

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

Discipline ou spécialité :

Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition

Présentée et soutenue par :

M. YANN MALAISÉ

le mardi 28 novembre 2017

Titre :

Caractérisation chez la souris adulte des impacts immuno-modulateurs des bisphénols après exposition périnatale: conséquences sur la fonction "barrière" de l'intestin et la susceptibilité aux désordres métaboliques

---

Ecole doctorale :

Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)

Unité de recherche :

Toxicologie Alimentaire (ToxAlim)

Directeur(s) de Thèse :

MME LAURENCE GUZYLACK

M. ERIC HOUDEAU

Rapporteurs :

Mme LYDIE SPARFEL-BERLIVET, UNIVERSITE RENNES 1

Mme MARIE-CHRISTINE CHAGNON, AGROSUP DIJON

Membre(s) du jury :

Mme ISABELLE CASTAN, INSERM MIDI PYRENEES, Président

M. ERIC HOUDEAU, INRA TOULOUSE, Membre

Mme LAURENCE GUZYLACK, INRA TOULOUSE, Membre

M. REMY BURCELIN, UNIVERSITE TOULOUSE 3, Membre

« Pourquoi tombons-nous ? C'est pour mieux apprendre à nous relever. »

« Qui que nous soyons au fond de nous, nous ne sommes jugés que par nos actes. »

A mon arrière-grand-mère, ma mère, mon père et mon frère

Les travaux de cette thèse ont été réalisés au sein de l'unité Toxalim UMR1331 et financés par le département AlimH, la région Midi-Pyrénées et l'ANSES que je remercie vivement.

Je souhaite tout d'abord remercier les membres de mon jury de thèse, **Rémy Burcelin**, **Marie-Christine Chagnon**, **Lydie Sparfel-Berlivet** et la professeur **Isabelle Castan** pour avoir accepté d'évaluer ce travail.

Je présente également mes remerciements aux membres de mon comité de thèse, **Sonia Lamande** et **Frédérick Barreau** pour leurs échanges constructifs et leur sympathie.

ToxAlim est vraiment un laboratoire formidable où j'ai pu échanger avec de très nombreuses personnes conviviales. Je ne peux malheureusement pas remercier toutes les personnes comme je le voudrais car je devrais probablement rédiger une 2ème thèse mais connaissant désormais quasiment toutes les personnes de ToxAlim, j'aimerais les remercier de manière générale pour n'oublier personne. Merci à vous.

Je souhaite tout particulièrement remercier mes deux directeurs de thèse **Eric Houdeau** et **Laurence Guzylack-Piriou**.

Merci **Eric** pour tous tes conseils avisés sur la toxicologie et tes nombreuses idées sur l'études des perturbateurs endocriniens. Merci également pour ta sympathie.

Merci à toi **Laurence**. Tu m'as tout appris. Aussi bien pour l'immuno, l'expérimentation animale, l'écriture d'article et j'en passe… Je sais que ça n'a pas toujours été facile entre nous car nous sommes tous les 2 aussi têtu qu'une mule et nous n'avons pas la même façon de travailler, mais tu as su rester patiente et je te remercie de m'avoir accepté comme je suis. Tu es une personne bosseuse et méritante que je respecte énormément et avec qui j'ai eu plaisir à discuter et échanger mes idées. Encore merci, tu es super.

J'aimerais remercier les membres des différentes plate-forme qui m'ont aidé et soutenu dans ce travail de thèse : **Thierry Gauthier** du plateau M2C pour tous ses conseils professionnels sur la cytométrie, **Yannick Lippi** et **Claire Naylies** du plateau Get-Trix pour leur aide dans ma formation et l'analyse des résultats de Q-PCR (le robot n'aura pas eu raison de moi ! ^^) et **Caroline Sommer** du plateau EZOP pour son aide à l'animalerie et ses supers blagues qui vont énormément me manquer (hé ! A mardi ! ^^).

Je vais continuer en remerciant les autres membres de mon équipe.

Merci à toi **Christel Cartier**. Tu es une vraie crème, toujours avec le sourire et j'ai adoré maniper, rigoler et discuter avec toi. Ne change pas, tu es parfaite.

Merci à **Eric Gaultier**, collègue de bureau avec qui j'ai rigolé durant mes nombreux craquages au bureau. Merci pour ton aide précieuse pendant les abattages et tes connaissances illimitées en expérimentation animale. Je sais que je t'ai sollicité de nombreuses fois pour des tâches un peu ingrates et je m'en excuse. Tu es le vrai patron d'EZOP ^^.

J'aimerai remercier **Caroline Kerbiriou** qui m'a bien aidé durant son stage et avec qui j'ai eu plaisir à échanger mes théories.

Je voudrais remercier tous les membres de l'équipe 4 NGN, équipe voisine de la mienne.

Merci à **Vassilia Theodourou** avec qui j'ai pu discuter de nombreuses fois et qui m'a souvent rassuré lorsque les situations étaient un peu critiques.

Merci à **Maïwenn Olier** qui est elle aussi une vraie crème et la voix de la sagesse. Tu m'auras quasiment tout appris en microbio et je ne te remercierai jamais assez pour toutes les discussions et tes conseils sur l'étude du microbiote intestinal.

Merci à **Hervé Robert** pour son expertise également en microbio et avec qui j'ai pu délirer durant les pauses café.

Merci à **Muriel Mercier** avec qui j'ai pu aussi discuter et rigoler de nombreuses fois.

Je remercie également **Christine Comera**, **Laurent Ferrier** et **Hélène Eutamène**.

Merci à **Catherine Beaufrand** et **Valérie Tondereau** qui m'auront vraiment fait rire aussi.

J'aimerai remercier très particulièrement **Corinne Lencina**, la reine des gâteaux et ma mère spirituelle dans le labo. On aura pu bien échanger, maniper et rigoler durant ces 3 années ! Je t'apprécie énormément et tu vas beaucoup me manquer. Les mots me manquent mais sache que tu es une personne formidable et tu resteras dans mon cœur.

Merci à **Valériiiiiieeee Bacquié** pour les nombreux délires et craquages qu'on a eus.

Merci à **Mathilde Lévèque**, experte de la culture cellulaire et une personne adorable toujours souriante que j'apprécie beaucoup.

Merci à **Valérie Bézirard** avec qui j'ai pu aussi rigoler de nombreuses fois dans le labo.

Merci à **Cherryl Harkat**, qui aura appris toute ma vie en un jour grâce à son super questionnaire lors des OGTT et ITT.

J'aimerais maintenant remercier la petite bande du café qui contient les 2 meilleurs thésards : **Sophie Yvon** et **Jasper Kamphuis**.

Merci à toi **Sophie**. On a pu partager ensemble nos angoisses, notre stress, notre envie de tout arrêter ^^ mais on aura tenu jusqu'au bout ! J'ai vraiment adoré discuter avec toi et nos nombreux craquages et pétages de plomb vont me manquer. Sache que tu es une personne particulièrement méritante et travailleuse, ce qui n'est pas assez reconnu. Tu es un exemple pour moi.

Merci à toi **Jasper**, le dieu nordique. Je ne lis pas beaucoup mais je peux te dire que j'ai aimé nos nombreux délires à base de vidéos hasardeuses sur youtube ^^. J'ai également aimé ta personnalité et pouvoir échanger avec toi nos idées sur nos résultats respectifs.

Un merci particulier à toi **Hanna Ilchmann**. Ton utilisation des mots oubliés de la langue française m'aura fait beaucoup rire. Je pense que tu es la personne la plus gentille que je connaisse et une fine pâtissière. J'ai aimé discuter avec toi de la thèse, la science et tout plein d'autres choses. Ça va me manquer…

Spéciale dédicace à **Fanny Placide** wesh t'as vu ? Plus sérieusement merci à toi Fanny pour m'avoir fait rire de très nombreuses fois et d'avoir supporté mes charriades pendant longtemps. Tu es une personne bien, vraiment rafraichissante et avec qui j'ai adoré discuter et rigoler. Ma petite sœur spirituelle ^^. Tu es géniale, ne change pas. Saches que je t'apprécie énormément et tu vas vraiment beaucoup me manquer…

Merci à **Kevin Gillois** également que je viens à peine de rencontrer mais qui je pense prendra bien la relève ^^.

Merci à **Marie-Laure Andre** (désolé je suis obligé de mettre ton prénom en entier ^^) qui est une personne adorable et travailleuse, et que je n'ai pu côtoyer que trop peu de temps durant son stage.

Je voudrais maintenant remercier d'autres personnes de ToxAlim qui ont compté pour moi.

Un grand merci à **Gladys Mirey**, une personne formidable et qui mérite autant de louanges qu'il y a d'étoiles dans le ciel. Tu es un exemple d'humanité, de courage et de travail. Tu fais

partie des personnes qui comptent beaucoup pour moi et ton rire communicatif et tes très bonnes blagues vont me manquer.

Merci également à **Julien Vignard** qui m'aura largement épaulé lors de mon stage de M2 et qui est un adversaire redoutable et délirant de badminton.

Merci à **Vanessa Graillot** que je ne vais jamais voir dans son bureau mais que j'apprécie particulièrement. Nos parties de badminton vont me manquer.

Je voudrais remercier également **Saleha Hashim**, 2ème reine de gâteau, qui m'aura dépanné de nombreuses fois lorsqu'il me manquait du consommable et avec qui j'ai toujours plaisir à discuter.

Merci à **Hervé Guillou** qui m'a conseillé, soutenu et rassuré de nombreuses fois. Je ne l'oublierai pas.

Un merci tout particulier à **Alain Marrot**, compère de pensées philosophiques. Tu fais également parti des personnes que j'apprécie le plus et tu mériterais largement d'être plus heureux. Nos nombreuses discussions scientifiques et sur la vie en général vont me manquer. Tu es un mec bien.

Merci à **Céline Lukowicz** avec qui j'ai pu rigoler et craquer de nombreuses fois. Je me souviendrai de notre « grande performance » au tennis ^^.

J'aimerai remercier le futur moine Shaolin **Vincent Tinard** et son compère **Edwin Fouche** qui m'auront fait beaucoup rire durant les pauses café.

J'aimerai maintenant remercier mes amis et ma famille.

Un énorme merci à **Aurélie Martinez** qui a toujours su me pousser à réviser et à aller toujours plus loin durant mes études. Tu es une personne qui compte beaucoup pour moi et je te porterai dans mon cœur à jamais.

Merci à **Hussein Hammich**, un de mes meilleurs Hammich ^^. Plus sérieusement notre année de M2 avec Aurélie fait partie des meilleurs souvenirs que j'ai. Nos nombreux délires m'ont manqué durant la thèse.

Merci à **Nancy Martinez** qui m'aura également fait rire de nombreuses fois durant nos nombreux apéros.

Je remercie également **Yasmine Bouaiche** qui m'a aussi soutenu de nombreuses fois durant cette thèse.

Un très grand merci à **Sarah Bettini**, **Elisabeth Bezine**, **Marion David** et **Alix Pierron** qui m'ont soutenu, diverti et fait rire lors de nos soirées jeux de société.

Sarah, tu comptes beaucoup pour moi et je ne te remercierai jamais assez pour ton soutien. Tu es une personne formidable et qui mérite d'être connue. Nos nombreuses discussions et nos parties de basket vont me manquer. Je n'ai pas trop les mots sur le moment non plus mais sache que je ne t'oublierai pas.

Merci à toi **Elisabeth**. Tu es également une des personnes les plus gentilles que je connaisse et qui redonne fois en l'humanité. Tu as vraiment le cœur sur la main. Un grand merci pour ton soutien. Je suis vraiment heureux de t'avoir rencontré.

Merci **Marion**. Comme tu t'y attends, tes petits commentaires qui tuent me manquent déjà. Je t'apprécie également beaucoup et j'espère que ton avenir à Lyon se passera pour le mieux.

Merci **Alix**. Tu es pour moi un exemple car tu as toujours su garder le sourire, quelle que soit la situation.

Je voudrais maintenant remercier ma famille.

Comment ne pourrais-je pas remercier **ma mère** ? Cette femme formidable à qui je ne dis pas assez « je t'aime » mais qui pourtant a toujours été là pour moi. Tu es et resteras à jamais un modèle de courage, d'humanité et de réussite, et je suis fier d'avoir une mère comme toi. Je ne te remercierai jamais assez d'avoir su si bien nous éduquer mon petit frère et moi malgré la difficulté de votre situation avec Papa à l'époque. Tu peux être fière de toi Maman.

J'aimerai remercier **mon père** qui a toujours été pour moi un exemple de réussite professionnel et de leadership. Tu m'auras toujours montré que quand on veut, on peut, et je te remercie de m'avoir toujours mis dans le droit chemin. Tu es toujours une présence rassurante. Tu m'aides chaque jour à avoir plus confiance en moi et à me dire que, des fois, faut arrêter de réfléchir et foncer. J'aimerai faire aussi bien que toi dans le futur. Merci Papa.

Merci à **mon petit frère** avec qui j'ai déliré de nombreuses fois chez les parents, quitte à leur faire perdre patience. Tu m'as aidé de nombreuses fois à décompresser durant la thèse et je ne t'en remercierai jamais assez. Je suis fier de ce que tu es devenu.

Je remercie également **ma grande tante** qui m'a aussi soutenu et qui a pris de nombreuse fois des nouvelles quant à l'avancement de la thèse. Merci pour ta gentillesse.

Enfin, le meilleur pour la fin comme on dit ^^. Un très grand merci à **Sandrine Ménard** de l'équipe 4 que j'ai harcelée de questions tout au long de la thèse au point qu'elle soit exaspérée de me voir débarquer dans son bureau… Tu as été un énorme soutien et même si je râlais de nombreuses fois, j'ai toujours écouté et pris en compte tes conseils et remarques (enfin disons dans 99% des cas ^^). Je ne te l'ai jamais dit mais tu es une personne formidable et qui a mon admiration. Si je pouvais n'être que la moitié de ce que tu es, j'aurais bien réussi ma vie. Toujours souriante quelle que soit la situation, de bonne humeur même quand tu es « chonchon », on aura pu très bien s'entendre sur cette machine formidable qu'est le Ussing et sur la joie de faire des cônes ^^. Mais bon, ta présence rassurante et rafraichissante m'aura aidé à passer ce cap. Chose promise, chose due, je te dédicace ces quelques vers :

A toi, la belle Sandrine
Ô grande déesse de la perméabilité
Qui de par sa connaissance me fascine
Tu gardes en toi une petite part de naïveté

Ce qui aura su, en mon cœur, me charmer
Mais telle une perle rare bien gardée
Reste le moment de se résigner
D'un amour à sens unique, je devrais me contenter

Liste des publications, communications orales et affichées

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

Publications :

Yann Malaisé, Sandrine Ménard, Christel Cartier, Corinne Lencina, Caroline Sommer, Eric Gaultier, Eric Houdeau, Laurence Guzylack-Piriou. Consequences of bisphenol a perinatal exposure on immune responses and gut barrier function in mice. Arch. Toxicol. 2017 jul 21. doi: 10.1007/s00204-017-2038-2

Yann Malaisé, Sandrine Menard, Christel Cartier, Eric Gaultier, Frédéric Lasserre, Corinne Lencina, Cherryl Harkat, Nancy Geoffre, Laïla Lakhal, Isabelle Castan, Maïwenn Olier, Eric Houdeau1, Laurence Guzylack-Piriou Gut dysbiosis and impairment of immune system homeostasis in perinatally-exposed mice to Bisphenol A precede obese phenotype development. Sci Rep. 2017 oct 16. Accepted

Communications orales :

Yann Malaisé, Sandrine Ménard, Christel Cartier, Corinne Lencina, Caroline Sommer, Eric Gaultier, Eric Houdeau, Laurence Guzylack-Piriou. Bisphenol A perinatal exposure leads to metabolic disorders in male offspring mice at adulthood: an immunological point of view**.** *Club d'Etude des Cellules Epithéliales (CECED) 2017, Paris.*

Yann Malaisé, Sandrine Ménard, Christel Cartier, Corinne Lencina, Caroline Sommer, Eric Gaultier, Eric Houdeau, Laurence Guzylack-Piriou. Bisphenol A perinatal exposure leads to metabolic disorders in male offspring mice at adulthood: an immunological point of view**.** *Herrenhausen Conference on the neonatal window of opportunity, early priming for Life (organisé par la fondation Volkswagen) 2017, Hanovre (Allemagne)*.

Communications affichées :

Yann Malaisé, Sandrine Ménard, Christel Cartier, Corinne Lencina, Caroline Sommer, Eric Gaultier, Eric Houdeau, Laurence Guzylack-Piriou. Bisphenol A perinatal exposure leads to

metabolic disorders in male offspring mice at adulthood: an immunological point of view**.** *Herrenhausen Conference on the neonatal window of opportunity, early priming for Life (organisé par la fondation Volkswagen) 2017, Hanovre (Allemagne)*.

Yann Malaisé, Sandrine Ménard, Christel Cartier, Corinne Lencina, Caroline Sommer, Eric Gaultier, Eric Houdeau, Laurence Guzylack-Piriou. Bisphenol A perinatal exposure leads to metabolic disorders in male offspring mice at adulthood: an immunological point of view**.** *Congrès international du Programme National de Recherche sur les Pertubateurs Endocriniens (PNRPE) 2016, Paris.*

RÉSUMÉ

Le bisphénol A (BPA) est un perturbateur endocrinien couramment employé dans l'industrie agro-alimentaire, en particulier pour les matériaux en contact des denrées alimentaires. Son utilisation dans la fabrication de polycarbonates et de résines époxy, recouvrant la face interne des boîtes de conserve et des canettes, en fait un contaminant ubiquitaire de l'alimentation humaine. L'augmentation de l'exposition humaine à ce contaminant a été corrélée avec la récurrence de certains troubles comme l'intolérance alimentaire, l'obésité ou le diabète de type 2. Ces dernières années, une attention particulière a été portée sur sa capacité à perturber différentes fonctions physiologiques, dont celle du système immunitaire, après exposition périnatale à des niveaux environnementaux pertinents pour l'Homme.

Dans une première étude, nous avons montré qu'une exposition périnatale au BPA à 50 µg/kg de poids corporel/jour induit une diminution de l'activité anti-microbienne corrélée à une chute de l'expression du lysozyme dans l'iléon de la descendance femelle. La perméabilité intestinale de ces individus augmente en association avec le niveau d'IFN-γ dans les muqueuses du côlon. De plus, nous observons une diminution des plasmocytes à IgA associée à une perte de sécrétion d'IgA dans les fèces, démontrant un défaut de la fonction barrière et des défenses de l'intestin chez la descendance BPA. De manière intéressante, une diminution de la fréquence des ILC3 intestinaux est observée chez ces individus, avec une augmentation du niveau d'IgG sanguin dirigé contre une *E.coli* commensale. Ces effets sont associés à un défaut de maturation et de capacité migratoire des cellules de la *lamina propria* (LP) et de la rate. L'exposition périnatale au BPA provoque une augmentation de la sécrétion d'IFN-γ et d'IL-17 après re-stimulation *in vitro* CD3/CD28 des cellules de la LP, et une réponse de type Th17 dans la rate. Réunis, ces effets confortent la capacité du BPA, lors d'une exposition périnatale, à induire une intolérance alimentaire chez la descendance femelle.

Dans une seconde étude, nous avons mis en évidence que l'exposition périnatale au BPA, à la même dose, induit des perturbations de l'homéostasie du système immunitaire intestinal et systémique chez la descendance mâle au jour 45, *via* une diminution de la fréquence des Th1 et Th17 dans la LP et une augmentation de la réponse Th1 et Th17 dans la rate. Ces impacts apparaissent en parallèle avec une altération de la sensibilité au glucose, une diminution de la sécrétion d'IgA dans les fèces et un appauvrissement des *bifodobacteria* dans le microbiote intestinal de ces individus. L'ensemble de ces évènements précède l'infiltration de

macrophages M1 pro-inflammatoires dans le tissu adipeux péri-gonadique, en association avec une diminution de la sensibilité à l'insuline et une augmentation du poids corporel apparaissant avec le vieillissement (jour 170) chez la descendance BPA. Cette étude longitudinale a permis de proposer une séquence d'évènements aboutissant à un phénotype obèse et au T2D lors d'une exposition périnatale au BPA, et ainsi de comprendre le rôle du système immunitaire en lien avec le microbiote intestinal dans le développement de ces désordres métaboliques.

Enfin, nous émettons l'hypothèse que les bisphénols S et F, deux analogues structuraux du BPA, peuvent disposer de capacités immuno-modulatrices équivalentes à celles du BPA, susceptibles de provoquer les mêmes troubles chez la descendance. Nous avons testé cette hypothèse de manière préliminaire chez la descendance femelle après exposition périnatale au BPS et au BPF. Des résultats préliminaires d'études *in vitro* sur ces deux composés en comparaison au BPA sont également apportés.

Ce travail de thèse contribue à accroître les connaissances relatives aux effets immunotoxiques des bisphénols dans le contexte de l'origine développementale des pathologies chroniques de l'adulte (DOHaD).

Mots clés : bisphénols, système immunitaire, intestin, désordres métaboliques, aryl hydrocarbon receptor

ABSTRACT

The endocrine disruptor bisphenol A (BPA) is commonly found in food industry, more precisely in food contact packaging. BPA is used to manufacture polycarbonate plastics and epoxy resins lining food and beverage cans, becoming an ubiquitous contaminant in human food. The extent of human exposure to this chemical is thought to be correlated with the occurrence of disorders like food intolerance, obesity and type-2 diabetes (T2D). During last years, a particular interest have been raised about its ability to disrupt various physiological functions, including immune system, after perinatal exposure at relevant environmental doses for Human.

In the first study, we showed that perinatal exposure to BPA (50 µg/kg body weight/day) decreased anti-microbial activity and ileal lysozyme expression in the female mouse offspring. In those mice, we observed an increased gut permeability, in association with an increase of colonic IFN-γ level. Moreover, we observed a decrease of IgA^+ cells with a loss of IgA secretion into faeces, depicting intestinal barrier and defense function defects in BPA female offspring. Interestingly, a decrease of the intestinal ILC3 frequency associated with an increase of IgG against commensal *E.coli* in sera have been observed in these individuals. These effects were linked to a defect of maturation and migratory ability of dendritic cells from *lamina propria* (LP) and spleen. Perinatal exposure to BPA also increased IFN-γ and IL-17 secretions after *in vitro* stimulation in the gut and elicited Th17 response in the spleen. Altogether, these effects support the ability of a perinatal exposure to BPA to induce oral intolerance with ageing in female offspring.

Secondly, we showed that perinatal exposure to BPA at the same dose led to intestinal and systemic immune system homeostasis disturbances in male mouse offspring at day 45, through a decrease of Th1 and Th17 frequencies in the LP and an increase of Th1 and Th17 response in spleen. These effects were associated with an altered glucose sensibility, a decrease of faecal IgA secretion and a fall of *bifidobacteria* in the microbiota of these individuals. These BPA-mediated events precede infiltration of pro-inflammatory M1 macrophages in gonadal white adipose tissue, together with a decreased insulin sensitivity and an increased weight gain. This longitudinal study allowed us to better understand the sequential events linked to perinatal exposure to BPA that lead to obesity and T2D, and highlighted the role of immune system linked to gut microbiota in the development of these metabolic disorders.

Finally, we hypothesized that two structural analogs of BPA –i.e., Bisphenol S and F- can display similar immune-modulatory effects that could lead to similar developmental disturbances than BPA in exposed-offspring. This hypothesis was tested in a preliminary experiment in female mouse offspring perinatally exposed to BPS and BPF. We also provided preliminary results of these two compounds, compared to BPA, from an *in vitro* study.

This thesis contributes to the increase knowledge about the immunotoxic effects of bisphenol compounds in the context of the Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD).

