemeier H, Hoppin JA, Longnecker MP. Levels of metabolites of organophosphate pesticides, phthalates, and bisphenol A in pooled urine specimens from pregnant women participating in the Norwegian Mother and Child Cohort Study (MoBa). *Int J Hyg Environ Health* 2009;212(5):481-491.
- Ylikomi T, Wurtz JM, Syvala H, Passinen S, Pekki A, Haverinen M, Blauer M, Tuohimaa P, Gronemeyer H. Reappraisal of the role of heat shock proteins as regulators of steroid receptor activity. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1998;33(6):437-466.
- Yoshida T, Horie M, Hoshino Y, Nakazawa H. Determination of bisphenol A in canned vegetables and fruit by high performance liquid chromatography. *Food Addit Contam* 2001;18(1):69-75.
- Young GP, Taranto TM, Jonas HA, Cox AJ, Hogg A, Werther GA. Insulin-like growth factors and the developing and mature rat small intestine: receptors and biological actions. *Digestion* 1990;46 Suppl 2:240-252.

Z

- Zalko D, Jacques C, Duplan H, Bruel S, Perdu E. Viable skin efficiently absorbs and metabolizes bisphenol A. *Chemosphere* 2010.
- Zalko D, Soto AM, Dolo L, Dorio C, Rathahao E, Debrauwer L, Faure R, Cravedi JP. Biotransformations of bisphenol A in a mammalian model: answers and new questions raised by low-dose metabolic fate studies in pregnant CD1 mice. *Environ Health Perspect* 2003;111(3):309-319.
- Zeissig S, Burgel N, Gunzel D, Richter J, Mankertz J, Wahnschaffe U, Kroesen AJ, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD. Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut* 2007;56(1):61-72.

AUTEUR : Viorica BRANISTE

TITRE : LA BARRIERE INTESTINALE, UNE NOUVELLE CIBLE DES OESTROGENES
ET DES XENOESTROGENES : LE CAS DU BISPHENOL A

La barrière intestinale est la plus grande surface de contact entre le milieu extérieur et le milieu intérieur. Elle est également la première surface exposée à tout élément ingéré par voie orale. Outre ses fonctions d'absorption et de maintien de l'équilibre hydrique de l'organisme, elle exerce un rôle important de défense contre les agents délétères (toxines, bactéries) contenus dans la lumière intestinale. En conditions physiologiques, la barrière intestinale assure une perméabilité sélective permettant le passage de petites quantités d'antigènes afin de stimuler le système immunitaire et d'empêcher le développement d'une inflammation (tolérance de la flore commensale et reconnaissance des antigènes alimentaires).

Dans un premier temps, nous avons montré une modulation de la perméabilité de la barrière épithéliale intestinale chez la rate au cours du cycle sexuel. Plus particulièrement, la dominance des œstrogènes plasmatiques en phase folliculaire du cycle s'accompagne d'une réduction de la perméabilité paracellulaire colique. Cette diminution oestrogéno-dépendante du transport paracellulaire implique la voie de signalisation ER β dans les cellules épithéliales et une surexpression d'occludine et de JAM-A, deux protéines transmembranaires des jonctions serrées contrôlant les espaces intercellulaires. Cette propriété des oestrogènes est intéressante à considérer dans les pathologies associées à une hyperperméabilité intestinale, telle que le Syndrome de l'Intestin Irritable ou Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin, où la voie de signalisation ER β peut être envisagée comme cible thérapeutique.

Dans un deuxième temps, nous avons mis en évidence que le BPA, un contaminant oestrogéno-mimétique largement exploité dans l'industrie des emballages alimentaires, affecte la perméabilité de l'épithélium intestinal. Cet effet observé chez l'animal et sur des lignées de cellules épithéliales intestinales humaines passe par l'activation des ERs présents dans les cellules épithéliales. Il en résulte une augmentation de la synthèse d'occludine et de JAM-A, donc le rétrécissement des espaces intercellulaires, limitant les échanges naturels au niveau de la paroi du tube digestif et pouvant favoriser la rétention d'eau dans le corps. Le BPA présente également un impact sur la réponse inflammatoire dans le côlon adulte et rend l'intestin plus sensible à la douleur. Nos résultats ont également montré qu'une exposition *in utero* et pendant l'allaitement au BPA augmentait le risque de développer une inflammation intestinale sévère à l'âge adulte, essentiellement dans la descendance femelle. Cette fragilité dans la fonction de barrière biologique de l'intestin serait la conséquence d'une maturation imparfaite du système immunitaire associé aux muqueuses intestinales. Nous émettons l'hypothèse que l'exposition périnatale au BPA pourrait freiner le développement des défenses immunitaires intestinales, naïves à la naissance, rendant les muqueuses coliques chez la femelle plus vulnérables face à un stimulus inflammatoire.

MOTS CLES : Barrière intestinale, épithélium, perméabilité, jonctions serrées, oestradiol, récepteurs aux oestrogènes, xénoestrogènes, Bisphénol A.

DISCIPLINE : Pathologie, Toxicologie, Génétique & Nutrition

DIRECTEURS DE THESE : Dr. Jean FIORAMONTI et Dr. Eric HOUDEAU

INRA, Unité de Neuro-Gastroentérologie & Nutrition ; 180, chemin de Tournefeuille BP3 ; 31931 Toulouse Cedex 3