Keywords : bisphenols, immune system, gut, metabolic disorders, aryl hydrocarbon receptor

Table des matières

Liste des publications, communications orales et affichées 9

RESUME 11

ABSTRACT 13

Liste des figures 19

Liste des tableaux 23

Liste des abréviations 24

Introduction générale 28

DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES 33

CHAPITRE I - GÉNÉRALITES SUR LES BISPHÉNOLS 33

1.1 Les perturbateurs endocriniens 33

1.2 Le Bisphénol A 35

1.2.1 Généralités sur les usages 36

1.2.2 Exposition humaine 38

1.2.2.1 Absorption par voie orale 38

1.2.2.2 Absorption par voie cutanée 41

1.2.2.3 Absorption par voie aérienne 42

1.2.3 Métabolisme et niveaux circulants du BPA 43

1.2.3.1 Métabolisme 43

1.2.3.2 Niveaux circulants 45

1.2.4 Mécanismes d'action du Bisphénol A 47

1.2.4.1 Activité sur les récepteurs aux estrogènes nucléaires 47

1.2.4.2 Activité sur les récepteurs aux estrogènes membranaires 48

1.2.4.3 Activité sur les récepteurs aux androgènes 50

1.2.4.4 Activité sur les récepteurs aux hormones thyroïdiennes 51

1.2.4.5 Activité sur les récepteurs constitutifs androstane (CAR) et pregnane X (PXR) 52

1.2.4.6 Activité sur les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxysomes (PPAR) 53
1.2.4.7 Activité sur le récepteur aux hydrocarbures aromatiques 53
1.2.5 Effets « santé » du BPA 55
1.2.5.1 Effets d'une exposition directe 55
1.2.5.2 Effets d'une exposition périnatale 57
1.2.6 Réglementation du BPA 60
1.3 Les analogues structuraux et substituts potentiels au BPA 63
1.3.1 Le Bisphénol S 64
1.3.2 Le Bisphénol F 67
1.3.3 Réglementation 68
CHAPITRE II - PHYSIOLOGIE INTESTINALE 69
2.1 Le tractus digestif 69
2.1.1 Structure pariétale de l'intestin 71
2.1.2 Les cellules de l'épithélium intestinal 72
2.1.3 La perméabilité intestinale 75
2.2 Le système immunitaire intestinal 79
2.2.1 Les structures clés du système immunitaire intestinal 80
2.2.2 Les cellules immunitaires de l'intestin 82
2.2.3 Implication de AhR dans le système immunitaire intestinal 89
2.3 Le microbiote intestinal 90
2.3.1 Mise en place du microbiote intestinal 91
2.3.2 Composition et diversité du microbiote intestinal 94
2.3.3 Facteurs d'altérations du microbiote intestinal adulte 96
2.4 Conséquences de l'exposition directe et périnatale au BPA sur la physiologie intestinale 98
2.4.1 Bisphénol A et barrière intestinale 98
2.4.2 Bisphénol A et homéostasie du système immunitaire intestinal 99

2.4.3 Bisphénol A et microbiote intestinal 100

CHAPITRE III –OBÉSITÉ ET DIABETE DE TYPE 2 : UNE PHYSIOPATHOLOGIE MODÈLE DE L'EXPOSITION AU BPA 102

3.1 Syndrome métabolique, diabète de type 2 et obésité : une préoccupation mondiale 102

3.2 Définition 102

3.3 Prévalence et estimations 104

3.4 Obésité, diabète de type 2 et perturbateurs endocriniens 106

3.5 Obésité, diabète de type 2 et BPA 107

3.5.1 Etudes épidémiologiques 107

3.5.2 Etudes chez l'animal 108

3.5.3 Etudes mécanistiques sur le développement de l'obésité et du diabète de type 2 lors d'une exposition au BPA 109

OBJECTIFS DE LA THÈSE 115

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX 119

1. Consequence of bisphenol a perinatal exposure on immune responses and gut barrier function in mice 119

2. Gut dysbiosis and impairment of immune system homeostasis in perinatally-exposed mice to Bisphenol A precede obese phenotype development 134

DISCUSSION GÉNÉRALE 161

1. Effets d'une exposition périnatale au BPA sur la réponse immunitaire intestinale et systémique chez la descendance femelle 162

1.1 Effets sur l'intégrité de la barrière intestinale 162

1.2 Effets sur le système immunitaire intestinal et systémique 165

2. Effets d'une exposition périnatale au BPA sur le système immunitaire intestinal et systémique chez la souris mâle en lien avec le développement de désordres métaboliques 172

2.1 Effets sur le métabolisme 172

2.2 Développement du système immunitaire et du microbiote intestinal : possibles associations avec l'apparition de désordres métaboliques après exposition périnatale au BPA 174

3. Exposition périnatale au BPA : Importance du sexe, de l'âge et de la période d'exposition 179

3.1 Dimorphisme sexuel 179

3.2 Importance de l'âge 184

3.3 Importance de la période d'exposition au BPA : différences potentielles entre exposition gestationnelle et lactationnelle 188

4. Etude préliminaire sur les effets *in vivo*, *ex vivo* et *in vitro* d'une exposition aux BPS et BPF en comparaison avec le BPA 191

4.1 Impacts d'une exposition périnatale au BPS et BPF en comparaison avec le BPA sur le système immunitaire de la descendance souris femelle 192

4.2 Impacts du BPA, BPS et BPF sur la différenciation de LT naïfs spléniques 196

4.3 Impacts du BPA, BPS et BPF sur l'activité de AhR 198

4.3.1 Modèle Caco-2 198

4.3.2 Modèle H1L1.1c2 200

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 207

Annexe 207

RÉFÉRENCES 209

Liste des figures

Figure 1 : Les différents modes d'action des PE adapté de Rogers et al. (Rogers et al., 2012). NL : Ligand Naturel, EDC : PE (endocrine disruptor compound)..... 35

Figure 2 : Structure chimique du Bisphénol A. (N° CAS : 80-05-7) 35

Figure 3 : Réaction de formation de résine époxy à partir de Bisphénol A et d'épichlorhydrine. 36

Figure 4 : Réaction de formation de polycarbonate à partir de Bisphénol A et de phosgène. 37

Figure 5 : Logo permettant d'indiquer la potentielle présence de BPA dans l'emballage..... 38

Figure 6 : Schéma représentant les différentes formes de détoxification du BPA par le foie chez l'Homme..... 44

Figure 7 : Schéma simplifié de l'activité du BPA sur les ER nucléaires versus membranaires illustrant le type de réponse génomique et non-génomique. 50

Figure 8 : Mécanisme suspecté de l'effet du BPA sur les THR. Figure adaptée d'Ortiga-Carvalho et al., 2014. TR : THR, CoR/A : Co-répresseur/activateur, RXR : Récepteur X des rétinoïdes. 52

Figure 9 : Schéma représentant la voie de signalisation de AhR (Stockinger et al., 2014). ... 54

Figure 10 : Schéma simplifié du passage maternel du BPA vers le fœtus. Figure adaptée de Houdeau, 2011. 58

Figure 11 : Structure du BPA et de ses analogues structuraux. 64

Figure 12 : Anatomie du tractus digestif humain adapté de Mowat et Agace (Mowat and Agace, 2014)..... 69

Figure 13 : Organisation structurelle de l'intestin. 71

Figure 14 : Les différents types cellulaire de l'épithélium intestinal (Peterson and Artis, 2014). 73

Figure 15 : Les jonctions intercellulaires (figure adaptée de Stewart et al., 2017). 76

Figure 16 : Voie paracellulaire de l'épithélium intestinal et structures associées (Ménard et al., 2010)..... 77

Figure 17 : Voie transcellulaire de l'épithélium intestinal et structures associées (Ménard et al., 2010)..... 78

Figure 18 : Drainage lymphatique de l'intestin (Mowat and Agace, 2014). 79

Figure 19 : Schéma simplifié d'une PP, d'un cryptopatche et d'un follicule lymphoïde isolé (Jain and Walker, 2014). 81

Figure 20 : Les différentes cellules impliquées dans la réponse immunitaire innée et adaptative (Dranoff, 2004). 82

Figure 21 : Phénotypes des DC intestinaux et migratoires. Adaptée de Cerovic et al., 2014. 85

Figure 22 : Rôles de AhR dans l'intestin (souris KO) (Stockinger et al., 2014). 89

Figure 23 : Impacts des facteurs externes sur le développement du microbiote intestinal de l'individu (Matamoros et al., 2013). 94

Figure 24 : Composition du microbiote intestinal chez l'Homme et la souris. 95

Figure 25 : Evolution du microbiote intestinal humain en fonction de l'âge et de différents paramètres environnementaux (Ottman et al., 2012). 96

Figure 26 : Pourcentage d'obèses (IMC > 30 kg/m2) de la population mondiale âgée de plus de 20 ans dans les régions africaines (AFR), américaines (AMR), est-méditerranéennes (EMR), européennes (EUR), sud-est asiatiques (SEAR) et ouest-pacifiques (WPR) et par rapport au revenu moyen des pays (WHO, 2017a). 105

Figure 27 : Résumé des mécanismes d'action des PE obésogènes. Adaptée de Darbre, 2017. 107

Figure 28 : Voies de signalisation activées par de faibles et fortes concentrations en BPA durant la différentiation adipocytaire. Adaptée de Legeay and Faure, 2017. 110

Figure 29 : Schéma récapitulatif des études effectuées lors du travail de thèse. 116

Figure 30 : Dosage ELISA du pIgR dans les fèces des souris exposées au BPA à 50 µg/kg de poids corporel/jour (barre noire) ou au solvant (barre blanche). 163

Figure 31 : Dénombrements bactériens sur ChromID (coliformes) et sur McConckey (entérobactéries lactose-) des fèces au jour 21 post-natal de la descendance femelle exposée au BPA à 50 µg/kg de poids corporel/jour (barres noires) ou au solvant (barres blanches). 164

Figure 32 : Schéma représentant les impacts de l'exposition périnatale au BPA sur le système immunitaire chez la descendance femelle. 166

Figure 33 : Schéma représentant les différentes hypothèses pour l'augmentation du niveau d'IgG anti-E.coli sanguin chez la descendance exposée au BPA en périnatal. 168

Figure 34 : Formation de l'acide rétinoïque à partir de rétinol 169

Figure 35 : Schéma récapitulatif des effets suspectés d'une exposition périnatale au BPA sur la production d'AR en lien avec l'homéostasie du système immunitaire intestinal chez la descendance femelle. Schéma inspiré de Parigi et al., 2015. RA= acide rétinoïque (AR). ... 170

Figure 36 : Schéma récapitulatif des effets suspectés d'une exposition périnatale au BPA sur la production de l'AR en lien avec AhR et le système immunitaire intestinal chez la descendance femelle. Schéma inspiré de Pot, 2012. RA : acide rétinoïque (AR). 171

Figure 37 : Dénombrements microbiologiques sur ChromID (coliformes) et sur McConckey (entérobactéries lactose-) des fèces des mères et de la descendance exposée au BPA à 50 µg/kg de poids corporel/jour (barres noires) ou au solvant (barres blanches) au jour 21 post-natal. 178

Figure 38 : Impact du sexe de l'individu sur le système immunitaire lors d'une exposition périnatale au BPA. 179

Figure 39 : Différences entre l'homme et la femme pour les réponses immunitaires tout au long de la vie (Klein and Flanagan, 2016). 180

Figure 40 : Perméabilité du jéjunum et du colon de la descendance mâle et femelle (jour 45) lors d'une exposition périnatale au BPA à 50 µg/kg de poids corporel/jour pour une molécule à faible et haut poids moléculaire (FSS et HRP représentants la perméabilité para et trans-cellulaire, respectivement). 182

Figure 41 : Aire sous la courbe (AUC) représentatif d'un test de tolérance au glucose (OGTT) effectué sur la descendance mâle et femelle exposée au BPA à 50 µg/kg de poids corporel/jour (barre noire) ou au solvant (barre blanche) au jour 35. 183

Figure 42 : Niveau d'IgA fécal et d'IgG anti-E.coli sanguin chez la descendance mâle et femelle après exposition périnatale au BPA ou au solvant. 185

Figure 43 : Fréquence des cellules Th17 associée à la production d'IL-17 après re-stimulation CD3/CD28, des Treg et des ILC3 dans la LP et la rate provenant de la descendance après exposition périnatale au BPA ou au solvant. 186

Figure 44 : Schéma récapitulatif des impacts d'une exposition périnatale au BPA sur le système immunitaire intestinal et systémique, ainsi que sur la barrière intestinale, l'apparition de désordre métabolique et le microbiote intestinal, chez la descendance mâle et femelle selon le temps. 188

Figure 45 : Développement et maturation de la barrière ainsi que du système immunitaire intestinal lors de la période pré- et post-natal (Renz et al., 2011). 190

Figure 46 : Impacts d'une exposition périnatale au BPA, BPS et BPF à la dose de 5 et 50 µg/kg de poids corporel/jour sur la réponse Th1, Th17 et sur la fréquence des Treg dans la LP et la rate de la descendance souris femelle au jour 70. 195

Figure 47 : Impacts du BPA, du BPS et du BPF à 0,05, 5, 500 et 50000 nM sur la différenciation des LT naïfs en Th17 et sur la production d'IL-17 après re-stimulation CD3/CD28. 197

Figure 48 : Expression génique de CYP1A1 dans les cellules Caco-2 après traitement BPA, BPS ou BPF à 1 nM, 100 nM, 1µM et 100µM (a.) et après traitement BPA 1nM et/ou TCDD 0,1 nM (b.). 200

Figure 49 : Activation d'AhR selon un système de reporter luciférase dans les cellules H1L1.1c2 après traitement BPA, BPS ou BPF de 0,1 nM à 100 µM (augmentation d'un facteur 10) et après traitement TCDD de 0,1 pM à 100 nM (augmentation d'un facteur 10) avec ou sans BPA, BPS ou BPF à 1nM. 203

Liste des tableaux

Tableau 1 : Estimation selon l'EFSA de l'exposition de l'homme au BPA par l'alimentation en fonction de l'âge. Tableau adapté de Ćwiek-Ludwicka (Ćwiek-Ludwicka, 2015). 40

Tableau 2 : Estimation selon l'EFSA de l'exposition de l'homme au BPA par voie cutanée en fonction de l'âge. Tableau adapté de Ćwiek-Ludwicka (Ćwiek-Ludwicka, 2015)..... 42

Tableau 3 : Indices de masse corporel et leur catégorie de poids associé (BMI : *Body Mass Index* (IMC)). 103

Liste des abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AhR : *Aryl hydrocarbon Receptor*

AhRR : *Aryl hydrocarbon Receptor Repressor*

AKT : Protéine Kinase B

ANSES : Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'Environnement et du travail

APRIL : *A Proliferation Inducing Ligand*

AR : Acide Rétinoïque

ARNm : Acide RiboNucléique messager

ARNT : *Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator*

ATM : *Adipose Tissue Macrophage*

BADGE : Bisphenol A DiGlycidyl Ether

BAFF : *B-cell Activating Factor*

BFDGE : Bisphenol F DiGlycidyl Ether

BPA : Bisphénol A

BPF : Bisphénol F

BPS : Bisphénol S

Ca^{2+} : ion calcium

CAR : Récepteur Constitutif des Androstanes

CCR : *C-C chemokine Receptor*

CD : Cluster de différenciation

CDC : Centre du Contrôle et de la prévention des maladies

CLP : Règlement de classification, d'étiquetage et d'emballage

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CRAMP : *Cathelicidin-Related Antimicrobial Peptide*

CYP : Cytochrome P

Da : Dalton

DAMP : *Damage Associated Molecular Pattern molecules*

DC : Cellule Dendritique

DES : DiéthylStilbestrol

DGCCRF : Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes

DJT : Dose Journalière Tolérable

DMSO : DiMéthylSulfOxyde

DOHaD : *Developmental Origins of Health and Disease*

DRE : *Dioxin Response Element*

E.coli : *Escherichia Coli*

ECHA : Agence Européenne des produits Chimiques

EFSA : Autorité Européenne de Sécurité des Aliments

ELISA : *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

EPA : *Environmental Protection Agency*

ER : Récepteur aux Estrogènes

ERE : *Estrogen Response Element*

FAE : *Follicle-Associated Epithelium*

FDA : *Food and Drug Administration*

FICZ : 6-formylindolo[3,2-b]caracole

FSS : *Fluorescent Sodium Salt*

GALT : *Gut-Associated Lymphoïd Tissue*

GAPDH : GlycérAldéhyde-3-Phosphate DésHydrogénase

GLUT : Transporteur au glucose

GPDH : Glycérol-3-Phosphate DésHydrogénase

GPR30 : *G-Protein Coupled Receptor 30*

gWAT : Tissu Adipeux gonadique

HFD : *High-Fat Diet*

HRP : *HorseRadish Peroxydase*

HSD : *High-Sucrose Diet*

IC_{50} : Concentration inhibitrice médiane

IEL : Lymphocytes Intra-Epithéliaux

IFN : Interféron

Ig : Immunoglobuline

IL : InterLeukine

ILC : Cellules lymphoïdes innées

IMC : Indice de Masse Corporelle

iTreg : Lympocyte T régulateur induit

JAM : *Junctional Adhesion Molecules*

KO : *Knock-Out*

LB : Lymphocyte B

LH : Hormone Lutéinisante

LP : *Lamina Propria*

LPL : LipoProtéine Lipase

LT : Lymphocyte T

LTi : *Lymphoid tissue-inducer cell*

MAPKinase : *Mitogen-activated protein kinases*

MICI : Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin

MLN : Ganglions mésentériques

N.brasiliensis : *Nippostrongylus brasiliensis*

NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate

NASH : Stéatose Hépatique Non Alcoolique

NCoR : *Nuclear Co-Repressor*

NHANES : *National Health and Nutrition Examination Survey*

NK : *Natural Killer*

NLR : Récepteur de type Nod

NOAEL : Dose sans effet nocif observable

NO : Oxyde nitrique

Nod: *Nucleotide oligomerization domain*

NOD : Non-Obèse Diabétique

OMS : Organisation Mondiale de la SAnté

OVA : Ovalbumine

PAMP : Motifs moléculaires associés aux pathogènes

PC : PolyCarbonate

PE : Perturbateur Endocrinien

PI3K : PhosphoInositide 3-Kinase

pIgR : *Poly-Ig Receptor*

PP : Plaque de Peyer

PPAR : Récepteurs Activés par les Proliférateurs de Peroxysomes

PRR : *Pattern Recognition Receptor*

PXR : Récepteur Pregnane X

Q-PCR : *Quantitative Polymerase Chain Reaction*

RA : Récepteur aux Androgènes

RALDH : RétinAldéhyde DésHydrogénase

RAR : Récepteur à l'Acide Rétinoïque

RCIU : Retard de Croissance Intra-Utérin

REACH : *Registration, Evaluation and Autorisation of Chemicals*

ROR : RAR-related Orphan Receptor

SERM : *Selective Estrogen Receptor Modulator*

SMRT : S*ilencing Mediator for Retinoid or Thyroid-hormone receptors*

SFB : *Segmented Filamentous Bacteria*

T2D : Diabète de type 2

T3 : Triiodothyronine

T4 : Thyroxine

TBBPA : Bisphénol A Tetra-Bromé

TCBPA : Bisphénol A Tetra-Chloré

TCDD : 2,3,7,8-TétraChloroDibenzo-*p*-dioxine

TCR : *T Cell Receptor*

TFH : *T Follicular Helper*

TGF : Facteur de croissance transformant

Th : Lymphocyte T *helper*

THR : Récepteurs aux Hormones Thyroïdiennes

TIF2 : *Transcriptional mediators/Intermediary Factor 2*

TLR : *Toll-Like Receptor*

TNF : *Tumor Necrosis Factor*

Treg : Lymphocyte T régulateur

UDPGT : Uridine Diphosphate GlucuronylTransférase

WAT : Tissu adipeux

ZO : *Zonula Occludens*

Introduction générale

L'utilisation des bisphénols, et notamment du BPA, dans divers secteurs industriels, allant de l'industrie agro-alimentaire jusqu'à la production de papiers thermiques, suscite de nombreuses interrogations du fait du caractère « perturbateur endocrinien » de ces composés. L'exposition au BPA par l'alimentation, voie majoritaire d'absorption chez l'Homme, a été démontrée comme étant reprotoxique avec des conséquences alarmantes chez le nourrisson. De ce fait, l'utilisation du BPA dans les matériaux en contact des aliments et les produits de puériculture a été très vite règlementée de manière stricte dans l'Union Européenne notamment en France. Cependant, le BPA continue d'être utilisé dans de nombreux pays dans et hors Union Européenne et ses effets « santé » continuent d'alimenter le débat scientifique, tout particulièrement sur le développement du système immunitaire et sur l'apparition de désordres métaboliques. Qui plus est, suite à la restriction de l'utilisation du BPA dans certains pays comme la France, des composés analogues du BPA comme le BPS (en Union Européenne) et le BPF (hors Union Européenne) sont de plus en plus utilisés en substitution au BPA. Cependant, très peu d'études caractérisent les effets de ces composés sur la santé, notamment leur immunotoxicité.

Dans ce contexte, il apparait déterminant de caractériser les effets d'une exposition périnatale au BPA administré par voie orale sur le développement du système immunitaire intestinal et systémique ainsi que son impact sur le microbiote intestinal qui peuvent expliquer l'apparition d'intolérances alimentaires et de désordres métaboliques comme l'obésité et le diabète de type 2 chez la descendance mâle, déjà décrit dans la littérature. De plus, il est tout aussi primordial de déterminer les impacts de l'exposition du BPS et du BPF sur la mise en place du système immunitaire.

Ce travail de thèse, réalisé dans l'unité Toxalim (Centre de recherche en toxicologie alimentaire) UMR 1331 du centre de recherche de l'INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) Midi-Pyrénées, s'inscrit dans ce contexte. Ces travaux de thèse ont été réalisés sous la direction du Dr Laurence Guzylack-Piriou et du Dr Eric Houdeau dans l'équipe 11 DIXIT (Développement Intestinal, Xénobiotiques et ImmunoToxicologie) de cette unité. Cette thèse a bénéficié d'un financement du département AlimH de l'INRA, de la région Midi-Pyrénées et de l'ANSES (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail) dans le cadre du projet Bisphim (EST-2015/1026).

Ce manuscrit est composé de 4 parties. Une introduction bibliographique présentera l'état actuel de la littérature sur la toxicité du bisphénol A en commençant par des généralités sur son utilisation. Le niveau d'exposition chez l'Homme ainsi que les différentes voies d'absorption, de métabolisation et l'activité sur divers récepteurs cellulaires de ce composé seront également décrits. Les effets du BPA sur la santé humaine seront détaillés avec des précisions sur les différences observées entre exposition directe et périnatale. La règlementation actuelle de ce composé dans et hors Union Européenne sera ensuite présenté, poursuivit par une présentation des analogues structuraux du BPA, le BPS et le BPF, ainsi que leur règlementation. Un deuxième volet de l'introduction bibliographique fera un rappel sur la physiologie intestinale, présentant la structure générale de l'intestin, les différentes cellules épithéliales et du système immunitaire qui composent ce tissu ainsi que le microbiote intestinal. Un regard sur les effets du BPA sur ces différentes composantes de l'intestin sera également apporté. Dans un dernier volet, je présenterai l'obésité et le diabète de type 2 comme modèle physiopathologique de l'exposition au BPA, ainsi que les différents mode d'action du BPA suspectés d'entraîner ces syndromes métaboliques.

La deuxième partie de mon manuscrit traitera les méthodes expérimentales et les résultats majeurs obtenus au cours de mes travaux de thèse, sous la forme de deux articles publiés en premier auteur. Le premier article porte sur les conséquences d'une exposition périnatale au BPA sur les réponses immunitaires et sur la fonction « barrière » de l'intestin chez la descendance souris femelle **(Malaisé et al., Arch. Toxicol. 2017 jul 21. doi: 10.1007/s00204-017-2038-2)**. Le deuxième article caractérise les impacts d'une exposition périnatale au BPA sur l'homéostasie du système immunitaire ainsi que sur le microbiote intestinal, en lien avec le développement du phénotype obèse et des désordres métaboliques chez la descendance souris mâle **(Malaisé et al., Sci Rep. 2017 oct 16. doi: 10.1038/s41598-017-15196-w)**.

La troisième partie est une discussion sur l'ensemble des résultats obtenus au cours de ma thèse, incluant également des résultats préliminaires portant sur l'immuno-toxicité du BPS et du BPF avec des perspectives soulevées par les résultats.

La quatrième partie conclut de manière générale mes travaux de thèse et résume l'ensemble des perspectives.

Données Bibliographiques

DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES

CHAPITRE I - GÉNÉRALITÉS SUR LES BISPHÉNOLS

1.1 Les perturbateurs endocriniens

L'expansion de l'industrialisation dans la société a amené l'Homme à être exposé à de nombreux composés chimiques susceptibles d'être néfastes pour sa santé. Les perturbateurs endocriniens (PE) représentent une partie prépondérante de ces composés. Les études fonctionnelles des PE ont pris une ampleur exponentielle suite aux corrélations faites très tôt entre diminution de la fertilité masculine, troubles de la différentiation sexuelle et l'exposition croissante de l'Homme aux PE *via* son environnement (Colborn, 1995).

Bien que l'intérêt porté sur les effets néfastes des PE soit de plus en plus proéminent depuis le début des années 2000, les premières notions de « perturbations du système endocrinien » remontent à 1991 lors de l'assemblée organisée par Theo Colborn et ses collaborateurs et qui a abouti à la publication de leurs travaux sur les impacts des agents chimiques sur le système hormonal (Colborn et al., 1992). Depuis, la communauté scientifique et les autorités de sécurité sanitaire restent divisées quant à la définition même d'une substance - souvent chimique - à activité de PE :

- L'Agence américaine de la Protection de l'Environnement (EPA) a défini les PE comme des agents exogènes qui interfèrent avec la production, la libération, le transport, le métabolisme, la liaison, l'action ou l'élimination des hormones sanguines naturellement présentes dans l'organisme et responsables du maintien de l'homéostasie, de la reproduction et de la régulation du développement de l'organisme.
- L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) les a définis comme une substance ou un mélange exogène altérant les fonctions du système endocrinien et induisant donc des effets nocifs sur la santé d'un organisme intact, de ses descendants ou (sous-)populations, avec une notion de PE potentiel (substance ou un mélange exogène possédant des propriétés dont on peut attendre qu'elles conduisent à une perturbation endocrinienne sur un organisme intact ou sa descendance).
- L'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (EFSA) a adapté la définition des PE de l'OMS en les caractérisant comme tout produit chimique susceptible d'interagir

directement ou indirectement avec le système endocrinien, et par voie de conséquence, de produire un effet sur ce dernier et d'impacter les organes et les tissus.

- La Communauté Européenne, faute de consensus, a renoncé à organiser un vote des représentants de ses états membres sur une définition commune des PE.
- L'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'Environnement et du travail (ANSES, France) a également adopté la définition de l'OMS en y ajoutant un critère « avéré », « présumé » ou « suspecté » dans leurs effets.

Malgré le désaccord sur la caractérisation des PE, on retrouve parmi ces définitions des notions larges de « composé(s) exogène(s), de perturbation(s) endocrinienne(s) et d'impact(s) « santé » sur l'organisme ».

Les PE sont très hétérogènes et peuvent être classifiés de plusieurs façons :

- Selon leur nature (naturels ou synthétiques)
- Selon leur origine (hormones naturelles/artificielles, drogues, chimiques industriels ou produits secondaires de *process* industriels).
- Selon leur occurrence d'après Gore et al. (pesticides, chimiques de production et matériaux au contact des denrées alimentaires) (Gore et al., 2014).

Parmi les PE d'origine naturelle, on compte la grande famille des phytoestrogènes (génistéine, coumestrol, …) et certaines mycotoxines comme la zéaralénone se développant dans les silos à céréales. Les PE synthétiques, quant à eux, sont divers et variés. Ils comptent des pesticides (organochlorés, organophosphates, …), des agents chimiques industriels (dioxines, hydrocarbures aromatiques polycycliques, plastifiants, retardateurs de flamme, parabens, …) et des produits synthétiques pharmaceutiques (hormones de synthèse, pilules contraceptives, …).

Les PE peuvent pénétrer dans l'organisme par différentes voies : par voie orale *via* la consommation d'aliments ou de boissons contaminées, par voie aérienne *via* l'inhalation de composés chimiques et par voie cutanée *via* le contact avec la peau.

Les PE ont différents modes d'action (Figure 1) ; ils peuvent, de par leurs propriétés hormono-mimétiques, mimer partiellement ou totalement l'effet d'une hormone (effet agoniste), voire au contraire inhiber l'effet d'une hormone en bloquant l'accès à son récepteur (effet agoniste inverse). Enfin, ils sont aussi susceptibles d'interférer avec l'hormone ou son récepteur naturel en altérant, par exemple, son métabolisme (Kabir et al., 2015).

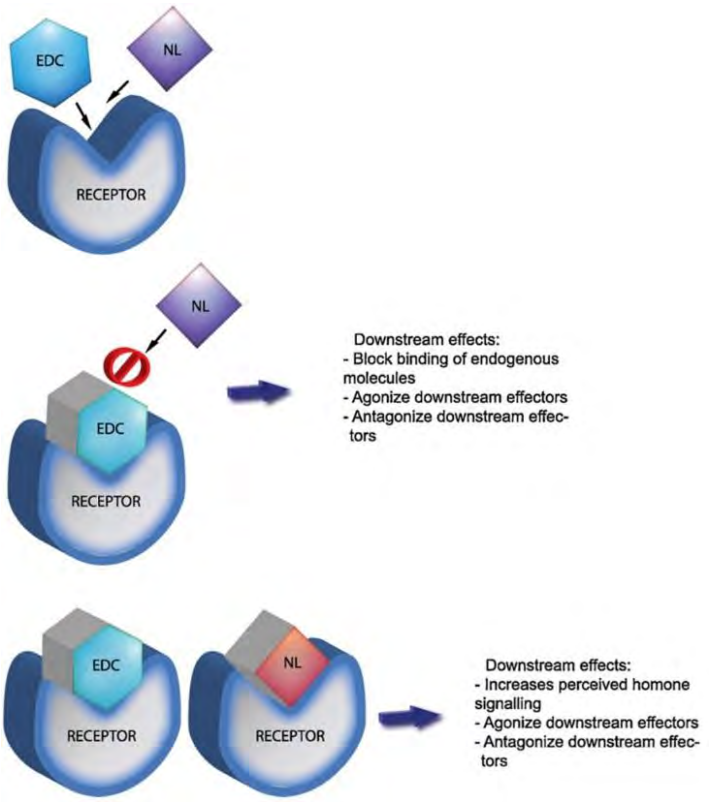


Figure 1 : Les différents modes d'action des PE adapté de Rogers et al. (Rogers et al., 2012). NL : Ligand Naturel, EDC : PE (endocrine disruptor compound).

1.2 Le Bisphénol A

Dans la famille des PE synthétiques, on compte les dérivés de diphénylméthanes, ou bisphénols, dont le plus étudié est le Bisphénol A (BPA). Le BPA, de son nom chimique propane 2,2-bis (4-hydroxyphényl), est une molécule composée de deux cycles aromatiques comprenant chacun un groupement alcool (phénol), l'ensemble relié par un pont carbone à deux groupes méthyles (Figure 2).

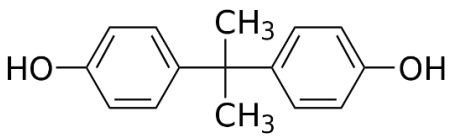


Figure 2 : Structure chimique du Bisphénol A. (N° CAS : 80-05-7)

1.2.1 Généralités sur les usages

La première synthèse chimique du BPA, *via* condensation acide de l'acétone avec deux phénols, a été réalisé par le chimiste russe Alexander Pavlovich Dianin en 1891 dans une étude sur les phénols (Dianin, 1891). Il a été ensuite étudié durant les années 1930 pour ses propriétés estrogéno-mimétiques chez les rates ovariectomisées et ce à des fins d'utilisation comme hormone de synthèse chez la femme (Dodds and Lawson, 1936). Cependant, du fait de sa faible activité estrogénique, Dodds et ses collaborateurs lui préféra le diéthylstilbestrol (DES) présentant une activité estrogénique très supérieure à celle du BPA.

Le Dr Castan (Suisse) utilisa le BPA à des fins différentes et breveta la même année (1936) une résine époxy à base de BPA. A la même époque, le docteur Greenlee, développait également des résines époxy à partir d'épichlorhydrine et de BPA (Figure 3) et notamment le très connu Bisphénol A Diglycidil Ether (BADGE), composant principal de la résine époxy la plus utilisée par la suite dans divers secteurs industriels dont l'agro-alimentaire.

Ces résines époxy sont en effet largement utilisées dans les industries alimentaires, dentaires et plus généralement dans les industries plastiques. En effet, on les retrouve dans les revêtements internes des boîtes de conserve et des canettes, les résines de soins dentaires ainsi que dans les canalisations d'eau potable comme agent anti-corrosif.

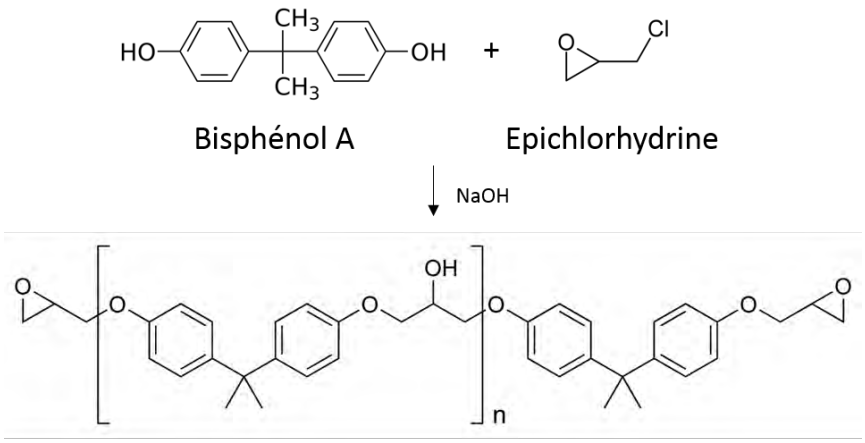


Figure 3 : Réaction de formation de résine époxy à partir de Bisphénol A et d'épichlorhydrine.

Ce n'est qu'à partir des années 1950 que le BPA est utilisé à grande échelle pour ses propriétés structurales et mécaniques. En effet, le Dr. Schnell (Bayer) et le Dr. Fox (General Electric) ont découvert que la réaction de monomères de BPA avec le phosgène forme une résine transparente dure connue sous le nom de polycarbonate (Figure 4).

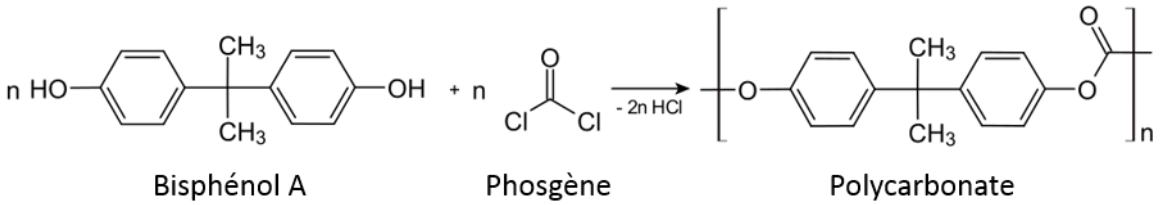


Figure 4 : Réaction de formation de polycarbonate à partir de Bisphénol A et de phosgène.

Les polycarbonates de BPA ont d'exceptionnelles propriétés qui ont rapidement séduit les industriels : ils peuvent supporter de fortes températures et les micro-ondes, ce qui permet, entre autres, de faciliter leur stérilisation. Ils sont transparents et très résistants, peu onéreux, faciles d'accès et de manipulation. Du fait de ces propriétés, les polycarbonates de BPA entrent dans la composition de nombreux objets de notre quotidien, notamment dans les disques compactes (CD), les verres et montures de lunettes, certaines bouteilles et conteneurs d'eau potable, les biberons et autres vaisselles en plastique. De plus, certains dérivés de BPA -comme le BPA tetra-bromé (TBBPA)- possèdent des propriétés de résistance au feu (dites « retardateur de flammes »), permettant leur utilisation dans la fabrication de plastiques résistants au feu. Le BPA est également utilisé sous forme monomérique, dit « libre », comme agent révélateur d'impression des papiers thermiques. Pour cette utilisation, le BPA réagit à la température pour catalyser la réaction de coloration du ticket de caisse lors de l'impression libérant une lactone (donnant la couleur noire).

Ainsi, le BPA est très largement produit mondialement, avec une estimation de 5,4 millions de tonnes pour l'année 2015 (Merchant Research & Consulting Ltd., 2014). Le continent asiatique est le leader dans la production de BPA avec 53% de la production mondiale (~2,9 millions de tonnes). S'ensuivent l'Amérique du Nord et l'Europe avec respectivement 18% (~1 million de tonnes) et 25% de la production mondiale (~1,4 million de tonnes). Durant l'année 2015, la consommation de BPA sur ces trois continents suit les mêmes pourcentages

que leur production (respectivement 56, 18 et 20% de la consommation totale mondiale) (Merchant Research & Consulting Ltd., 2014).

1.2.2 Exposition humaine

De par sa production massive et son utilisation pour ses propriétés mécaniques dans la fabrication de nombreux objets de notre quotidien, l'Homme est grandement exposé et peut absorber du BPA *via* trois voies d'exposition : la voie orale, la voie cutanée et la voie respiratoire.

1.2.2.1 Absorption par voie orale

La voie de contamination majeure de l'Homme par le BPA est par voie orale en raison de l'utilisation de polymères de BPA pour la fabrication des contenants alimentaires/boissons. En effet, les boites de conserves et canettes contiennent, en revêtement interne, des résines époxy de BPA servant à protéger les denrées alimentaires de la corrosion du métal tout en autorisant une bonne conduction de la chaleur nécessaire à la stérilisation du contenu (processus d'Appertisation). Certains emballages plastiques (plats préparés, bouteilles et conteneurs d'eau) contiennent également des polycarbonates de BPA. Pour ces emballages plastiques, l'étiquetage permettant de détecter la présence de BPA n'est pas obligatoire, même s'il est couramment utilisé par les fabricants. En effet, le chiffre 7 ou le sigle PC (polycarbonate) au centre ou en dessous du symbole de recyclage signifie que le produit contient potentiellement du BPA (Figure 5).



Figure 5 : Logo permettant d'indiquer la potentielle présence de BPA dans l'emballage.

Ainsi, lorsque la polymérisation est incomplète lors du processus de formation des résines époxy et polycarbonates de BPA (quantité restante après réaction), du BPA libre résiduel peut migrer directement dans l'aliment ou la boisson qui est en contact.

De plus, malgré leur propriété de forte résistance, les polycarbonates et résines époxy de BPA peuvent se dépolymériser sous certaines conditions. En 1993, Krishnan et al. ont découvert que l'autoclavage de milieu de culture dans des flasques en polycarbonates provoquait la libération d'un composé aux propriétés estrogéniques, identifié comme étant le BPA (Krishnan et al., 1993). Depuis, de nombreuses études ont apporté des précisions quant aux conditions de dépolymérisation des polymères de BPA. Ainsi la température lors de la stérilisation ou l'autoclavage après la mise en conserve, le temps de chauffage, le temps et la température de stockage, et le pH ou le type de contenu sont des paramètres qui conditionnent de manière importante la dépolymérisation et la migration du BPA (Bae et al., 2002; Brotons et al., 1995; Kang and Kondo, 2002; Kang et al., 2003; Takao et al., 2002). Parmi ces paramètres, la température semble jouer le rôle le plus important, pouvant augmenter jusqu'à 55 fois la migration du BPA dans des canettes contenant de l'eau (Kang et al., 2003). De plus, le type de contenu est un facteur non négligeable avec une augmentation de la migration de BPA lors de la présence d'huile végétale, de sel ou de boissons acides de type soda (Kang et al., 2003). De plus, le BPA migre favorablement des matrices liquides pour s'accumuler dans les matrices solides. Ainsi, Goodson et al., ont retrouvé des niveaux élevés de BPA allant de 17 à 380 µg/kg dans les viandes en boîtes et de 20 à 109 µg/kg dans les poissons en boîtes (Goodson et al., 2002). En 2015, l'autorité européenne de la sécurité des aliments (EFSA) a effectué une estimation de l'exposition au BPA *via* l'alimentation chez l'Homme (Tableau 1) : de 0,225 à 0,375 µg/kg de poids corporel/jour chez l'enfant de moins de 3 ans (selon le type d'alimentation) et de 0,116 à 0,132 µg/kg de poids corporel/jour chez l'adulte (Ćwiek-Ludwicka, 2015; EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzymes, Flavourings and Processing Aids (CEF), 2015).

Une autre source de contamination orale par le BPA provient des résines de soin dentaire. En effet, ces résines, servant à combler les caries mais également comme adhésif et matériel de restauration dentaire, contiennent du BPA (Bis-glycidyldiméthacrylate et BPA-diméthylacrylate). Elles sont polymérisées *in situ*, c'est-à-dire directement dans la bouche, avec une efficacité de polymérisation de 60 à 80%, si bien que des études ont montré qu'un pic de BPA libre était présent dans la salive 1h après l'application d'amalgames dentaires à base de BPA (Zimmerman-Downs et al., 2010). Cependant, l'exposition au BPA par voie dentaire reste

un évènement épisodique avec de faibles quantités retrouvées dans la salive, ce qui explique le fait qu'aucune étude ne retrouve d'augmentation de BPA dans le sang après une exposition due essentiellement à des soins dentaires (Kloukos et al., 2013).

Population	Exposition moyenne (µg/kg de poids corporel/jour)	Exposition élevée (95e centile) (µg/kg de poids corporel/jour)
Enfants (1 à 5 jours) *Allaités au sein*	0,225	0,435
Enfants (6 jours à 3 mois) *Allaités au sein*	0,165	0,600
Enfants (4 à 6 mois) *Allaités au sein*	0,145	0,528
Enfants (0 à 6 mois) *Lait infantile, biberons sans BPA*	0,030	0,080
Enfants (6 à 12 mois)	0,375	0,857
Enfants (1 à 3 ans)	0,375	0,857
Enfants (3 à 10 ans)	0,290	0,813
Adolescents (10 à 18 ans)	0,159	0,381
Adultes (18 à 45 ans)	0,132	0,388
Adultes (45 à 65 ans)	0,126	0,341
Personnes âgées (65 ans et plus)	0,116	0,375

Tableau 1 : Estimation selon l'EFSA de l'exposition de l'Homme au BPA par l'alimentation en fonction de l'âge. Tableau adapté de Ćwiek-Ludwicka (Ćwiek-Ludwicka, 2015).

La présence de polymères de BPA dans les jouets pour nourrisson représente également une source d'exposition par voie orale. De plus, les tétines pour bébé peuvent contenir du BPA. Ainsi, il a été mesuré que 0,14 µg/jouet et 0,98 µg/tétine de BPA peuvent migrer dans la salive après 24h (EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzymes, Flavourings and Processing Aids (CEF), 2015). Cette exposition a également été estimée avec une moyenne de 0,2 ng/kg de poids corporel/jour chez l'enfant de moins de 3 ans (Ćwiek-Ludwicka, 2015). Enfin, la

contamination par contact main-bouche et main-aliment-bouche *via* la manipulation de produits contenant du BPA (emballages, papier thermiques…) n'est également pas à négliger. En effet, il a été montré que le BPA présent sur un papier thermique est transféré sur les mains de personnes ayant appliqué des solutions hydro-alcoolique puis sur la nourriture menant à une augmentation du niveau de BPA sanguin et urinaire (~7 ng/mL de BPA libre et 20 µg de BPA total/g de créatinine) (Hormann et al., 2014). De plus, il a été montré que du BPA à 0,05 et 5 mg/kg en exposition sublinguale chez le chien était grandement et efficacement absorbé par la muqueuse orale (70-90%), démontrant une grande biodisponibilité du BPA par cette voie d'exposition (Gayrard et al., 2013).

1.2.2.2 Absorption par voie cutanée

De plus en plus d'études démontrent l'importance de la voie cutanée pour l'absorption du BPA (Bernier and Vandenberg, 2017). En effet, le BPA est utilisé sous forme libre (i.e. non polymérisé) comme révélateur d'impression thermique. Le BPA va libérer de la lactone donnant l'encre noire des tickets de caisse après réaction thermique. Il est donc retrouvé près de 20 mg de BPA par g de papier. Ce BPA libre est reconnu pour être absorbé et métabolisé par la peau (Zalko et al., 2011). Il a été montré que les personnes manipulant de manière répétée des papiers thermiques (par exemple, les agents de caisse) pendant 10h, pourraient en absorber jusqu'à 71µg/jour (Biedermann et al., 2010). Le temps et les conditions de manipulation sont des critères importants. En effet, la manipulation de papier thermique juste après l'utilisation de gel hydro-alcoolique atteint un pic d'exposition au BPA après 45 secondes de manipulation de 581 µg (Hormann et al., 2014). Bien qu'une exposition répétée au BPA par voie cutanée induise un passage de BPA dans l'organisme, il est reconnu que cette exposition ne contribue que très partiellement à l'exposition totale au BPA (Demierre et al., 2012; Mielke et al., 2011; Porras et al., 2014). L'EFSA a estimée l'exposition au BPA par voie cutanée respectivement à 0,069, 0,094 et 0,059 µg/kg de poids corporel/jour chez les enfants de 3 à 10 ans, les adolescents de 10 à 18 ans et les adultes de plus de 18 ans respectivement (Ćwiek-Ludwicka, 2015; EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzymes, Flavourings and Processing Aids (CEF), 2015) (Tableau 2).

Le BPA est également présent en contact avec les produits cosmétiques. En effet, les contenant des produits cosmétiques peuvent contenir des polycarbonates de BPA pouvant migrer dans le produit cosmétique. Ainsi du BPA, en mélange avec des produits qui peuvent

permettre la facilitation du passage transdermique du BPA (laits hydratants, déodorants…), peut se retrouver directement en contact avec la peau. L'EFSA a estimé l'exposition moyenne du BPA par les cosmétiques de 0,002 à 0,005 µg/kg de poids corporel/jour chez l'enfant (0 à 10 ans) et 0,002 à 0,003 µg/kg de poids corporel/jour chez les adolescents et adultes (Ćwiek-Ludwicka, 2015; EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzymes, Flavourings and Processing Aids (CEF), 2015) (Tableau 2).

Source et voie d'exposition	Groupe d'âge de la population	Exposition moyenne (µg/kg de poids corporel/jour)	Exposition élevée (µg/kg de poids corporel/jour)
Papiers thermiques (cutanée)	Bébés (0-1 an)	non applicable	non applicable
	Tout-petits (1-3 ans)	non applicable	non applicable
	Enfants (3-10 ans)	0,069	0,550
	Adolescents (10-18 ans)	0,094	0,863
	Adultes (> 18 ans)	0,059	0,542
Cosmétiques (cutanée)	Bébés	0,005	0,009
	Tout-petits	0,003	0,005
	Enfants	0,002	0,004
	Adolescents	0,003	0,005
	Adultes	0,002	0,004

Tableau 2 : Estimation selon l'EFSA de l'exposition de l'homme au BPA par voie cutanée en fonction de l'âge. Tableau adapté de Ćwiek-Ludwicka (Ćwiek-Ludwicka, 2015).

1.2.2.3 Absorption par voie aérienne

Le BPA peut également migrer dans les poussières par exemple à partir de parquets laminés, d'adhésifs contenant des résines époxy de BPA mais également lors de l'érosion ou la combustion des objets contenant du BPA dans les décharges publiques (Fu and Kawamura, 2010; Konieczna et al., 2015; Owens et al., 2007). De plus, l'érosion des objets contenant du TBBPA (retardateur de flamme) représente une des principales contaminations de l'air ambiant au BPA (Abdallah et al., 2008). Une récente étude a montré que des poussières intérieures et extérieures provenant d'une école maternelle en Chine contenaient respectivement 2,86 et 3,23 µg de BPA par g de poussière (Lv et al., 2016). Ces poussières peuvent se disperser et contaminer l'air ambiant. L'exposition au BPA par voie aérienne représenterait 0,35 ng/kg de

poids corporel/jour chez l'adulte et 5,63 ng/kg de poids corporel/jour chez l'enfant en Caroline du Nord et dans l'Ohio (Loganathan and Kannan, 2011).

L'exposition des travailleurs dans l'industrie des plastiques et résines époxy est évidemment plus importante. En effet, une étude a montré qu'une industrie de peinture liquide en Finlande pouvait voir ses travailleurs exposés à un maximum de 220 µg/m^3 de BPA (dans l'air) par rapport à leur surface de travail, ce qui correspondrait à une exposition de 31,4 µg/kg de poids corporel/jour (Heinälä et al., 2017).

L'EFSA a estimé l'exposition moyenne du BPA par voie aérienne à 0,7 et 0,2 ng/kg de poids corporel/jour chez l'enfant (0 à 3 ans) et chez les adultes respectivement (Ćwiek-Ludwicka, 2015; EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzymes, Flavourings and Processing Aids (CEF), 2015).

1.2.3 Métabolisme et niveaux circulants du BPA

De par la forte exposition et les différentes voies d'absorption pouvant s'agréger (i.e. orale, cutanée et aérienne), le BPA libre se retrouve donc directement dans l'organisme où il peut être métabolisé.

1.2.3.1 Métabolisme

L'absorption puis le métabolisme du BPA par la cellule est grandement favorisé par les propriétés physico-chimiques du BPA. En effet, cette molécule organique a un faible poids moléculaire (228,28 g/mol) et est modérément lipophile (K_{ow} = 3,2). Il est donc suspecté que le BPA puisse diffuser passivement dans la cellule (Zalko et al., 2011). La détoxification des xénobiotiques, c'est-à-dire les éléments étrangers et non naturels comme le BPA, se fait par des enzymes visant tout d'abord à rendre le composé réactif (phase I) pour pouvoir le conjugué avec des molécules fortement hydrosolubles (phase II) et ainsi faciliter son excrétion (Braniste et al., 2011) (Figure 6).

La métabolisation du BPA dépend de la méthode d'exposition ainsi que de l'espèce étudiée. Chez l'Homme, par voie orale, le BPA est absorbé par l'intestin puis va rejoindre la

circulation sanguine systémique où il va ensuite être dirigé vers le foie pour subir sa détoxification. La principale voie de détoxification du BPA dans le foie est la glucuronidation (~80%) par l'uridine diphosphate glucuronyltransférase (UDPGT) qui va permettre son élimination rapide de l'organisme par les urines (temps de demi-vie = 5,3 h) (Gerona et al., 2013; Pottenger et al., 2000; Völkel et al., 2002). D'autres voies de métabolisation du BPA existent mais restent minoritaires (1 à 4%). Parmi elles, le transfert de glutathion ou de quinone, la sulfatation et l'hydroxylation du BPA sont les plus représentés (Hauck et al., 2016; Michałowicz, 2014) (Figure 6). Malgré tous ces systèmes de détoxification, du BPA libre persiste dans l'organisme (à hauteur de 16%) (Kasper-Sonnenberg et al., 2012).

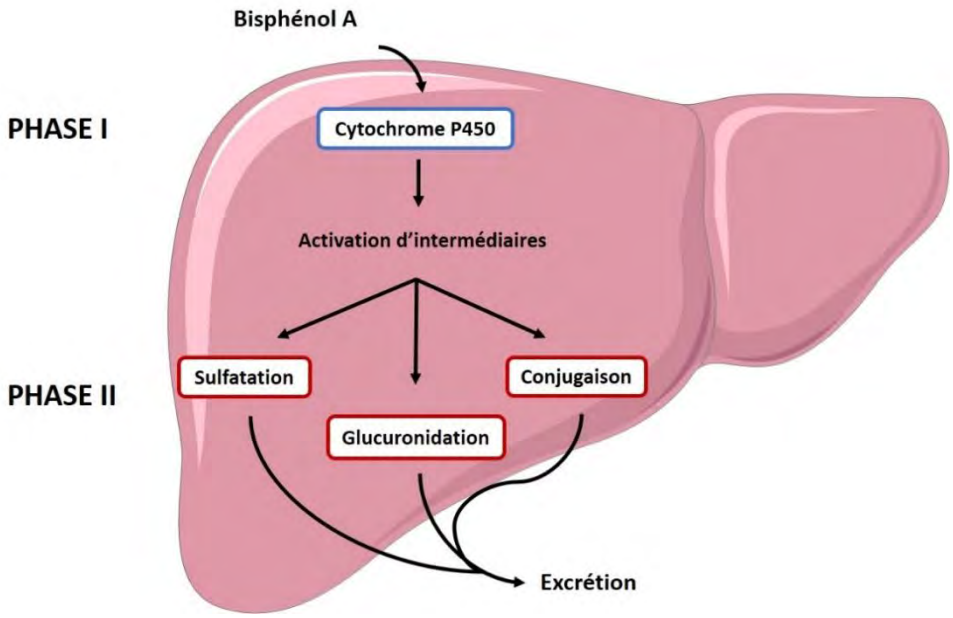


Figure 6 : Schéma représentant les différentes formes de détoxification du BPA par le foie chez l'Homme.

Chez les rongeurs, le BPA ingéré par voie orale suit une voie de métabolisation différente. En effet, l'élimination du BPA est beaucoup plus lente chez le rongeur du fait de la succession de cycles entéro-hépatiques : après absorption du BPA par l'intestin et métabolisation par le foie, celui-ci est excrété par la bile et se dissocie *via* notamment la flore bactérienne pour revenir à sa forme libre où il peut être réabsorbé par l'intestin (Claus et al., 2016; Pottenger et al., 2000). Le BPA est ainsi majoritairement excrété par les fèces et peu par

les urines chez le rongeur. De tels mécanismes de dissociation par le microbiote intestinal ne sont pas référencés chez l'Homme dans la littérature. Cependant, la β-Glucuronidase, enzyme permettant la déglucuronidation, est présente dans de nombreux tissus humains, dont l'intestin, le placenta et le foie fœtal, ce qui pourrait expliquer la persistance de BPA libre dans l'organisme (Ginsberg and Rice, 2009).

Chez le fœtus, la machinerie enzymatique de détoxification du BPA n'est mise en place que lors des dernières étapes de développement fœtal, laissant le fœtus dans les premières étapes de développement sans protection contre une exposition au BPA libre (Corbel et al., 2015). De plus, chez le nouveau-né, du fait d'un système enzymatique non complètement développé et de la compensation incomplète par la voie de sulfatation du BPA, la capacité de glucuronidation du BPA est réduite d'un facteur 20 par rapport à l'adulte, favorisant également la présence de BPA libre chez l'individu (Mielke and Gundert-Remy, 2009).

Pour les voies d'exposition minoritaires, comme la peau et les poumons, très peu d'études référencent le métabolisme du BPA. L'une d'entre elles a démontré que des explants de peau de cochon et d'humain pouvaient métaboliser le BPA et mettre en place les phases I et II de détoxification, transformant le BPA en BPA-glucuronide et BPA-sulfate en quantités équivalentes (Zalko et al., 2011).

1.2.3.2 Niveaux circulants

La métabolisation du BPA chez l'Homme ainsi que sa détoxification incomplète sont une des causes de l'imprégnation importante par ce composé des populations des pays industrialisés. On retrouve donc des niveaux circulant de BPA libre ou conjugué non négligeables dans le sang (systémique) et dans les urines (détoxification) de ces populations. De plus, du fait de la circulation du BPA au niveau systémique, celui-ci est présent dans l'ensemble de l'organisme, incluant des organes clés des grandes fonctions physiologiques (cerveau, cœur, poumons, intestins…).

Les concentrations plasmatiques de BPA libres et/ou conjugués chez l'Homme sont souvent proches de la limite de quantification. Les données des concentrations plasmatiques diffèrent en fonction de l'âge, du type de population et des pays ciblés. Cependant, la grande majorité des échantillons sanguins contiennent des concentrations totales (conjugué et

déconjugué) de BPA inférieures à 10 ng/mL (Mikołajewska et al., 2015). Ainsi, dans une étude de 2009 à grande échelle sur le sang humain, une équipe française a montré que 83% des échantillons collectés de manière aléatoire dans les hôpitaux français contenaient du BPA libre, avec des concentrations supérieures à 2 ng/mL pour 12% de ces échantillons (Kaddar et al., 2009). En Chine, 17% des échantillons testés présentaient du BPA total (conjugué et déconjugué), avec une concentration moyenne de 2,84 ng/mL (He et al., 2009).

Tous ces résultats ont été obtenus sur des individus sains, cependant certains états physiologiques et médicaux augmentent les concentrations sanguines de BPA. En effet, il a été rapporté que les femmes enceintes présentaient un taux de BPA libre sanguin allant jusqu'à 22,3 ng/mL (Padmanabhan et al., 2008). De plus, les fœtus (Allemagne) et nouveau-nés (Etats-Unis) sont également plus susceptibles à la contamination par le BPA avec des taux allant de 0,2 à 9,2 ng/ml et de 1,6 à 946 ng/ml (total) respectivement (Calafat et al., 2009; Schönfelder et al., 2002). Ceci est très probablement dû, comme cité précédemment, à leur faible capacité de glucuronidation du BPA (Mielke and Gundert-Remy, 2009). Un autre facteur important à prendre en compte est l'exposition des individus aux matériels médicaux. En effet, il a été démontré que plus de 70% des dialysés présentaient des taux de BPA libre sanguin supérieurs à 10 ng/mL (Kaddar et al., 2009).

Les concentrations de BPA libres et/ou conjugués dans le sang sont en général plus faibles que celles retrouvés dans les urines. De plus, les concentrations de BPA sanguin diminuent rapidement après exposition, ce qui favorise la prise de mesures dans les urines comme indicateur d'exposition. Ainsi, il est désormais admis que le BPA est détecté dans les urines de près de 90% des pays industrialisés (Genuis et al., 2012). Cependant, ce pourcentage reflète le BPA total présent dans les urines (i.e. la combinaison de BPA conjugué et libre). En effet, Calafat et collaborateurs ont mesuré aux Etats-Unis des taux de BPA total allant de 0,36 à 2,07 ng/mL avec une fréquence de 74 à 99% des échantillons testés durant les années 2000 à 2014 ; alors qu'en Europe, l'équipe de Völkel n'a retrouvé du BPA libre que dans 22 échantillons archivés sur 315 (taux inférieurs à 2,5 ng/mL) et du BPA total dans 147 échantillons (pourcentage non révélé) avec des taux allant jusqu'à 9,3 ng/mL (Völkel et al., 2008; Ye et al., 2015). Le BPA (conjugué ou non) est donc désormais omniprésent dans les urines des populations des pays industrialisés mais la présence de BPA libre dans les urines fait encore débat car les données diffèrent selon les études. Cependant, comparativement aux niveaux sanguins, un fort taux de BPA urinaire est retrouvé chez les femmes enceintes et les

enfants en bas âge comparé à celui des adultes. En effet, une étude américaine a montré des taux de BPA total moyen de 4,61 ng/mL chez des femmes enceintes (variation non décrite) (Gerona et al., 2016). Les concentrations urinaires de BPA total chez les nouveau-nés sont compris entre 0,1 et 11,21 ng/mL (Nachman et al., 2015).

De telles concentrations sanguines et urinaires chez les femmes enceintes laissent supposer que le BPA peut être retrouvé dans le liquide amniotique ainsi que dans le lait maternel. En effet, le BPA étant lipophile, il peut s'accumuler dans le tissu adipeux viscéral et mammaire et donc dans le lait maternel. Dans une étude américaine, le BPA libre a été détecté dans 62% des échantillons de lait maternel avec des concentrations comprises entre 0,22 et 10,8 ng/mL (Zimmers et al., 2014). Une autre étude aux Etats-Unis révèle la présence de BPA total et libre dans respectivement 80 et 45% des liquides amniotiques de femmes enceintes dans leur second trimestre de grossesse (concentrations allant jusqu'à 0,75 ng/mL pour le BPA total et de 0,31 à 0,43 ng/mL pour le BPA libre) (Edlow et al., 2012). Ces concentrations diminuent lors du troisième trimestre jusqu'à n'être détectable que dans 10% des échantillons. Ces concentrations dans le liquide amniotique et dans le lait maternel sont alarmantes et peuvent expliquer les niveaux retrouvés chez le fœtus et le nouveau-né.

1.2.4 Mécanismes d'action du Bisphénol A

Le BPA est un composé dont la conformation structurale est proche de celle de l'estrogène (17β-estradiol), ce qui le classe dans la catégorie des composés estrogéno-mimétiques. Il est, de plus, un composé synthétique non endogène, c'est-à-dire un xénobiotique, que le corps considère comme élément étranger. De part ces propriétés, le BPA a donc plusieurs cibles potentielles avec lesquelles il peut interférer au niveau cellulaire.

1.2.4.1 Activité sur les récepteurs aux estrogènes nucléaires

Le bisphénol A est un estrogéno-mimétique, ce qui lui confère la capacité à se lier aux 2 sous-types des récepteurs nucléaires au œstrogènes (ER) : ERα et ERβ. Ces récepteurs sont présents dans de nombreux tissus et types cellulaires mais il existe des différences importantes dans leurs modèles d'expression. En effet, ERα est le sous-type majoritaire exprimé dans

l'endomètre, les cellules stromales ovariennes, dans l'épithélium du spermiducte et dans l'hypothalamus, alors qu'ERβ est plutôt retrouvé en plus forte expression dans les cellules de la granulosa, le rein, le cerveau, l'os, le cœur, les poumons, la muqueuse intestinale, la prostate et les cellules endothéliales (Houdeau, 2016). Une fois activés, les ER nucléaires changent de conformation et migrent du cytosol vers le noyau où ils vont interagir avec les promoteurs de réponse aux estrogènes (ERE) afin d'activer la transcription de très nombreux gènes cibles (Figure 7) qui contribuent au bon développement et à la régulation de nombreuses fonctions, en particulier la fertilité et les caractères sexuels secondaires (morphologie, pilosité, comportement…). Bien qu'ayant la capacité de se lier aux ER, le BPA présente 1000 à 10000 fois moins d'affinité aux ER comparé au 17β-estradiol circulant, avec des affinités relatives de liaison de 0,073% et 0,75% pour ERα et ERβ respectivement lorsque l'estradiol est considéré à 100% (Routledge et al., 2000). Le BPA a une activité estrogénique différente en fonction du type d'ER et du type cellulaire : agoniste pour ERβ et agoniste et antagoniste pour ERα, ce qui le classe parmi les SERM (*Selective Estrogen Receptor Modulator*) (Kurosawa et al., 2002). Les SERM sont des composés à activités agonistes partielles, variant selon le promoteur du gène et le type cellulaire/tissulaire étudié. Le BPA se fixe de façon sélective, en fonction de l'organe et du type cellulaire, à ERα ou ERβ entrainant des spécificités dans le recrutement de co-activateurs. Ainsi, le BPA en liaison avec ERβ montre une meilleure capacité de recrutement du co-activateur TIF2 (*Transcriptional mediators/Intermediary Factor 2*) comparé à la liaison avec ERα (Routledge et al., 2000). L'activité transcriptionnelle du BPA par les ER est également différente de celle du 17β-estradiol. En effet, il a été montré que le 17β-estradiol augmentait le poids de l'utérus des souris corrélé avec une activité peroxydase et une augmentation de l'expression du récepteur à la progestérone alors que le BPA augmente seulement l'activité peroxydase et l'expression du récepteur à la progestérone sans changement du poids de l'utérus (Gould et al., 1998; Nagel et al., 2001). Ces réponses dites génomiques sont lentes puisqu'elles nécessitent la mise en place de la machinerie transcriptionnelle, ce qui prend plusieurs heures.

1.2.4.2 Activité sur les récepteurs aux estrogènes membranaires

Le BPA, tout comme l'estradiol, peut induire des réponses rapides (de l'ordre de quelques minutes) dites non-génomiques et ne passant pas par des récepteurs nucléaires (Bolli et al., 2008; Marino et al., 2012). En effet, il existe une petite proportion d'ERα qui se présente sous forme palmitoylée et localisée à la membrane plasmique en association avec la Caveolin

1 (Acconcia et al., 2005; Galluzzo et al., 2007). Ces récepteurs vont, une fois activés, réguler la voie des MAPKinases et PI3K/AKT. Aussi, il a été démontré que le BPA, en agissant sur l'ERα membranaire, permet la libération de Ca^{2+} intracellulaire, pouvant mener à des changements dans la motilité cellulaire, les voies de signalisation et l'exocytose (Wozniak et al., 2005). Une autre réponse non-génomique du BPA proviendrait du récepteur transmembranaire GPR30 (*G-Protein Coupled Receptor 30*) qui est lui aussi un récepteur aux estrogènes. Ces récepteurs membranaires couplés à la protéine G sont exprimés (d'un point de vu transcriptionel) dans de nombreux organes dont le cœur, le cerveau, les poumons, les ovaires, l'intestin grêle et le colon, chez l'Homme et la souris (Olde and Leeb-Lundberg, 2009). Le BPA possède une affinité relative de liaison au GPR30 de 2,83%, bien supérieure à celles aux ER nucléaires (Thomas and Dong, 2006). Alonso-Magdalena et collaborateurs ont montré que le BPA, à des concentrations de l'ordre du nanomolaire, était capable d'influencer les oscillations du Ca^{2+} cytosolique dans des cellules isolées des ilots pancréatiques et ce, selon un mécanisme GPR30-dépendant (Alonso-Magdalena et al., 2005).

Ainsi l'activité du BPA sur les ER mène à des effets complexes de par la synergie des différentes voies de signalisation impliquées (ER nucléaires et membranaires) dont l'activation dépend également de la localisation et du sous-type cellulaire (Figure 7). *In vivo*, ces effets se traduisent par des troubles multiples du développement des organes sexuels et de la différenciation sexuelle cérébrale, avec des effets importants lors d'une exposition périnatale (Honma et al., 2002; Howdeshell et al., 1999).

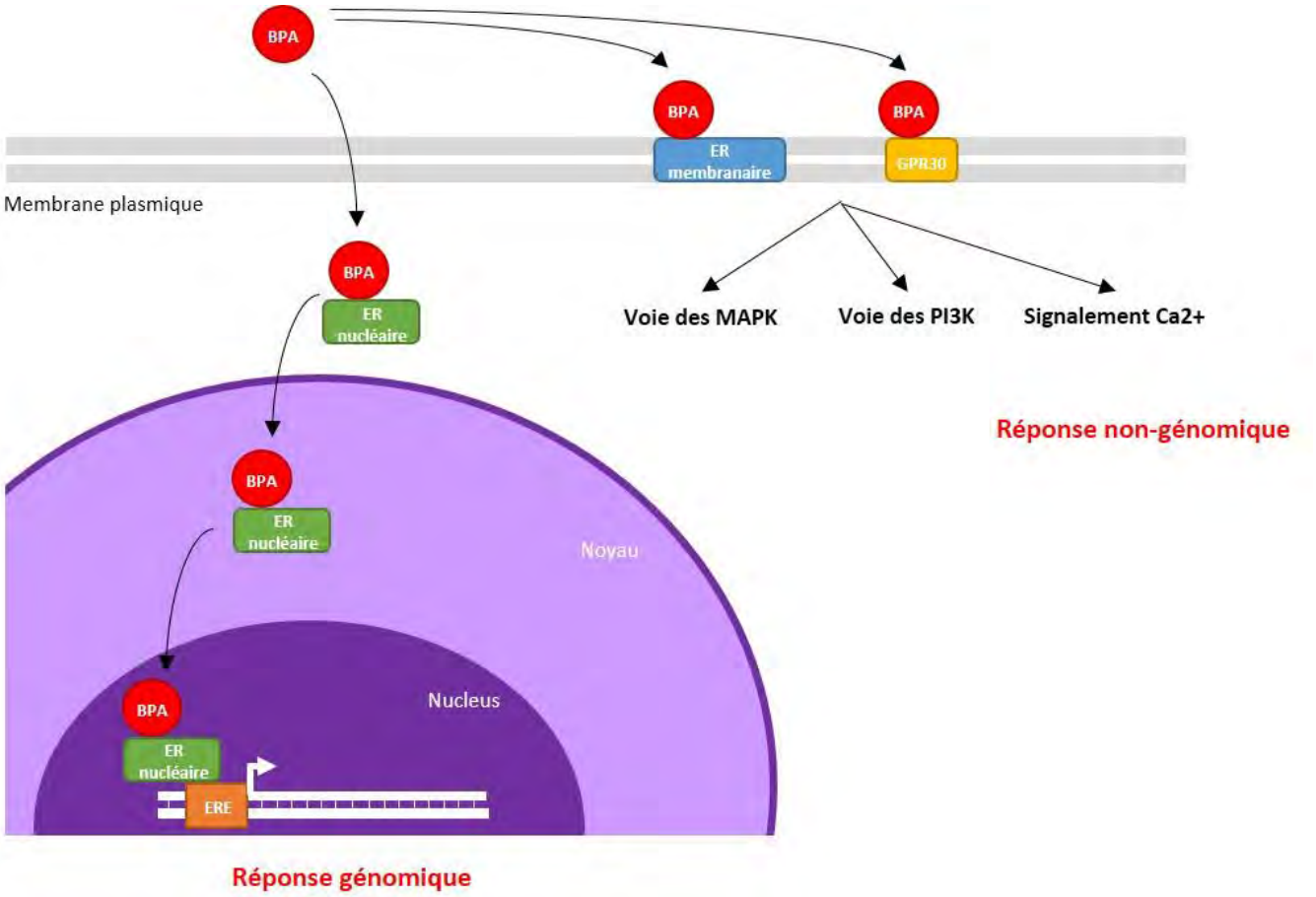


Figure 7 : Schéma simplifié de l'activité du BPA sur les ER nucléaires versus membranaires illustrant le type de réponse génomique et non-génomique.

1.2.4.3 Activité sur les récepteurs aux androgènes

Les récepteurs aux androgènes (RA) sont des récepteurs cytosoliques qui migrent vers le noyau une fois activés par leurs ligands (testostérone, dihydrotestostérone) afin de réguler l'expression de nombreux gènes. Ils sont exprimés dans les organes sexuels mâles ou femelles ainsi que dans certains tissus comme le muscle cardiaque, les muscles lisses vasculaires et les cellules thyroïdiennes. Ces récepteurs partagent de grandes similarités dans leurs localisations cellulaires et leurs mécanismes d'action avec les ER. Ces récepteurs servent notamment au bon développement et à la fonctionnalité des caractères sexuels masculins. Il est admis que le BPA se lie aux RA et agit comme antagoniste de ces récepteurs aux fortes concentrations (concentration inhibitrice médiane (IC_{50}) : 1-2 µM) (Teng et al., 2013; Wetherill et al., 2005). Teng et al. a montré dans la lignée cellulaire rénale de singe CV1 que le BPA inhibe l'activité

des RA par compétition dès 500 nM, empêchant la translocation nucléaire et la formation de foyers fonctionnels dans les noyaux. L'activité transcriptionnelle des androgènes naturels sur leurs récepteurs est donc diminuée en présence de BPA. De tels troubles se répercutent *in vivo* par à un défaut de fonctionnalité du système reproductif mâle et femelle (Walters et al., 2010).

1.2.4.4 Activité sur les récepteurs aux hormones thyroïdiennes

Les récepteurs aux hormones thyroïdiennes (THR) sont activés par les hormones thyroïdiennes thyroxine (T4) et tri-iodothyronine (T3). Ces récepteurs servent au développement cérébral et plus largement à la régulation du métabolisme et du rythme cardiaque (Yen, 2001; Zoeller, 2010). Les THR sont localisés dans le noyau où ils sont constitutivement réprimés par leurs co-répresseurs NCoR (*Nuclear Co-Repressor*) et SMRT (S*ilencing Mediator for Retinoid or Thyroid-hormone receptors*). Lors d'une réponse T3, ces co-répresseurs sont remplacés par des co-activateurs de transcription des gènes médiés par les THR. Il a été démontré *in vivo* que le BPA, à faible concentration (100 nM), inhibe l'activité de T3 sur THR, menant à des effets anti-métamorphiques chez *Xenopus laevis* (Iwamuro et al., 2006). L'un des mécanismes suspecté est la compétition avec l'hormone T3 pour la fixation sur les THR, ce qui empêcherait la levée des co-répresseurs et donc la transcription des gènes cibles (Moriyama et al., 2002) (Figure 8).

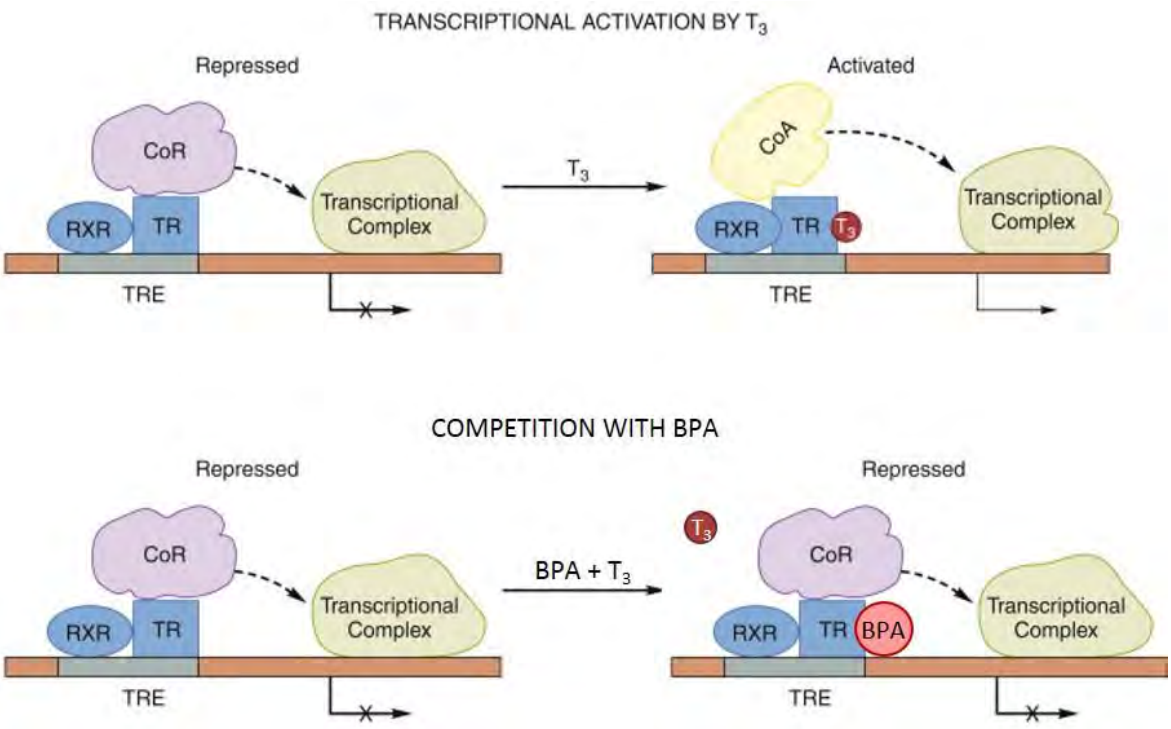


Figure 8 : Mécanisme suspecté de l'effet du BPA sur les THR. Figure adaptée d'Ortiga-Carvalho et al., 2014. TR : THR, CoR/A : Co-répresseur/activateur, RXR : Récepteur X des rétinoïdes.

1.2.4.5 Activité sur les récepteurs constitutifs androstane (CAR) et pregnane X (PXR)

Les récepteurs constitutifs androstane (CAR) et pregnane X (PXR) sont des détecteurs des produits toxiques provenant de métabolites endogènes et des contaminants exogènes. Ils permettent leur élimination de l'organisme. Ces récepteurs sont également localisés dans le noyau et coordonnent l'élimination des xénobiotiques dans le foie et l'intestin en induisant la transcription de gènes impliqués dans le métabolisme et le transport des xénobiotiques (Chai et al., 2013). PXR est donc activé par de nombreux xénobiotiques dont le BPA. Il a été montré que le BPA à fortes concentrations (5 à 20 µM) agit comme un agoniste de PXR dans la lignée cellulaire humaine LS180 (adénocarcinome du côlon) surexprimant le PXR humain, mais pas sur cette même lignée surexprimant le PXR murin (Sui et al., 2012). Dans cette même étude, les auteurs ont déterminé qu'un composé activateur de PXR devait comprendre au moins un groupement phénolique en *para*, ce qui est le cas pour le BPA. De plus, ils ont également montré

que le BPA pouvait agir en synergie avec d'autres xénobiotiques (toujours à forte dose) sur l'activation de PXR. De même, il a été démontré *in vitro* que le BPA à des concentrations de 100 nM et 10 µM agit comme un agoniste de CAR, ce qui peut contribuer à la promotion de l'hepatocarcinogénèse (DeKeyser et al., 2011; Takizawa et al., 2011).

1.2.4.6 Activité sur les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxysomes (PPAR)

Les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxysomes (PPAR) sont des récepteurs nucléaires dont les ligands sont les lipides. Ils agissent comme facteur de transcription de gènes cibles impliqués dans le métabolisme et l'adipogenèse. Il existe 3 isoformes de PPAR : α, γ et β/δ, qui diffèrent selon leur fonction et leur localisation dans l'organisme. PPARα est principalement exprimé dans le cœur, le foie, les reins, les muscles et le tissu adipeux. PPARγ est exprimé lui aussi principalement dans le cœur, les reins, les muscles et le tissu adipeux, mais également dans le pancréas, le côlon et les macrophages. PPARβ/δ est aussi exprimé dans plusieurs tissus mais de façon importante dans la peau, le cerveau et le tissu adipeux. Il a été démontré qu'une exposition périnatale au BPA chez le rat modifie l'adipogenèse par surexpression de certains gènes lipogéniques comme PPARγ (Somm et al., 2009). Ces résultats ont été confirmés *in vitro*, montrant une faible activation de PPARγ par le BPA à une concentration de 1 à 50 µM dans la lignée 3T3-L1 (lignée fibroblastique murine) et à partir de 10µM dans un système de reporter luciférase (Pereira-Fernandes et al., 2013; Wang et al., 2010). De plus, certains dérivés du BPA présents dans notre environnement, comme le TBBPA, se lient très fortement à PPARγ avec des efficacités d'activation très supérieures à celle du BPA seul (ordre du nM) (Riu et al., 2011). Le BPA, de manière dose-dépendante, permet aussi la différenciation de la lignée fibroblastique 3T3-L1 en adipocytes et ce, sous la dépendance de PPARγ (Ahmed and Atlas, 2016).

1.2.4.7 Activité sur le récepteur aux hydrocarbures aromatiques

Le récepteur aux hydrocarbures aromatiques (AhR) est un récepteur cytoplasmique impliqué dans la régulation des réponses biologiques contre les hydrocarbures aromatiques et dans la métabolisation des xénobiotiques *via* l'expression des enzymes du cytochrome P450. Il

est également impliqué dans l'homéostasie de la barrière intestinale en permettant la prolifération des cellules souches des cryptes, la survie des lymphocytes intestinaux épithéliaux et cellules lymphoïdes innées et le maintien de la charge bactérienne intestinale (Cella and Colonna, 2015; Stockinger et al., 2014). De plus, il entre dans le processus de différenciation des lymphocytes T helper 17 (Th17) et des T régulateurs (Treg) (Zhou, 2016). Une fois activé, ce récepteur est transloqué dans le noyau où il va former un hétérodimère avec la protéine ARNT (*Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator*), formant un complexe d'activation transcriptionnelle reconnaissant la *dioxin response element* (DRE). Cette association va permettre la transcription des enzymes de métabolisation du cytochrome P450 CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1 et de son propre répresseur AhRR. Ce répresseur se lie à l'ARNT empêchant l'activation de AhR et concluant la cascade de signalisation (Figure 9).

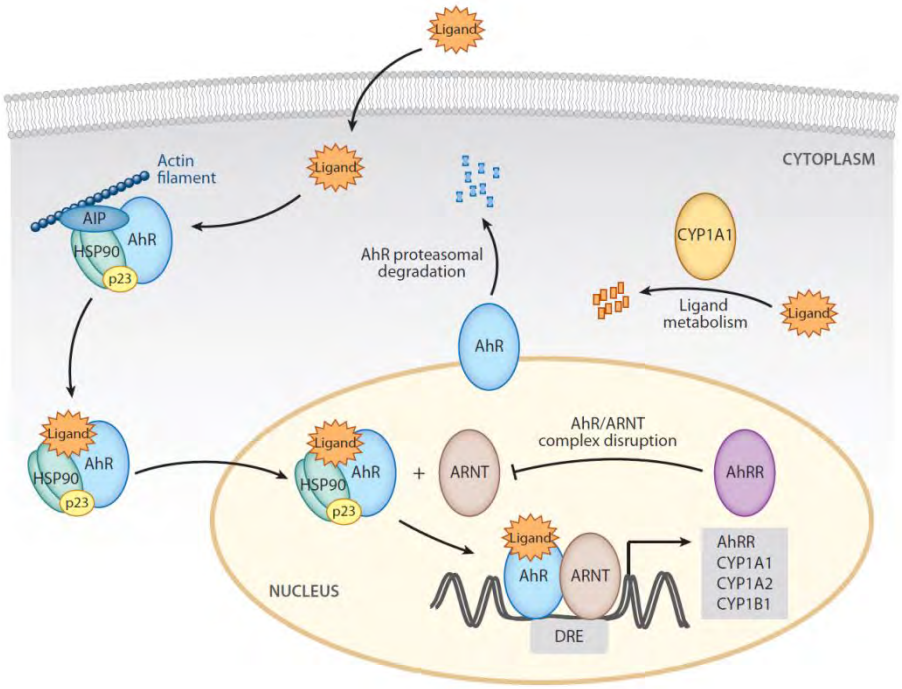


Figure 9 : Schéma représentant la voie de signalisation de AhR (Stockinger et al., 2014).

Le BPA, par son caractère xénobiotique et sa structure composée de cycles hydrocarbonés, a la capacité de se lier à AhR à forte concentration (i.e. ≥ 10 µM) (Krüger et al.,

2008). Cependant, son mode d'action sur ce récepteur fait encore l'objet de controverse. En effet, il a été démontré, dans des embryons murins, que le BPA à 200 µg/kg de poids corporel/j augmente de manière dose-dépendante l'activité transcriptionnelle de AhR pour CYP1A1 et AhRR (Nishizawa et al., 2005). Cependant, Bonefeld-Jørgensen et al. a démontré *in vitro* que le BPA à 10-100 µM inhibe l'activité d'AhR dans un système de reporter à la luciférase utilisant une lignée d'hépatocyte murin (Bonefeld-Jørgensen et al., 2007). Une fois de plus, il semble que le BPA ait des effets différents selon le type cellulaire sur l'activité de AhR.

De plus, il existe un cross-talk entre l'hétérodimère AhR-ARNT et les ER, complexifiant l'interprétation de certains résultats. En effet, il a été démontré que ce complexe s'associe avec ERα et ERβ, résultant par l'activation de la transcription des gènes cibles des ER (Ohtake et al., 2003). Cependant, l'effet anti-estrogenique du complexe AhR-ARNT activé est beaucoup plus largement décrit (Matthews, 2006; Shanle and Xu, 2011). Le mécanisme de ce cross-talk reste non élucidée et peut-être la résultante de différents mécanismes moléculaires (protéolyse augmentée, inhibition directe, synthèse d'un facteur inhibiteur…).

1.2.5 Effets « santé » du BPA

Bien que le lien entre les effets toxiques du BPA et son activité de ligand aux récepteurs précédemment décrits est souvent au cœur du débat scientifique, l'exposition chronique aux faibles doses de BPA est susceptible de conséquences physiopathologiques selon le type d'exposition.

1.2.5.1 Effets d'une exposition directe

Les premiers effets santé imputés au BPA ont portés sur la fertilité et la mise en place de la puberté. En effet, des recherches ont été menées afin d'apporter une explication à la diminution générale de la fécondité chez l'Homme au fil des années. L'une des explications incrimine la contamination de l'Homme par les PE, dont le BPA. En effet, des taux élevés de BPA dans l'urine ont été corrélés avec une diminution du nombre de spermatozoïdes, de leur motilité et de leur viabilité (Li et al., 2011a; Skakkebaek et al., 2011). Ce résultat est également retrouvé dans une étude chez la souris femelle, où il a été démontré que le BPA à très faible

dose (25 ng/kg de poids corporel/j) pendant 30 jours diminue leurs capacités reproductrices (Cabaton et al., 2011). Le BPA est également impliqué dans la pathogénicité du syndrome de l'ovaire polykystique. Ce syndrome mène à un cycle menstruel dérèglé, des troubles de la fertilité et à l'obésité. Il a été montré une corrélation positive entre des patientes présentant ce syndrome et les concentrations sanguines de BPA (Takeuchi et al., 2004).

Le deuxième effet étudié porte sur la sévérité des cancers et plus particulièrement celui du cancer du sein. Le cancer du sein est un des cancers pouvant être hormono-sensible, c'est-à-dire avec augmentation de la sévérité en présence d'hormones sexuelles, comme l'estradiol (Samavat and Kurzer, 2015). Or le BPA mimant l'action de l'estradiol, des études *in vitro* et corrélatives ont été menées afin d'appréhender la possible implication du BPA dans la survenue de ce cancer. La première étude démontrant l'estrogénicité du BPA a montré une augmentation de la prolifération des cellules MCF-7 (lignée cancéreuse mammaire) positives aux récepteurs aux estrogènes, lors d'une exposition à 25 ou 50 nM de BPA (Krishnan et al., 1993). De plus, une étude chez des femmes ménopausées a également révélé une corrélation positive entre niveaux sanguins de BPA et densité mammographique du tissu mammaire (marqueur de risque cancéreux) (Sprague et al., 2013).

Un autre type de cancer impacté par le BPA est le cancer de la prostate. En effet, des études *in vitro* ont montré que le BPA à faible concentration (1nM) induit la prolifération de cellules cancéreuses prostatiques humaines androgène-sensibles (Wetherill et al., 2002). Cet effet a été confirmé par une étude *in vivo* chez le rat où le BPA à 50µg/kg de poids corporel/jour en exposition fœtale augmente le poids de la prostate (marqueur de risque cancéreux) et par une étude *in vitro* où le BPA à 1 nM augmente la prolifération des cellules de séminome testiculaire humain (Chevalier et al., 2012; Gupta, 2000). De plus, une étude conduite chez l'Homme a montré une corrélation positive entre concentration de BPA urinaire et présence de cancer de la prostate (Tarapore et al., 2014).

De plus, la présence de BPA compromet également l'efficacité des chimiothérapies, pouvant mener à la chimiorésistance de certains cancers (Idelman et al., 2011).

Le BPA a de nombreux impacts sur la réponse immunitaire. En effet, il a été démontré *in vitro* et *ex vivo* que le BPA à 100 µM et 3 µM respectivement, a la capacité d'induire l'expression de cytokines pro-allergiques (Guo et al., 2010; Tian et al., 2003). De plus, une exposition au BPA à 10µM perturbe l'homéostasie des cellules immunitaires *ex vivo*, en

impactant la différenciation des cellules dendritiques et menant vers l'augmentation du ratio de cellules immunitaires impliquées dans les maladies auto-immunes (Kharrazian, 2014).

D'autres impacts du BPA, très étudiés ces dernières années, portent sur le développement du système immunitaire intestinal et sur l'occurrence de l'obésité. Cependant, dans le cadre de cette thèse, ces effets seront détaillés dans le chapitre II et III des données bibliographiques.

1.2.5.2 Effets d'une exposition périnatale

La période périnatale, comprenant toute la durée de la gestation et de la lactation, est une fenêtre critique d'exposition pour les perturbateurs endocriniens et notamment le BPA. Les hormones sont des molécules primordiales pour le développement du fœtus et du nouveau-né. Une perturbation dans leurs régulations peut donc avoir des conséquences graves pour le développement de l'enfant avec des répercutions à l'âge adulte. Comme décrit précédemment, le BPA est présent dans le liquide amniotique et le lait maternel, exposant le fœtus et le nouveau-né au BPA. Le fœtus peut être exposé par la mère *via* passage du BPA conjugué par le placenta, où une déconjugaison transplacentaire est possible, puis par le cordon ombilical (Figure 10) (Balakrishnan et al., 2010). De plus, le fœtus ne possède pas l'équipement enzymatique nécessaire à la glucuronidation du BPA pour le détoxifier, favorisant ainsi son exposition au BPA libre. Le BPA libre étant un estrogéno-mimétique, il est susceptible d'induire de multiples effets lorsqu'il est administré pendant la période périnatale.

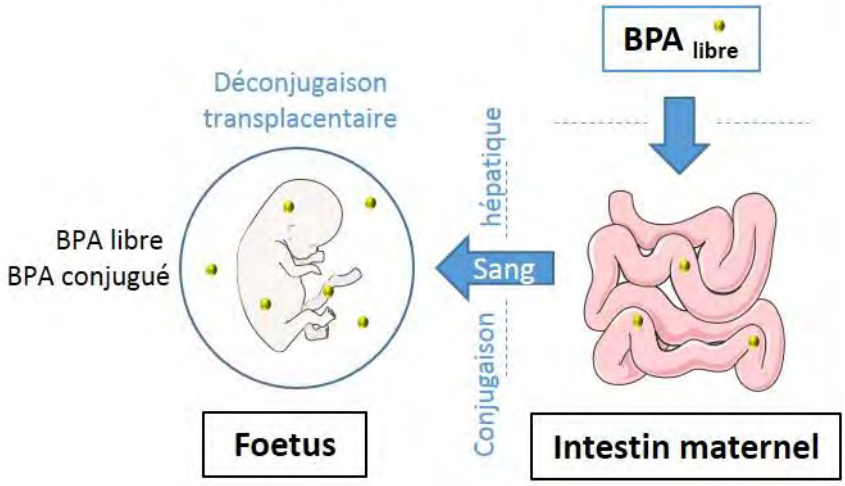


Figure 10 : Schéma simplifié du passage maternel du BPA vers le fœtus. Figure adaptée de Houdeau, 2011.

Premièrement, l'exposition périnatale au BPA a des impacts sur le développement sexuel. L'un des premiers effets mis en évidence est le développement d'une puberté précoce. En effet, des expériences d'exposition prénatale au BPA allant de 2 à 2,5 µg/kg de poids corporel/j ont montré une puberté plus précoce chez la souris femelle (Honma et al., 2002; Howdeshell et al., 1999). Chez le rat, le BPA à 50 et 1200 µg/kg de poids corporel/jour a également des effets sur les périodes des chaleurs rallongeant leurs durées, et sur la production de l'hormone lutéinisante (LH) et l'expression d'ERα, augmentées lors de l'exposition (Monje et al., 2010; Rubin et al., 2001). Des altérations développementales de la prostate, comprenant entre autre la taille ainsi que le développement de tumeurs, ont été observés chez le rat et la souris mâle exposés lors de la période périnatale au BPA à 50µg/kg de poids corporel/jour (Gupta, 2000; Prins et al., 2007; Timms et al., 2005). De plus, l'exposition périnatale au BPA (doses allant de 25 ng à 1mg/kg de poids corporel/jour) altère également le développement des glandes mammaires, de l'utérus et des ovaires chez la souris femelle. En effet, des études ont mis en évidence des hyperplasies intra-canalaires et des lésions pré-néoplasiques dans ces organes sexuels (Muñoz-de-Toro et al., 2005; Murray et al., 2007; Newbold et al., 2007; Vandenberg et al., 2008).

L'exposition périnatale au BPA a, de plus, des impacts sur le cerveau, le système nerveux et le comportement. Des altérations de l'axe gonadotrope (hypothalamus-hypophyse-gonade) et une augmentation de l'expression génique d'ERα et d'ERβ dans l'hypophyse et

l'hypothalamus ont été décrits chez le rat exposé en périnatal au BPA (doses allant de 25 à 20 000 µg/kg de poids corporel/j) (Khurana et al., 2000; Monje et al., 2007; Ramos et al., 2003). De même, l'exposition périnatale à de très faibles doses de BPA (25 et 250 ng/kg de poids corporel/jour) altère la différenciation sexuelle cérébrale chez la souris et change le comportement socio-sexuel chez le rat mâle et femelle, augmentant par exemple leur féminisation (Farabollini et al., 2002; Rubin et al., 2006). D'autres troubles du comportement ont été référencés dont notamment une augmentation de l'hyperactivité et de l'agressivité chez le rat et la souris exposés en périnatal à 0,2-20 µg par administration intra-cisternale et de 2 à 20 µg/kg de poids corporel/jour de BPA, respectivement (Ishido et al., 2004; Kawai et al., 2003).

L'exposition périnatale au BPA a de nombreux impacts sur le système immunitaire. En effet, l'exposition au BPA à 5 µg/mL par l'eau de boisson, de la naissance jusqu'à 9 semaines, augmente la production de marqueurs et des symptômes de l'allergie des voies respiratoires chez la souris (Petzold et al., 2014). Ces observations ont été confirmées dans une autre étude chez la souris lors d'une exposition au BPA à 10 µg/mL dans l'eau de boisson, d'une semaine avant la gestation jusqu'au jour 22 post-natal (Nakajima et al., 2012). De plus, l'exposition périnatale au BPA augmente la susceptibilité à certaines infections. En effet, une étude chez le rat a montré que l'exposition maternelle du jour 15 de gestation jusqu'au jour 25 post-natal à 5µg/kg de poids corporel/jour de BPA prédisposait la descendance aux infections par le parasite intestinal *Nippostrongylus brasiliensis* (Menard et al., 2014a). Une étude épidémiologique effectuée chez des femmes enceintes a également montré qu'une exposition prénatale au BPA corrélait avec un risque d'infections pulmonaires chez la descendance (Gascon et al., 2015). Cependant, une exposition périnatale au BPA module très peu la réponse immunitaire contre Influenzavirus A, un virus grippal, n'empêchant pas l'élimination du virus par l'hôte (Roy et al., 2012). Enfin, un lien est susceptible d'exister entre l'exposition au BPA en période périnatale et le risque de développement de maladies auto-immunes. Il a été démontré que le BPA à 10 µg/kg de poids corporel/jour (du coït jusqu'au jour 21 post-natal) accélérait les symptômes dans un modèle murin de sclérose en plaques (Brinkmeyer-Langford et al., 2014). L'exposition au BPA à 3mg/kg pendant la période gestationnelle augmente également le développement expérimental d'encéphalomyélite chez la descendance souris mâle (Rogers et al., 2017). Le BPA en périnatal (du coït jusqu'au jour 21 post-natal) à 10 mg/L dans l'eau de boisson augmente également la sévérité de l'insulite (réponse auto-immune contre les cellules

productrices d'insuline) dans les ilots pancréatiques et la prévalence du diabète de type 1 dans la descendance de souris diabétiques non obèses (NOD) (Bodin et al., 2014).

L'exposition périnatale au BPA a également des impacts sur la perméabilité de l'intestin, le développement du système immunitaire intestinal, le microbiote intestinal, l'homéostasie du glucose et le développement de troubles métaboliques et de l'obésité (Angle et al., 2013; Braniste et al., 2010; Javurek et al., 2016; Menard et al., 2014b, 2014a). L'ensemble de ces perturbations sera décrit de façon détaillée dans le chapitre II des données bibliographiques.

1.2.6 Réglementation du BPA

L'exposition ubiquitaire de l'Homme au BPA et son absorption rapide dans l'intestin, rendent compte d'une contamination à grande échelle de la population générale, susceptible d'effets néfastes sur la santé. Face aux études chez l'animal et grâce aux données épidémiologiques récentes, le BPA a subi une réglementation évolutive depuis les années 2000. Parce qu'il n'existe pas de consensus à l'échelle internationale, une politique de réglementation spécifique en fonction du pays ou de l'union de plusieurs pays s'est mise en place. Parmi eux, l'Union Européenne et les Etats-Unis ont mené le plus d'investigation pour établir une réglementation propre visant à limiter l'exposition de leurs concitoyens.

Pour l'évaluation des risques liés à l'absorption de contaminants chimiques, 2 termes sont à définir : la dose sans effet nocif observable (NOAEL) et la dose journalière tolérable (DJT). La NOAEL, correspond à la dose d'une substance chimique la plus forte ne produisant aucun effet nocif observable chez l'animal dans l'étude effectuée. La DJT est la quantité d'une substance qu'un individu moyen de 60 kg peut en théorie ingérer quotidiennement sans risque pour sa santé, selon les bases des connaissances actuelles. Elle correspond à une extrapolation mathématique de la NOAEL, que l'on divise par un facteur 100 : 10 pour les différences inter-espèces, 10 pour la variabilité inter-individuelle (adulte, enfant, nouveau-né, homme, femme).

L'évaluation des risques liés au BPA en Europe se fait essentiellement par l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (EFSA) en suivant le règlement REACH (*Registration, Evaluation and Autorisation of Chemicals*).

L'EFSA a été créée en 2002. Cette autorité a pour rôle de protéger les consommateurs, les animaux et l'environnement des risques potentiellement associés à l'alimentation. Depuis la première évaluation du BPA en 2006, l'EFSA suit l'évolution des études portant sur ce composé et effectue des réévaluations fréquentes. Lors de sa première évaluation, en se basant sur la littérature, l'EFSA a évalué l'absorption orale de BPA par l'alimentation pour les adultes, les nourrissons et les enfants, et a fixé une NOAEL de 5 mg/kg de poids corporel/jour et une DJT de 50 µg/kg de poids corporel/jour pour le BPA (European Food Safety Authority (EFSA), 2007). En 2008, l'EFSA a été invitée à réévaluer les risques liés au BPA sur les nourrissons et les adultes, en se penchant sur leur différence de capacité à éliminer le BPA de l'organisme, mais n'a pas modifié la DJT. Après de nombreuses réévaluations et suite à l'émergence de la littérature sur le BPA, l'EFSA conclut provisoirement en 2013 et en 2014 que l'alimentation est la principale voie d'exposition de l'Homme pour le BPA, que l'exposition était plus faible que celle précédemment estimée et que la DJT doit être diminuée d'un facteur 10 (EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzymes, Flavourings and Processing Aids (CEF), 2014). C'est en 2015 que l'EFSA a réduit provisoirement la DJT du BPA, passant de 50 à 4 µg/kg de poids corporel/jour, affirmant que le BPA était sans danger au vu de la faible exposition humaine (EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzymes, Flavourings and Processing Aids (CEF), 2015). Cette DJT actuelle reste provisoire car l'EFSA devrait effectuer une réévaluation des risques liés au BPA avec les résultats d'une étude de 2 ans menée par le *National Toxicology Program* aux Etats-Unis (résultats programmés pour 2017).

La réglementation REACH a été créée en 2006 par le parlement européen et le conseil de l'union européenne. Elle a pour but d'améliorer la protection de la santé humaine et de l'environnement tout en maintenant et renforçant la compétitivité et l'esprit d'innovation de l'industrie chimique. Elle fonctionne par un système intégré d'enregistrement, d'évaluation et d'autorisation des substances chimiques. Pour les substances fabriquées ou importées dans une quantité ≥ 1 tonne/an, comme le BPA, les fabricants doivent constituer un dossier technique de cette substance sur les propriétés physico-chimiques et les effets sur la santé humaine et l'environnement. Ainsi, les principaux fabricants et importateurs de BPA ont formé le « BPA REACH Consortium » et mis au point un dossier d'enregistrement pour le BPA (Reachcentrum, 2010). Dans le cadre de l'évaluation, le BPA REACH Consortium a eu une demande d'évaluation du BPA de la part de l'ECHA (Agence Européenne des produits Chimiques) en 2013 concernant son effet en contact avec la peau et l'exposition environnementale. Ce consortium a fourni toutes les informations demandées en 2015. Les autorités françaises ont

présenté en 2016 un dossier sollicitant l'identification du BPA comme « substance très préoccupante » sur la base d'une classification en tant que « reprotoxique de catégorie 1B » quelle que soit la voie de contamination. Elle est entrée en vigueur la même année et s'appliquera en mars 2018. Cependant le BPA est principalement utilisé pour la fabrication de polymères qui sont exempts d'autorisation sous REACH. En 2016, la Commission Européenne a approuvé la proposition de la France pour la restriction du BPA dans les tickets en papier thermique grâce à l'identification des risques pour la santé des travailleurs qui manipulent ce type de papier et a limité la mise sur le marché de papier thermique à une concentration égale ou supérieure à 0,02 % de BPA en poids total à partir de 2020 (Commission Européenne, 2016).

La France, grâce aux évaluations de son Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'Environnement et du travail (ANSES), est très sensibilisée sur la dangerosité du BPA et a donc été beaucoup plus restrictive que d'autres pays au niveau international. La France a donc entrepris très rapidement une règlementation stricte du BPA, l'interdisant dès 2010 dans la fabrication des biberons, 1 an avant la même décision pour toute l'Europe (Loi Française, 2010). L'ANSES a effectué en 2011 une enquête sur les usages et effets sanitaires du BPA qui l'ont conduit à recommander une diminution de l'exposition de la population, surtout d'un point de vue alimentaire. En 2013, l'agence a publié des résultats sur l'évaluation des risques sanitaires liés au BPA qui ont abouti à l'interdiction du BPA dans la fabrication des produits utilisés par les enfants de moins de 3 ans en 2013 pour enfin l'interdire dans tous les contenants alimentaires en 2015 (Loi Française, 2012). La France est donc devenue le premier pays à interdire aussi massivement le BPA. Cependant, la DGCCRF (Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes) a autorisé les industriels à écouler leur stock mis sur le marché avant la mise en vigueur de la loi (janvier 2015). Les boîtes de conserves et canettes de soda se conservant relativement longtemps, il a été évalué à plusieurs années la disparition totale du BPA dans les produits alimentaires français. Ceci pourrait expliquer pourquoi du BPA a été retrouvé dans 3 produits sur 4 testés (1/2 canettes, 2/2 boites de conserve) à des concentrations inférieures à 1µg/L suite à une enquête de l'Association Santé Environnement France (Association Santé Environnement France, 2016).

Aux Etats-Unis, l'évaluation des risques par les produits chimiques se fait par la *Food and Drug Administration* (FDA) et l'*Environmental Protection Agency* (EPA). La FDA a été créée en 1906 et est responsable de la protection et la promotion de la santé publique contre les substances chimiques, ce qui fait qu'elle partage de nombreuses similarités avec l'EFSA et REACH. L'EPA est une agence indépendante du gouvernement des Etats-Unis qui a été créée

en 1970 pour étudier et protéger la nature et la santé des citoyens américains. La FDA et l'EPA suivent les mêmes mesures et recommandations. Elles ont effectué, tout comme l'EFSA, différentes évaluations ces dernières années. En 2008, la FDA a rassuré la population sur les risques liés au BPA, en affirmant que le BPA présent dans les matériaux en contact des aliments n'était pas dangereux pour la santé humaine et a fixé la NOAEL à 5 mg/kg de poids corporel/jour (FDA, 2008). C'est en 2009 et suite à l'interdiction progressive du BPA dans les biberons dans de nombreux états, que la FDA a annoncé qu'elle reconsidérait ses propos. Elle a ensuite émis des préoccupations sur les effets du BPA sur le cerveau, le comportement et la prostate des nouveau-nés sans pour autant recommander des changements sur la consommation. Ce n'est qu'en 2012 que la FDA a interdit le BPA dans les biberons (Federal Register, 2013). L'EPA a émis une DJT de 50 µg/kg de poids corporel/jour (U.S. Environmental Protection Agency, 1988) qui reste en vigueur aujourd'hui.

1.3 Les analogues structuraux et substituts potentiels au BPA

De nombreux analogues structuraux du BPA existent, certains étant susceptibles d'être utilisés comme substituts au produit mère pour la fabrication de nombreux produits. Ces substances font parties de la même famille que le BPA (diphénylméthane) de par leur structure chimique très proche de celle de ce composé. Ils diffèrent soit par la nature de la liaison entre les 2 phénols, soit par l'ajout d'halogènes ou de groupements hydroxyles sur les phénols. A l'heure actuelle, on dénombre le bisphénol F (BPF), S (BPS), E (BPE), Z (BPZ), AP (BPAP), AF (BPAF), le tetrabromo-bisphénol A (TTBPA) et le tetrachloro-bisphénol A (TCBPA) (Figure 11).

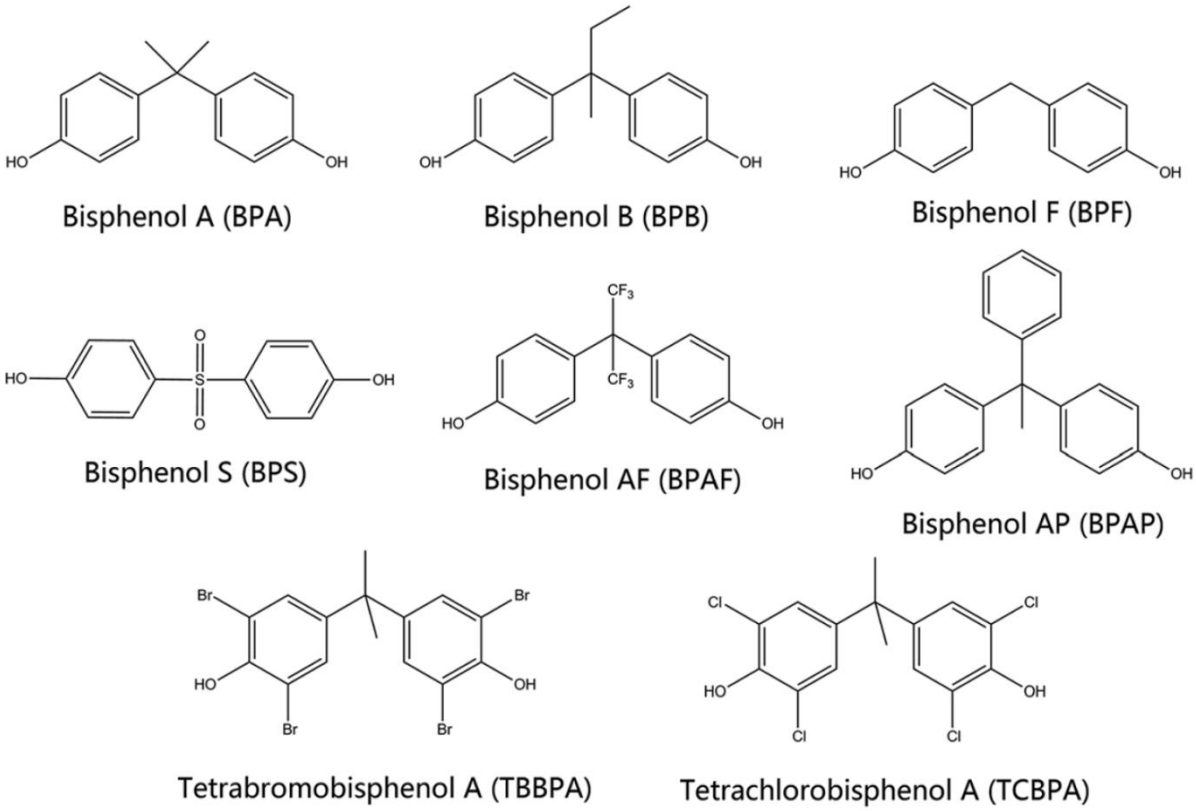


Figure 11 : Structure du BPA et de ses analogues structuraux.

Parmi cette liste non exhaustive, du fait de leur large utilisation dans les produits de consommation en France et aux Etats-Unis, le BPS et le BPF sont les deux analogues qui seront plus précisément décrits et qui ont été étudiés dans le cadre de cette thèse.

1.3.1 Le Bisphénol S

Le BPS, de son nom chimique bis(4-hydroxyphényl)sulfone, est un des analogues du BPA le plus couramment utilisé. Il diffère du BPA par la nature du groupement entre les groupements phénols : groupement sulfate pour le BPS *versus* un pont carbone comprenant deux groupements méthyles pour le BPA (Figure 11).

Il est recensé pour la première fois en 1869 dans l'utilisation de colorant (Glausiusz, 2014). Ce n'est cependant que très récemment qu'il a été utilisé pour ses propriétés similaires au BPA, c'est-à-dire en tant que polycarbonate. En effet, le BPS est massivement produit et importé en Europe, avec une estimation comprise entre 1000 et 10 000 tonnes par an en 2014 (Gouzy and Brignon, 2015). Il est reconnu comme étant plus thermo et photo-résistant que le

BPA avec un temps de demi-vie supérieur, mais également moins biodégradable dans des conditions aérobies (Ike et al., 2006). Le BPS est le composé le plus utilisé en remplacement du BPA dans les papiers thermiques comme révélateur d'impression. En effet, une étude a montré que le BPS était présent dans 100% des papiers thermiques de plusieurs grandes villes des Etats-Unis, de Corée du sud, du Vietnam et du Japon avec des taux allant de quelques nanogrammes à plusieurs milligrammes par gramme de papier (Liao et al., 2012a). En France, l'ANSES a testé 50 tickets de caisse de la région lyonnaise et a retrouvé du BPS dans près de 24 % des échantillons testés (ANSES, 2013).

Le BPS remplaçant peu à peu le BPA dans certaines applications, il peut être absorbé de façon comparable au BPA par voie orale et par voie cutanée (de 0,4 à 312 ng/kg de poids corporel/jour pour l'absorption cutanée) (Liao et al., 2012a). De plus, une étude récente a montré que le BPS était détectable dans les poussières d'école maternelle suédoise (Larsson et al., 2017), prouvant que le BPS peut également être absorbé par voie aérienne avec une exposition moyenne de 0,4 ng/kg de poids corporel/jour.

La littérature sur le BPS est beaucoup moins riche que pour le BPA (157 publications en rapport avec le BPS comparé à 11065 pour le BPA (septembre 2017)). Très peu voire aucune donnée ne décrit le principe de métabolisation de ce composé. D'après Gramec Skledar et al., 2015, il existe quelques différences par rapport au BPA, notamment sur les enzymes responsables de sa glucuronidation (Gramec Skledar et al., 2015). Il est cependant retrouvé glucuronidé ou sulfaté lors de sa mise en présence avec des cellules de zebrafish (ZFL) ou des cellules humaines (HepaRG), ce qui laisse supposé que le BPS est métabolisé de la même façon que le BPA.

De façon similaire au BPA, le BPS est retrouvé majoritairement dans les urines et le sang des populations de grands pays industrialisés, mais aussi dans le lait maternel. En effet, Andra et al., 2015 ont rapporté que 81% des échantillons d'urine et 3% des échantillons de lait maternel testés contenait du BPS à hauteur de 0,02 à 21 ng/mL et de 0,003 à 0,23 µg/kg respectivement (Andra et al., 2015). Dans une autre étude, le BPS a été retrouvé dans 17% des échantillons sanguins d'agents de caisse à des concentrations comprises entre 0,01 et 0,1 ng/mL (Thayer et al., 2015).

Le BPS est reconnu comme PE, tout comme le BPA. Une revue récente démontre, en se basant sur la littérature, que le BPS est aussi actif en tant que xénoestrogène que le BPA (Rochester and Bolden, 2015). Il a la capacité de se fixer et d'activer les mêmes récepteurs que

le BPA. Il peut se fixer sans distinction aux ER nucléaires avec une affinité relative de liaison de 0,0055 (pour rappel, BPA : 0,073 sur ERα et 0,75 sur ERβ) (Yamasaki et al., 2004). Des études *in vitro* ont de même montré que le BPS pouvait se fixer aux ER membranaires et au GPR30 avec une activité comparable à l'estradiol (Viñas and Watson, 2013). La liaison au récepteur aux androgènes est reconnu mais son activité reste encore controversée entre effet agoniste (Molina-Molina et al., 2013) et antagoniste (Kitamura et al., 2005). Seuls ces récepteurs ont fait l'objet d'étude d'interaction avec le BPS. D'autres recherches supplémentaires devront être menées pour étudier l'interaction et l'activité avec les autres récepteurs décrits pour le BPA, tel que AhR (Rochester and Bolden, 2015).

Les effets sur la santé provoqués par le BPS sont également moins référencés que le BPA, ce sujet d'étude étant relativement récent. Les effets référencés ci-dessous sont donc non exhaustifs et très certainement incomplets. Il a été démontré que l'exposition au BPS mime certains effets du BPA. En effet, une exposition au BPS (de 7 ng à 50 µg/L) chez le zebrafish, diminue le poids des gonades, altère le taux plasmatique d'estrogène et de testostérone, provoque une neurogénèse hypothalamique précoce et entraîne des troubles de la reproduction (Ji et al., 2013; Kinch et al., 2015). Il a également été prouvé que le BPS induit des dommages à l'ADN, pouvant mener à la cancérogénèse (Fic et al., 2013; Lee et al., 2013). Chez l'homme, *ex vivo*, de manière intéressante le BPS à 100 nM diminue la sécrétion basale de testostérone des testicules fœtaux (Eladak et al., 2015). De plus, lors d'une exposition périnatale, Castro et al. ont montré que 10µg/kg de poids corporel/jour de BPS affecte la neurosteroidogénèse (production de neurostéroïdes, agissant comme des neuroprotecteurs) (Castro et al., 2015). Enfin, toujours lors d'une exposition périnatale, il a été démontré que le BPS à 1,5 et 50 µg/kg de poids corporel/jour augmente le poids corporel de la descendance souris C57BL/6 mâle comparé au contrôle lors d'un régime riche en graisse (Ivry Del Moral et al., 2016). Dans cette étude, cet effet est corrélé avec une diminution de l'expression la lipase hormono-sensible (HSL), de PPARγ, du récepteur à l'insuline et de l'adiponectine associé à une augmentation de SOCS3 (*Suppressor Of Cytokine Signaling 3*), ces altérations entraînant l'augmentation du stockage lipidique et de la vitesse de l'absorption des lipides sanguins.

Ainsi le BPS mime certains effets toxiques du BPA et pose donc des questions sur son innocuité comme substitut au BPA. Face au manque de données dans la littérature, d'autres investigations sont nécessaires pour préciser les potentiels effets délétères pour l'organisme.

1.3.2 Le Bisphénol F

Le BPF, de son nom chimique bis(4-hydroxyphényl) méthane, est également un des analogues du BPA couramment utilisé aux Etats-Unis. De façon similaire au BPS, il diffère du BPA par la nature du groupement entre les 2 phénols : méthylène pour le BPF, pont carbone comprenant 2 groupements méthyles pour le BPA (Figure 11).

Aucune donnée ne relate sa première synthèse et son utilisation initiale. Son utilisation industrielle actuelle est très large. Cependant, il est principalement utilisé en tant que polymère de résine époxy et en polycarbonates. Il est retrouvé dans les revêtements internes des boites de conserve et des canettes (mais non autorisé au contact des denrées alimentaires dans l'union européenne), les résines de soin dentaire, les canalisations d'eau potable comme agent anticorrosif, les emballages alimentaires (hors union européenne) et autres plastiques (Cabaton et al., 2009).

Le BPF est principalement absorbé par voie orale, *via* la contamination des aliments, et par voie aérienne dans les poussières environnantes. En effet, le BPF a été retrouvé dans des poussières récoltées aux Etats-Unis, en Chine, au Japon et en Corée du sud à hauteur de 0,054 µg/g de poussière (moyenne la plus élevée pour le Japon) (Liao et al., 2012b). Le BPF est métabolisé de la même manière que le BPA. Chez la rate femelle, le principal métabolite de BPF détecté est le BPF-sulfate (Cabaton et al., 2006). Cependant, des études *in vitro* utilisant des lignées de cellules humaines ont montré que du BPF-sulfate et -glucuronide sont formés dans des hépatocytes (HepG2) (Dumont et al., 2011), alors que seul le BPF-glucuronide est retrouvé dans des cellules intestinales (LS174T) (Audebert et al., 2011).

Le BPF étant fortement absorbé et métabolisé, il est détecté dans les urines des populations industrialisées, notamment dans 55% des échantillons d'urine aux Etats-Unis avec des concentrations pouvant aller jusqu'à 212 ng/mL (Rochester and Bolden, 2015). Ceci est d'autant plus inquiétant qu'une étude a montré qu'une seule exposition au BPF à très forte dose (7 à 100 mg/kg) pouvait contaminer les organes reproducteurs comme l'utérus, le placenta, le liquide amniotique ainsi que le fœtus de rates gestantes (Cabaton et al., 2006).

Le BPF est aussi reconnu comme PE. On dénote une capacité estrogéno-mimétique similaire à celle du BPA (Rochester and Bolden, 2015). En effet, l'affinité relative de liaison du BPF sur les ER sans distinction est de 0,0719 (pour rappel BPA : 0,073 sur ERα et 0,75 sur ERβ) (Yamasaki et al., 2004). De plus, les activités sur les ER et les RA ont été confirmés *in*

vitro par de nombreuses études (Cabaton et al., 2009; Kitamura et al., 2005; Molina-Molina et al., 2013). Aucune étude ne référence l'activité du BPF sur les ER membranaires et les GPR30.

Tout comme le BPS, les effets sur la santé du BPF sont moins étudiés que pour le BPA (210 publications pour le BPF par rapport à 11065 pour le BPA (septembre 2017)). Cependant, des études *in vivo* chez le rat ont montré un effet estrogénique, anti-androgénique et thyroïdogénique du BPF à forte dose (20 à 100 mg/kg de poids corporel/jour). Ces effets entraînent une augmentation du poids de l'utérus et de la thyroïde menant à une diminution des niveaux de T3 et une augmentation de T4 circulants (Higashihara et al., 2007; Stroheker et al., 2003). Le BPF sous forme diglycedyl-ether (BFDGE, composé principal de la résine époxy) a été montré comme étant génotoxique et mutagène (Sueiro et al., 2003). De plus, comme le BPS, chez l'homme, des expériences *ex vivo* montrent que le BPF à 1 µM diminue la sécrétion basale de testostérone des testicules fœtaux (Eladak et al., 2015).

1.3.3 Réglementation

Le BPS et BPF sont très peu identifiés et mentionnés dans la réglementation. Comme ils ne sont pas inscrits à l'annexe VI du règlement CLP (règlement de classification, d'étiquetage et d'emballage), ils ne possèdent pas d'étiquetage officiel harmonisé au sein de l'Union Européenne (Commission Européenne, 2008). En Europe, le BPS est autorisé dans les matières plastiques et les articles destinés à être en contact avec les denrées alimentaires, avec un taux de migration maximum de 0,05 mg/kg (Commission Européenne, 2011). Les autres bisphénols ne sont pas cités par cette autorisation, ce qui induit, comme dit plus haut, que le BPF est interdit dans les matières plastiques et articles destinés à être en contact avec les aliments en Europe. Il est malgré tout utilisé dans les pays hors Europe comme aux Etats-Unis. L'utilisation de plus en plus grande du BPS et du BPF pourrait faire évoluer les instances vers une nouvelle réglementation, la Commission Européenne ayant demandé à l'Agence Européenne des Produits Chimiques (ECHA) d'évaluer dans quelle mesure le BPS utilisé en remplacement du BPA, posait un risque pour la santé humaine. En cas de risque identifié, l'ECHA pourrait demander au règlement REACH de proposer son interdiction dans les papiers thermiques.

CHAPITRE II - PHYSIOLOGIE INTESTINALE

La voie principale d'exposition des bisphénols étant la voie orale, ce chapitre est destiné à apporter quelques rappels sur la physiologie intestinale et le système immunitaire (nécessaire à la mise en place de la tolérance alimentaire) utiles à la compréhension du travail de thèse.

2.1 Le tractus digestif

Le tractus digestif est la principale surface d'échange entre l'environnement extérieur (alimentation, boisson… mais également pour les xénobiotiques comme le BPA) et l'organisme. Il a pour fonctions principales la digestion du bol alimentaire et l'absorption des nutriments, de l'eau et des électrolytes ainsi libérés. Il est composé de trois organes principaux : l'œsophage, l'estomac et l'intestin (Figure 12).

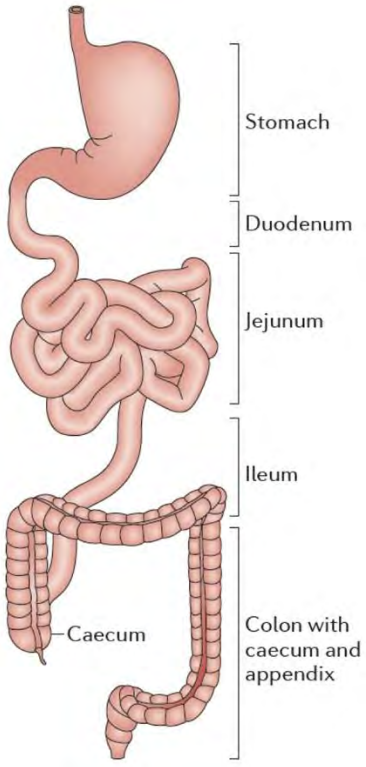


Figure 12 : Anatomie du tractus digestif humain adapté de Mowat et Agace (Mowat and Agace, 2014).

L'intestin présente 2 parties appelées, de par leur morphologie, intestin grêle et gros intestin. L'intestin grêle est divisé en 3 sous-parties comprenant le duodénum (portion proximale de l'intestin grêle), le jéjunum (portion intermédiaire) et l'iléon (portion distale) qui débouche dans le gros intestin par la valvule iléo-caecale. Chez l'Homme, l'intestin grêle a un diamètre de 3-4 cm et une longueur moyenne de 6 m, pouvant varier de 4 à 7 m selon les individus. C'est dans cet organe que se déroule la digestion et l'absorption des nutriments présents dans le contenu luminal, grâce à sa structure interne formée de replis, de villosités et de microvillosités qui optimisent les surfaces d'échanges (environ 250 m^2 chez l'Homme). Le gros intestin est lui aussi composé de plusieurs parties fonctionnelles : le caecum ou appendice chez l'Homme qui constitue un réservoir de bactéries commensales, le côlon ascendant (proximal), le côlon transverse, le côlon descendant (distal) et le rectum débouchant sur le canal anal qui termine le transit intestinal par la défécation. Le gros intestin est plus large (7 à 8 cm de diamètre chez l'Homme) et moins long (1 à 1,5 m chez l'Homme) que l'intestin grêle. Sa fonction principale est la réabsorption de l'eau et des électrolytes du contenu luminal.

Le passage du bol alimentaire dans ces différents compartiments se fait par une motricité propre, en grande partie réflexe. En effet, de petits mouvements contractiles, les mouvements péristaltiques, vont faire transiter le bol alimentaire tout au long de la digestion. En physiologie humaine, le temps de digestion varie selon la personne, le bol alimentaire et d'autres paramètres physiologiques comme l'âge, l'état de santé, ou encore le sexe de l'individu, mais elle dure en générale plusieurs heures. En moyenne, chez l'homme adulte (20-30 ans), le temps de vidange gastrique moyen est d'environ 2h, le temps de transit intestinal moyen au niveau du grêle est d'un peu moins de 4h alors qu'il est de 39h en moyenne pour le transit au niveau du côlon (Madsen and Graff, 2004). Un temps de transit supérieur à 72h est considéré comme alarmant et peut être synonyme de défaut de fonctionnalité du tractus digestif. Chez la souris, le temps de transit dépend également de la lignée. En général, le transit dure entre 6 et 8h. Une heure après le gavage, le bol alimentaire a passé l'intestin grêle et entre le caecum et le côlon. Le bol alimentaire va passer les 6 à 7h restant dans le côlon, finissant la digestion (Padmanabhan et al., 2013).

2.1.1 Structure pariétale de l'intestin

La structure pariétale de l'intestin s'organise en 4 tuniques successives, en allant de la lumière intestinale (intérieur de l'intestin) vers l'organisme (extérieur de l'intestin) : la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculeuse et la séreuse (Figure 13).

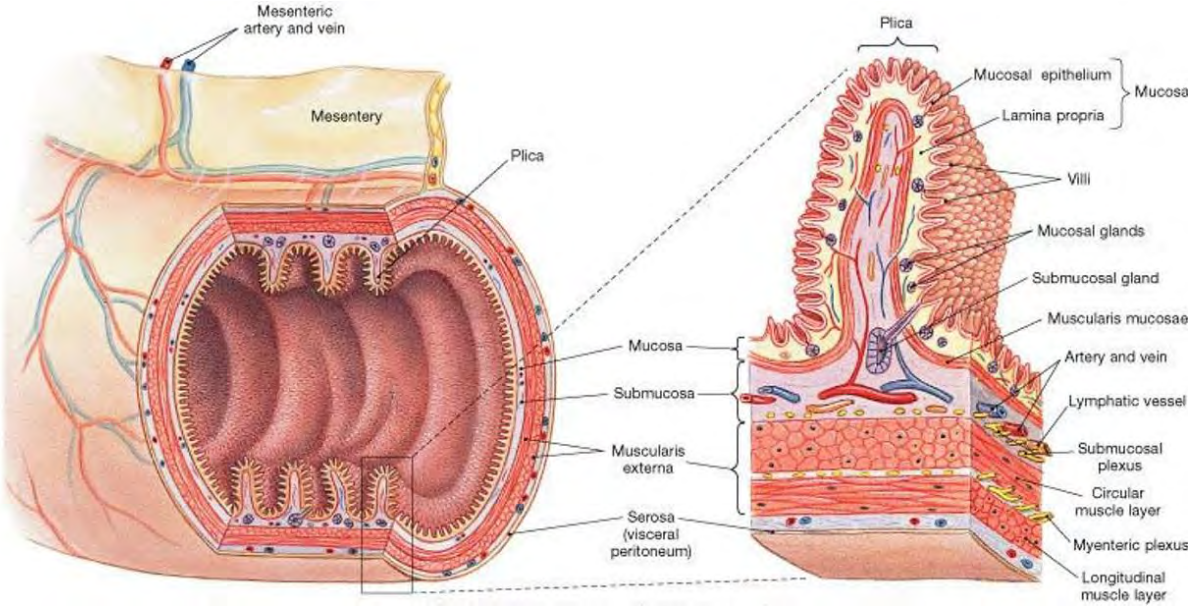


Figure 13 : Organisation structurelle de l'intestin.

- **La muqueuse** est elle-même constituée de 3 zones, toujours de la lumière intestinale vers l'organisme :
  - Un épithélium monostratifié (1 seule couche de cellules) constitué principalement d'entérocytes entre lesquels s'intercalent, en nombre plus restreint, des cellules plus spécifiques comme les cellules caliciformes, les cellules de Paneth, les cellules M, les cellules entéroendrocrines, les cellules de Tuft et les cellules souches. Ces cellules seront décrites plus précisément dans la suite du manuscrit. Cet épithélium est la première barrière pour le contenu luminal et permet l'absorption des nutriments et autres éléments exogènes.
  - La *lamina propria* (LP) est le tissu conjonctif de l'intestin. Ce tissu est fin mais dense en capillaires sanguins et en vaisseaux lymphatiques. Il contient de nombreuses cellules immunitaires. Elle a un rôle de soutien structural, nutritif et de protection de l'hôte.

- La *muscularis mucosae* est composée de deux couches fines de muscles lisses, une longitudinale externe et une circulaire interne. Elle a un rôle mécanique, permettant le mouvement des villosités et limitant ainsi l'adhésion du contenu luminal.

- **La sous-muqueuse** est composée de tissu conjonctif et de vaisseaux sanguins et lymphatiques. Elle abrite également le plexus nerveux sous-muqueux (plexus de Meissner) qui est responsable du débit sanguin local et du contrôle de l'activité des glandes sécrétrices.
- **La musculeuse**, première partie de la paroi externe de l'intestin est constituée de fibres musculaires lisses disposées en deux couches : une circulaire interne et une longitudinale externe, séparée par le plexus nerveux myentérique (plexus d'Auerbach). Ce plexus constitue un réseau dense de neurones qui sont responsables du contrôle des mouvements moteurs de l'intestin.
- **La séreuse** est composée d'un tissu conjonctif lâche menant à un épithélium simple, aussi appelé mésothélium, au niveau du versant externe de l'intestin. La séreuse a un rôle de soutien de l'intestin dans la cavité abdominale, contribuant également à limiter les forces de frottement lors des mouvements intestinaux.

La structure décrite précédemment possède quelques particularités selon l'emplacement dans l'intestin. La paroi interne de l'intestin grêle forme des plis circulaires et des cryptes/villosités. L'épithélium intestinal interne est constitué de près de 80% d'entérocytes qui possèdent des microvillosités apicales. Le caecum et le côlon ne possèdent pas de villosités (Mowat and Agace, 2014). Tous ces détails structuraux vont permettre d'augmenter la surface d'échange avec le contenu luminal et favoriser ainsi l'absorption des nutriments de la lumière intestinale jusqu'au compartiment systémique. Cette structure permet également, de par son organisation cellulaire modulant la perméabilité (décrite ci-après), de jouer le rôle de barrière physique contre les éléments étrangers nocifs et autres pathogènes. Enfin, elle permet d'assurer un rôle de défense et d'éducation du système immunitaire envers les différents éléments exogènes de l'environnement (microorganismes, virus, antigènes, toxines, xénobiotiques…).

2.1.2 Les cellules de l'épithélium intestinal

La surface épithéliale intestinale est très active et en constant renouvellement (4 à 5 jours pour un renouvellement total chez les mammifères) (van der Flier and Clevers, 2009).

Elle est constituée de différents types cellulaires qui sont renouvelées par des cellules souches pluripotentes. Celles-ci sont localisées à la base des cryptes et remontent au fur et à mesure dans la villosité tout en se différenciant. Une fois arrivées à l'apex de la villosité, les cellules se détachent et sont expulsées dans la lumière intestinale (phénomène d'anoïkose).

L'épithélium intestinal contient donc différents types cellulaires avec des fonctions bien spécifiques et définies comme suit (Figure 14) :

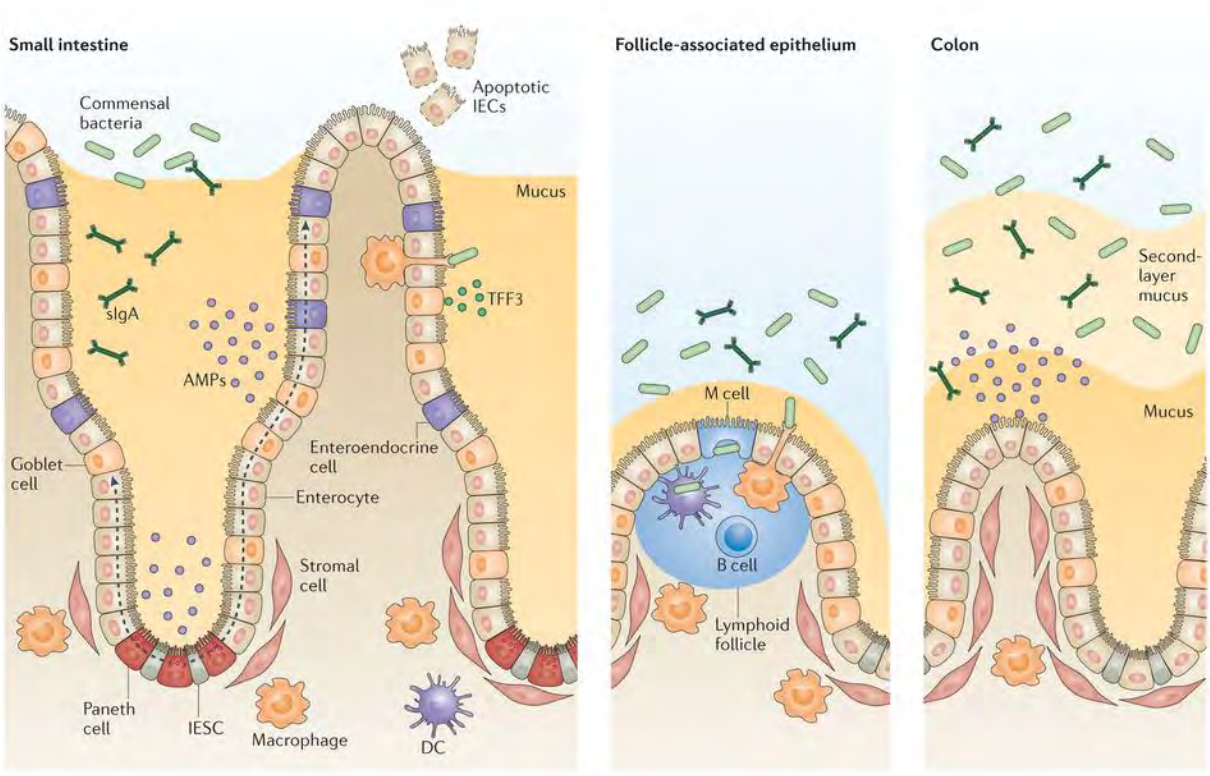


Figure 14 : Les différents types cellulaire de l'épithélium intestinal (Peterson and Artis, 2014).

- **Les entérocytes** sont les principales cellules retrouvées au niveau de l'épithélium intestinal. Ils ont une morphologie très caractéristique avec, au niveau apical, un plateau de microvillosités recouvertes de glycocalyx. Les entérocytes ont un rôle important dans la digestion, l'absorption et le transport des molécules provenant de la lumière intestinale. Ils ont également un rôle dans la sécrétion des Immunoglobulines A (IgA).
- **Les cellules caliciformes**, également appelées **cellules à mucus** ou **cellules en gobelet** (*goblet cells*), sont présentes tout le long de l'intestin, avec une fréquence de 10% pour l'intestin grêle et 25% pour le côlon (Mowat and Agace, 2014). Ces cellules sont très

denses à la microscopie électronique à transmission de par leurs nombreux grains de sécrétion de mucines présents au niveau apical. Elles sécrètent en continu ces grains de mucines afin de former une couche de mucus tout le long de la paroi intestinale. Cette couche de mucus a pour rôle premier la lubrification de la paroi afin de faciliter le glissement du bol alimentaire. Il a également un rôle plus important dans la protection de la paroi contre les microorganismes et autres éléments pathogènes ou indésirables. L'intestin grêle ne dispose que d'une seule couche de mucus assez peu dense alors que le côlon dispose de deux couches distinctes : une couche inférieure très dense stérile en terme de bactéries et en contact direct avec l'épithélium, et une couche supérieure moins dense et non stérile, comparable à celle retrouvée dans l'intestin grêle (Figure 14). Cependant, cette disposition du mucus dans le côlon fait l'objet de controverses et une autre organisation a été récemment proposée où le côlon proximal ne dispose pas d'une barrière de mucus, la couche de mucus recouvrant et étant attachée aux fèces (Kamphuis et al., 2017). Les cellules à mucus ont également un rôle dans la présentation des antigènes au système immunitaire sous-jacent (McDole et al., 2012) et dans le passage de molécules de faible poids moléculaire (<10kDa).

- **Les cellules entéro-endocrines** sont également présentes tout le long de l'intestin, mais ne représente que 1% des cellules épithéliales totales. Elles sont spécialisées dans la synthèse d'hormones et de peptides (entéroglucagon, somatostatine, substance P, sérotonine et polypeptide intestinal vasoactif) jouant un rôle dans les sécrétions et la motricité intestinale.
- **Les cellules Tufts** sont des cellules chimiosensorielles qui produisent des opioïdes et qui sont également la seule source d'interleukine (IL) 25 (cytokine importante impliquée dans la régulation de l'immunité intestinale) de l'intestin (Gerbe et al., 2011; Howitt et al., 2016; Owyang et al., 2006). Il leur a été proposé un rôle de défense contre les infections parasitiques et dans la perception de la douleur.
- **Les cellules de Paneth** sont situées au niveau des cryptes intestinales, surtout au niveau de l'iléon. Ces cellules ne sont présentes que dans l'intestin grêle et non dans le gros intestin. Elles assurent la défense anti-bactérienne de manière non spécifique en sécrétant des peptides anti-microbiens dans la lumière intestinale. Ces derniers sont des médiateurs clés de l'interaction hôte-microbiote, modulant à la fois l'homéostasie de la colonisation microbienne et l'immunité innée contre les pathogènes (Clevers and Bevins, 2013). Parmi ces peptides, on compte les défensines (α-défensines), connues

sous le nom de cryptidines chez la souris. Ces défensines vont préférentiellement perturber les membranes bactériennes, en laissant intact la membrane des cellules de l'hôte (Ayabe et al., 2000). Les cellules de Paneth sécrètent également du lysozyme et de la phospholipase A2 qui ont eux aussi une activité anti-microbienne (Kierszenbaum, 2002).

- **Les cellules M** sont localisées au niveau d'une structure particulière de l'intestin associé au GALT (*Gut-Associated Lymphoïd Tissue*) : l'épithélium associé aux follicules lymphoïdes de l'intestin (FAE pour *Follicle-Associated Epithelium*) au sein des plaques de Peyer (PP). Ces structures seront présentées en détail ultérieurement dans le manuscrit. Ces cellules représentent à peu près 10% des cellules du FAE et sont présentes tout le long de l'intestin, même si elles sont plus rares au niveau du duodénum. Elles possèdent moins de microvillosités et de glycocalyx et sont spécialisées dans la capture des antigènes, des grosses molécules et des microorganismes de la lumière intestinale. Cette capture est majoritairement effectuée par phagocytose et transcytose et mène au transfert de ces molécules dans le dôme sous-épithélial des PP qui est riche en cellules immunitaires.
- **Les lymphocytes intra-épithéliaux (IEL)** sont localisés entre les entérocytes et servent au maintien de l'homéostasie immunitaire intestinale. Ils seront décrits dans la suite de ce manuscrit.

2.1.3 La perméabilité intestinale

Comme il est décrit précédemment, l'épithélium intestinal est constitué de différentes cellules servant de barrière physique protectrice mais également de voie de passage des nutriments, de l'eau, des électrolytes, etc... En condition d'homéostasie, cette barrière est imperméable aux pathogènes tout en autorisant le passage des éléments nutritifs essentiels. De ce fait, les cellules de l'épithélium sont polarisées avec un pôle apical (vers la lumière intestinale) et un pôle basolatéral (vers la LP). Cette polarité est maintenue grâce aux différentes jonctions intercellulaires permettant le passage des molécules digérées de très faible poids moléculaire, tout en limitant celui des microorganismes qui sont de tailles plus importantes. Au niveau de l'épithélium intestinal et en allant du pôle apical vers le basolatéral, les trois principaux complexes jonctionnels sont les jonctions serrées, les jonctions adhérentes et les desmosomes (Groschwitz and Hogan, 2009; Stewart et al., 2017) (Figure 15).

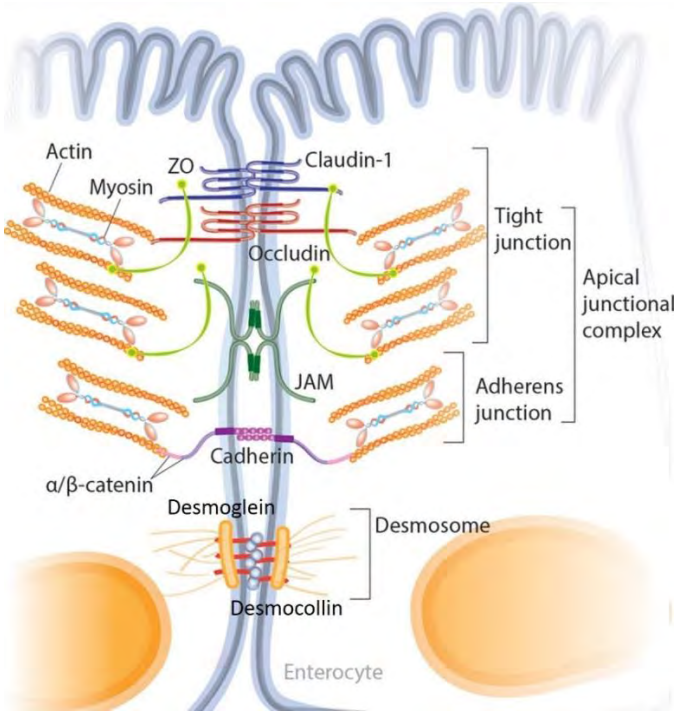


Figure 15 : Les jonctions intercellulaires (figure adaptée de Stewart et al., 2017).

Les jonctions serrées sont formées par un complexe de protéines transmembranaires de la famille des claudines, des occludines et des JAM (*Junctional Adhesion Molecules*) auxquelles sont reliées des protéines intracellulaires de la famille des ZO (*Zonula Occludens*). Ce complexe multiprotéique situé au pôle apical des entérocytes est relié à l'anneau périjonctionnel d'actino-myosine qui forme le cytosquelette des cellules épithéliales.

Les jonctions adhérentes sont constituées par la liaison de deux cadhérines, comme l'E-cadhérine. Ces cadhérines sont reliées au cytosquelette d'actine grâce aux caténines α et β.

Les desmosomes sont formés également d'un complexe de protéines transmembranaires de la famille des desmogléines et desmocollines qui s'ancrent selon le principe de « clé-serrure » en présence de Ca^{2+}. Ce complexe est relié au cytosquelette de kératine par les desmoplakines.

Les jonctions serrées sont principalement responsables de la régulation de la perméabilité paracellulaire, c'est-à-dire du passage entre les cellules épithéliales, alors que les desmosomes et les jonctions adhérentes servent à sceller les cellules entre-elles, ce qui leurs confèrent une résistance mécanique. D'autres jonctions existent comme les jonctions gap ou communicantes qui servent aux échanges intercellulaires. Cependant, ces jonctions restent mineures quant à leur implication dans la perméabilité intestinale.

Deux voies de passages des molécules à travers l'épithélium définissent la perméabilité intestinale : la voie paracellulaire (entre les cellules) et la voie transcellulaire (à travers la cellule) (Ménard et al., 2010).

La voie paracellulaire dépend, comme décrit précédemment, des jonctions serrées et de la taille des pores qu'elles créent. En conditions basales, le diamètre des molécules capables de traverser l'épithélium intestinal par cette voie est compris entre 0,4 et 0,9 nm dans les villosités et de 5 à 6 nm dans les cryptes (Fihn et al., 2000) avec un poids moléculaire n'excédant pas 600 Da (Watson et al., 2001). Cette voie est utilisée par les petites molécules hydrophiles ne pouvant pas passer la membrane plasmique par diffusion passive. Les bisphénols peuvent par exemple passer par cette voie (poids moléculaire compris entre 200 et 251 Da). Ce passage paracellulaire permet également de faire passer les prolongements des cellules dendritiques (DC), appelées dendrites, qui résident dans la LP (Figure 16). Ces dendrites vont pouvoir capter des antigènes et autres bactéries du contenu luminal pour permettre l'éducation du système immunitaire (ce point sera détaillé dans la suite du manuscrit) (Mazzini et al., 2014; Mowat and Agace, 2014; Rescigno et al., 2001). Enfin, il existe un dernier mode de passage paracellulaire qui a lieu dans les espaces laissés vacant lors de l'apoptose de cellules de l'épithélium intestinal (Ménard et al., 2010).

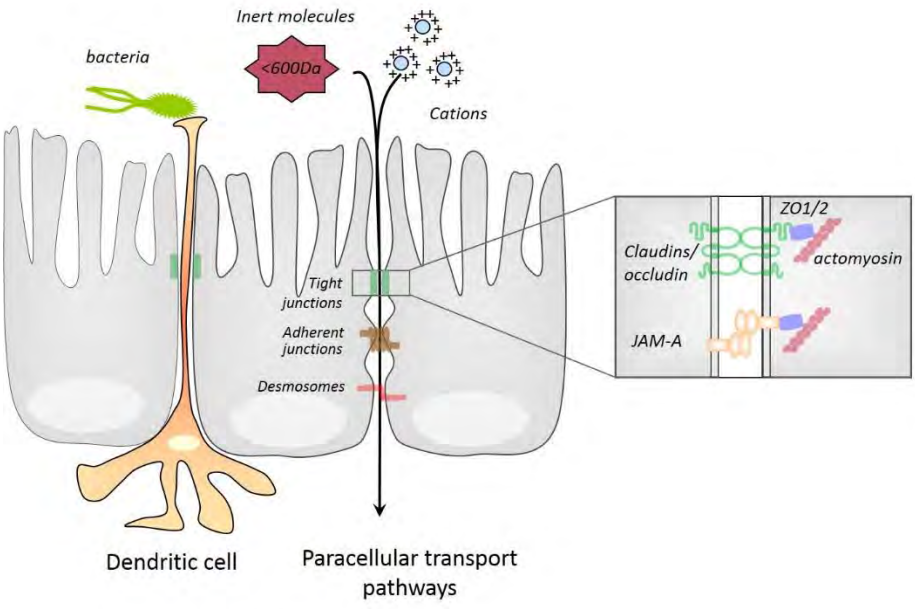


Figure 16 : Voie paracellulaire de l'épithélium intestinal et structures associées (Ménard et al., 2010).

La voie transcellulaire permet le passage de molécules supérieures à 600 Da à travers les cellules de l'épithélium intestinal. Le passage de ces molécules peut être réalisé par diffusion passive *via* par exemple les aquaporines, par transport actif impliquant des transporteurs ou par endocytose, transcytose, exocytose (Figure 17). Les composés lipophiles, comme les bisphénols, peuvent diffuser passivement alors que des transporteurs actifs sont nécessaires pour la diffusion des acides aminés et du glucose (Ménard et al., 2010; Zalko et al., 2011). L'endocytose/transcytose assure le passage des molécules de grandes tailles ne pouvant pas utiliser les autres voies de diffusion. Les cellules M tapissant les FAE sont spécialisées dans le passage transcellulaire grâce à leur grande activité d'endocytose.

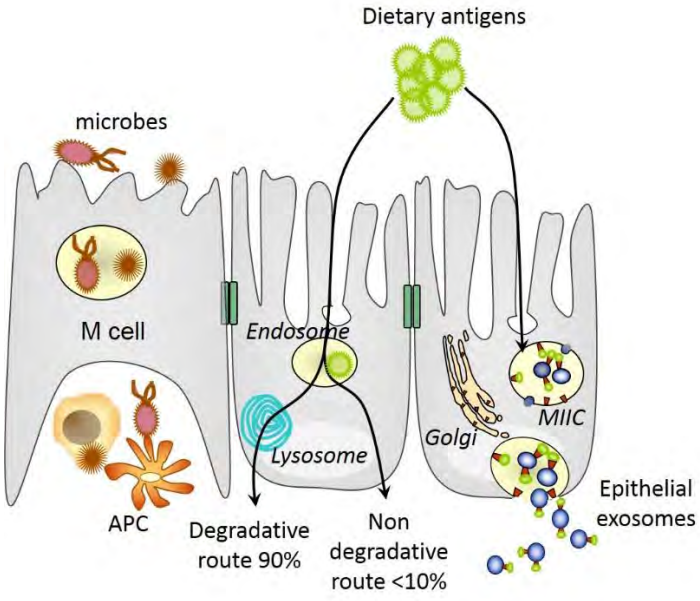


Figure 17 : Voie transcellulaire de l'épithélium intestinal et structures associées (Ménard et al., 2010).

Après passage à travers l'épithélium intestinal, les molécules vont rejoindre la circulation sanguine ou lymphatique. Le drainage sanguin s'effectue par les nombreux vaisseaux sanguins présents dans la sous-muqueuse. Le sang possédant les molécules absorbées va ensuite rejoindre la circulation systémique et notamment le foie pour y effectuer une détoxification. Le drainage lymphatique intestinal s'effectue au sein de la couche musculeuse et dans la muqueuse. La lymphe des villosités intestinales est collectée par les capillaires lymphatiques connectés au réseau lymphatique présent également dans la sous-muqueuse. Cette lymphe contenant les molécules absorbées va rejoindre les ganglions mésentériques (MLN)

drainant l'intestin où la réponse immunitaire sera initiée (structure de ces ganglions décrite dans la suite du manuscrit). La lymphe rejoint ensuite la circulation sanguine *via* le canal thoracique (Mowat and Agace, 2014) (Figure 18).

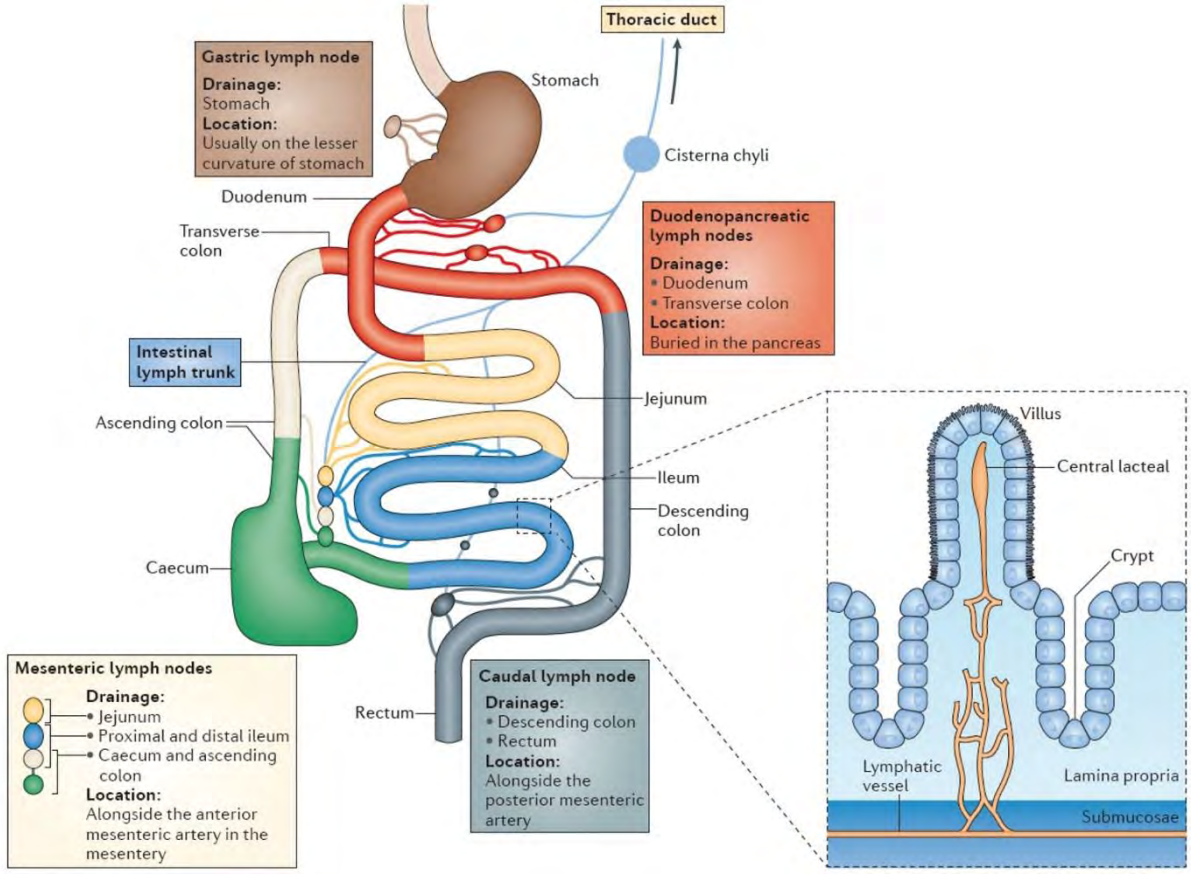


Figure 18 : Drainage lymphatique de l'intestin (Mowat and Agace, 2014).

2.2 Le système immunitaire intestinal

La barrière immunitaire est un autre composant majeur dans la fonction de barrière intestinale. La perméabilité épithéliale contribue à l'éducation du système immunitaire chez les nouveau-nés en préparation aux fonctions tolérogènes et à la défense contre les pathogènes présents dans la lumière intestinale (parasite, virus, bactéries…). Le système immunitaire intestinal est en effet chargé de maintenir l'homéostasie au sein du microbiote intestinal en promouvant la tolérance envers les bactéries commensales et la défense contre les pathogènes (le microbiote intestinal est décrit dans la suite de ce manuscrit (chapitre 2.3 des données bibliographiques)). Il permet aussi de mettre en place une tolérance envers les antigènes

alimentaires, aussi appelé tolérance alimentaire, permettant d'éviter une réponse de défense contre les nutriments. L'intestin possède donc un système immunitaire disposant de nombreux types cellulaires et de structures clés permettant une réponse adéquate envers des antigènes du non-soi et les pathogènes.

2.2.1 Les structures clés du système immunitaire intestinal

La muqueuse intestinale dispose d'un tissu lymphoïde qui lui est directement associé, le *Gut Associated Lymphoïd Tissue* (GALT) organisé en diverses structures, lui-même associé avec le système immunitaire systémique. On compte, parmi ces structures importantes, les plaques de Peyer (PP), les cryptopatches et follicules lymphoïdes isolés qui vont permettre la poursuite de l'éducation du système immunitaire dans les ganglions mésentériques (MLN).

Les PP sont situées tout le long de l'intestin grêle et surtout au niveau de l'iléon. Elles se trouvent dans la sous-muqueuse et sont composées d'agrégats de follicules riches en lymphocytes B (LB) (zone B) associés à des zones riches en lymphocytes T (LT) (zone T). Les PP sont composées de trois compartiments à savoir l'épithélium associé au follicule (FAE), le dôme sous-épithélial et la zone folliculaire ou lymphoïde. Le FAE est l'épithélium recouvrant les PP, formant l'interface entre l'environnement de la lumière intestinale et le système lymphoïde intestinal. Il est composé majoritairement d'entérocytes et de cellules M spécialisées dans la capture d'antigènes et est pauvre en cellules caliciformes. Le dôme sous-épithélial est une zone diffuse enrichie en LB et LT associés à des cellules dendritiques (DC) et des macrophages. Enfin, la zone folliculaire ou lymphoïde est composée de follicules de cellules B immatures associées au centre germinatif, séparées par des zones interfolliculaires qui sont spécialisées dans la sensibilisation des LT (Figure 19). Lors de déclenchement d'une réponse immunitaire, les lymphocytes T helper (Th) différenciés suite à la présentation d'antigènes par les DC, rejoignent la zone folliculaire où ils vont activer les LB pour former le centre germinatif. Suite à cela, les LB pourront effectuer leur commutation de classe des Ig.

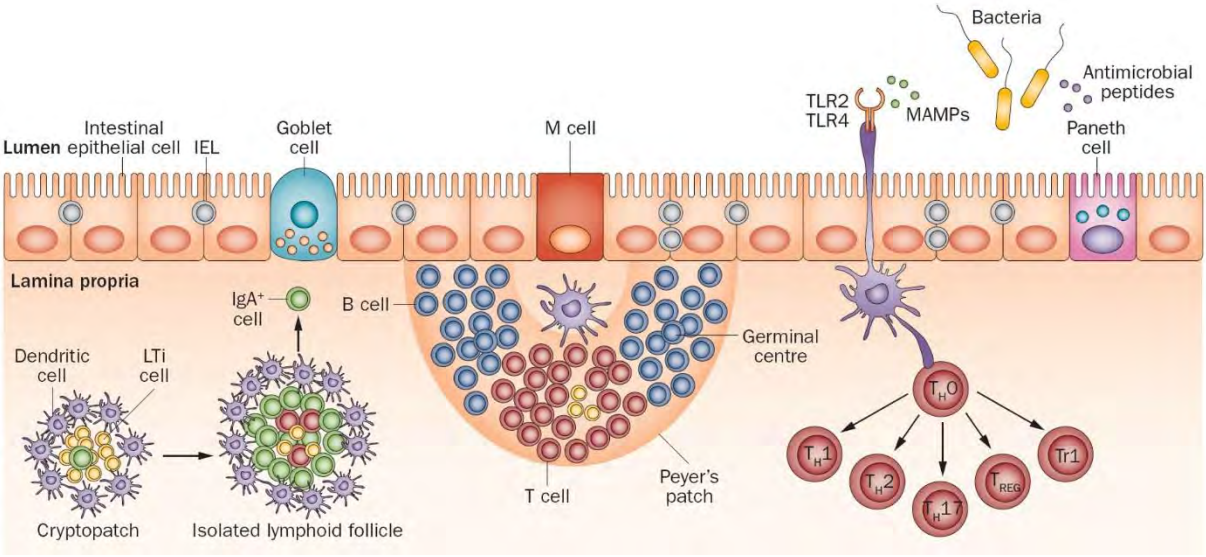


Figure 19 : Schéma simplifié d'une PP, d'un cryptopatche et d'un follicule lymphoïde isolé (Jain and Walker, 2014).

Les cryptopatches sont des amas de cellules lymphoïdes situés dans la LP et divisés en deux sous-types de populations (Figure 19). Au centre du cryptopatche, des LTi (*Lymphoid tissue-inducer cell* - LT qui expriment le récepteur IL-7α, le CD44 et le c-kit mais aucun marqueur des LT, LB ou macrophages) sont présents. Ces LTi sont entourés de DC. De plus, l'expression du récepteur CCR (*C-C Chemokine Receptor*)6 par ces cellules vont permettre le développement de ces cryptopatches en follicules lymphoïdes isolés (Lügering et al., 2010).

Ces follicules lymphoïdes isolés sont composés également d'un épithélium de DC contenant les LT et LB. Après signalement d'un antigène, les DC vont se disperser dans la LP et permettre la maturation des LB (Figure 19).

Les ganglions mésentériques (MLN) sont des organes de « premier passage » pour les nutriments et les molécules microbiennes entrant dans la lymphe de la LP. Ils servent de site d'induction de la tolérance alimentaire. La tolérance alimentaire se met en place grâce aux lymphocytes T régulateurs (Treg) spécifiques des antigènes alimentaires. Leur induction se fait grâce à la présentation antigénique des DC tolérogènes ainsi que par les cellules épithéliales et stromales de l'intestin. Cette présentation s'effectue dans les PP et les MLN. Le trafic cellulaire lymphatique entre l'intestin et les MLN est donc primordial pour l'induction de la tolérance alimentaire. Les MLN servent également de « pare-feu » contre la propagation des microorganismes dans la circulation sanguine. Les MLN agissent comme des filtres à LT et LB provenant du drainage lymphatique des villosités et des PP.

2.2.2 Les cellules immunitaires de l'intestin

Les cellules immunitaires sont classées selon leur appartenance à deux types d'immunité : l'immunité innée et l'immunité adaptative (Figure 20).

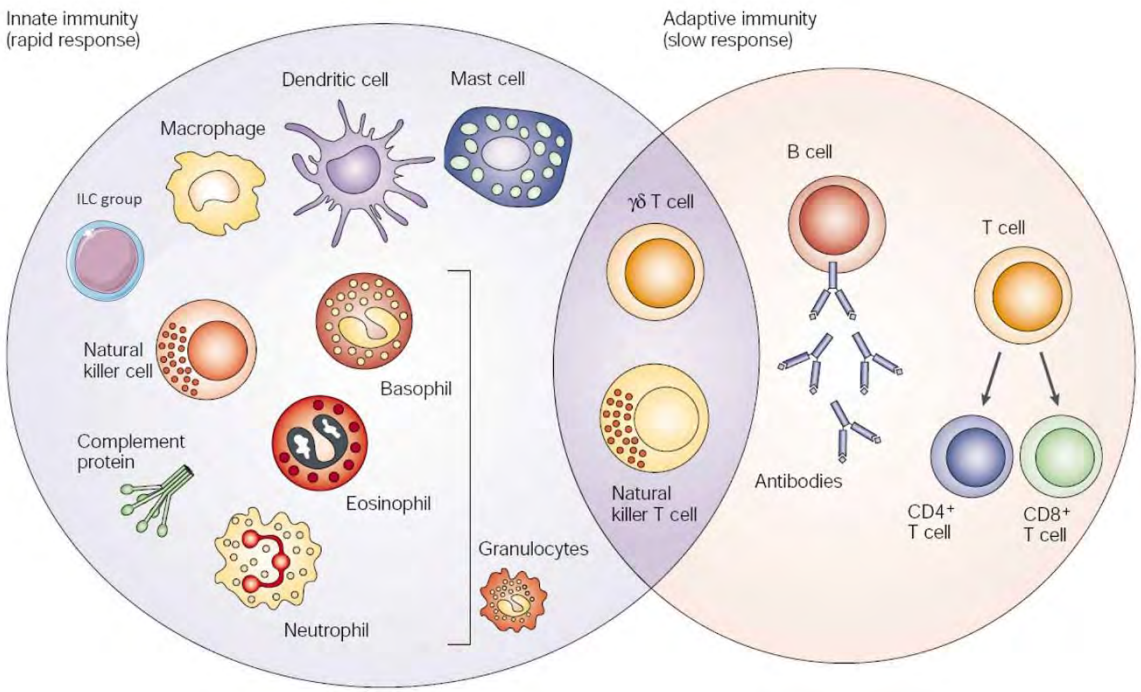


Figure 20 : Les différentes cellules impliquées dans la réponse immunitaire innée et adaptative (Dranoff, 2004).

L'immunité innée comprend les cellules et les mécanismes permettant la défense de l'organisme contre les agents infectieux de façon immédiate. Elle est la première ligne de défense non spécifique contre les pathogènes et fait intervenir plusieurs types cellulaires issus de la lignée myéloïde tels que les neutrophiles, les macrophages, les DC, les éosinophiles, les basophiles, les mastocytes et les cellules *Natural Killer* (NK). De plus, des cellules non immunitaires comme les cellules épithéliales intestinales peuvent également jouer un rôle en induisant différentes réponses inflammatoires. Ces cellules disposent de récepteurs PRR (pour *Pattern Recognition Receptor*) qui, comme leur nom l'indique, reconnaissent des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP) et aux signaux de dangers (DAMP). La famille des PRR contient les récepteurs de surface de la famille des TLR (*Toll-Like Receptor*) et les

récepteurs intracellulaires de la famille des NLR (récepteur de type Nod, *Nucleotide oligomerization domain*). Il existe 13 gènes codant pour des TLR chez l'homme et la souris, bien que les TLR 11, 12 et 13 ne soient exprimés que chez la souris. Les TLR 1, 2, 4, 5 et 6 sont membranaires alors que les TLR 3, 7, 8 et 9 sont intracellulaires. Le TLR 10 est membranaire ou intracellulaire en fonction du type de cellules. L'activation de ces récepteurs va mener à l'induction de la voie NF-κB, conduisant à l'expression des gènes de cytokines inflammatoires (IL-1 et IL-6) et de chimiokines (IL-8). Les macrophages et les mastocytes vont sécréter des effecteurs vasomoteurs comme l'histamine, les kinines et l'oxyde nitrique et augmenter le débit sanguin. L'augmentation du débit sanguin permet de favoriser le recrutement de cellules inflammatoires à partir des capillaires sanguins. Les macrophages peuvent phagocyter les bactéries et autres pathogènes ainsi que les débris de corps apoptotiques. Ils sont également capables de présenter les antigènes. Il existe 2 types de macrophages : les macrophages M1 proinflammatoires activés par le LPS et l'IFN-γ, et les macrophages M2 anti-inflammatoires producteurs d'IL-10. L'un des premiers signes d'une réponse inflammatoire est l'infiltration neutrophilaire. En effet, les neutrophiles sont recrutés pour éliminer les pathogènes grâce aux granules présentes dans leur cytoplasme qui contiennent des agents antimicrobiens tels que le lysozyme, les défensines et la lactoferrine, et des enzymes produisant des espèces réactives de l'oxygène comme la myéloperoxidase, la NADPH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate)-oxydase et la NO (Oxyde nitrique)-synthétase. Ces neutrophiles de façon comparable aux macrophages et aux DC peuvent phagocyter et dégrader les pathogènes. Les neutrophiles peuvent également servir de cellules présentatrices d'antigènes pour les cellules de l'immunité adaptative (Abi Abdallah et al., 2011; Vono et al., 2017). Les polynucléaires éosinophiles n'effectuent pas de phagocytose mais sont spécialisés dans la sécrétion de médiateurs antiparasitaires. Les polynucléaires basophiles sont plus rares et activent la réponse inflammatoire par la sécrétion d'histamine. Les cellules NK sont capables de cibler et de neutraliser sélectivement les cellules tumorales ou infectées. Elles participent activement à la réponse antivirale. Elles ont la capacité de sécréter des cytokines (IFN-γ et TNF-β) comme des lymphocytes T (LT) $CD4^+$. Elles ont également une activité cytotoxique sous forme de sécrétion de granzyme (protéine induisant l'apoptose des cellules ciblées) comparable aux LT $CD8^+$.

Une telle réponse inflammatoire peut induire des dommages tissulaires de types oxydatifs et protéolytiques. C'est pourquoi, en conditions physiologiques, la dernière phase d'une réponse inflammatoire comprend une phase de résolution qui consiste en une élimination des déchets par les macrophages et une augmentation des macrophages anti-inflammatoires de

type M2, ce qui va entraîner une augmentation de la production des cytokines anti-inflammatoires et un remodelage tissulaire par les fibroblastes.

Dans l'intestin, récemment décrites, les cellules lymphoïdes innées (ILC) sont caractérisées par une absence de TCR (*T Cell Receptor*) et de marqueurs phénotypiques des cellules myéloïdes (Spits and Cupedo, 2012). Il existe trois groupes d'ILC. Le groupe 1 des ILC inclut les ILC1 et les NK. Les ILC1 expriment le CD127 et le facteur de transcription Tbet. Elles ont une faible activité cytotoxique et sont impliquées dans la résistance à l'inflammation. Les ILC2 expriment le ST2 (récepteur à l'IL-1) et le facteur de transcription GATA3, et produisent des cytokines de type 2 (IL-4, IL-5, IL9 et IL-13). Elles sont impliquées dans la réponse face aux parasites, notamment des helminthes. Le groupe 3 des ILC comprend les ILC3 et les cellules LTi (*Lymphoïd Tissue inducer*). Les ILC3 expriment le CD127, le NKp46 et le facteur de transcription ROR (RAR-related Orphan Receptor)γt. Elles produisent de l'IL-17 et de l'IL-22 et sont impliquées dans la réponse innée contre le microbiote commensal (Sawa et al., 2011). En terme général, les ILC contribuent au maintien de l'intégrité de la barrière intestinale.

Les DC peuvent présenter des antigènes et initier la réponse adaptative. A l'état basal, les DC sont immatures et peuvent capturer des antigènes par phagocytose, macropinocytose ou endocytose. Les DC immatures sont peu mobiles et expriment très faiblement les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) II servant à la présentation antigénique, et les molécules de co-stimulation CD80/86 ainsi que les molécules de domiciliation tel que le CCR7. Les DC, par la présence de TLR, peuvent reconnaître des motifs moléculaires associés à des pathogènes et ainsi induire leur propre maturation. Les DC vont, suite à cette maturation, devenir plus mobile, diminuer leur capacité de capture d'antigènes et augmenter leur expression du CMH-II et du CD80/86. Elles vont rejoindre par la suite les organes lymphoïdes secondaires comme les MLN pour se localiser dans la zone T composée de lymphocyte T (LT) et permettre l'activation des LT naïfs (Figure 21).

Les DC intestinales résidentes peuvent être différenciées des macrophages principalement par leur expression du CD103. Les DC $CD103^+$ $CX3CR1^+$ sont présents dans la LP et peuvent former des dendrites transépithéliaux. Les DC acquièrent des capacités migratoires vers les MLN suite à l'expression de CCR7 et de CD11c. Parmi eux, les DC $CD103^+$ $CD11b^{+/-}$ peuvent induire la différenciation des LT en Treg *via* la synthèse d'AR. Les DC $CD103^-$ $CX3CR1^{int}$ quant à eux peuvent promouvoir la différenciation des LT en Th1 et Th17. Enfin les DC $CD103^-$ $CD11b^-$ provenant des ILF induisent la différenciation des LT en Th17 (Figure 21).

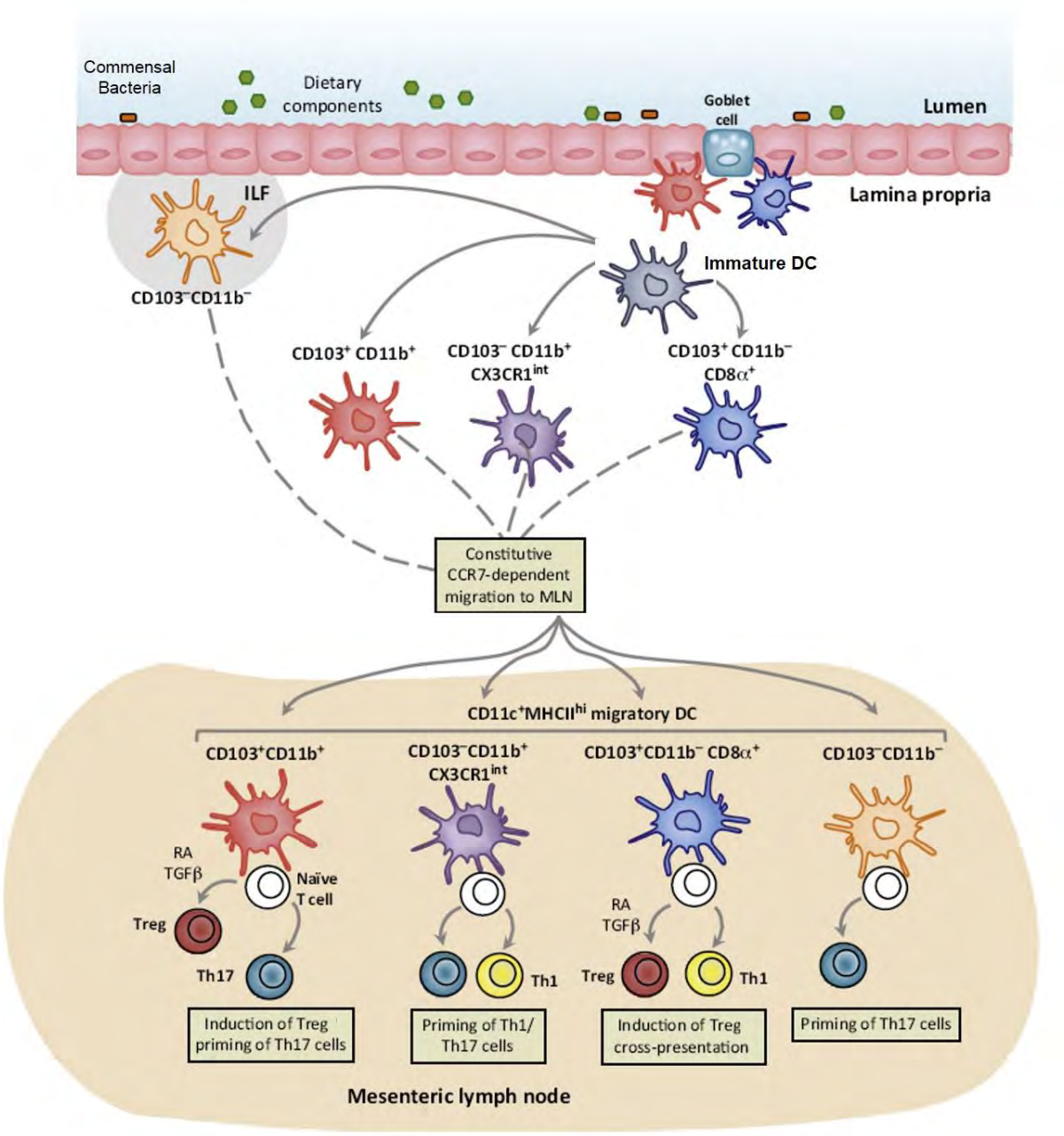


Figure 21 : Phénotypes des DC intestinaux et migratoires. Adaptée de Cerovic et al., 2014.

Une réponse immunitaire innée dérégulée peut être néfaste pour l'organisme et est susceptible d'entraîner l'apparition de différentes pathologies comme l'asthme, les allergies, le cancer. L'immunité innée est nécessaire et importante, de par la production de signaux de dangers et la présentation d'antigènes, ainsi que pour la mise en place de l'immunité adaptative.

L'immunité adaptative est une réponse tardive et spécifique face à un antigène. Elle comprend deux types cellulaires majeurs : les lymphocytes T et B (LT et LB). Ces lymphocytes sont capables de reconnaitre un antigène de façon spécifique, de mettre en place un phénomène

de mémoire pour ensuite répondre de façon efficace face à ce même antigène lors d'une présentation ultérieure.

L'initiation de la réponse immunitaire adaptative intestinale a lieu dans les PP et les MLN. Les LT auxiliaires ou helper (Th) rejoignent la zone B des PP et activent les LB pour former un centre germinatif. Une fois activés, les LB vont effectuer une commutation de classe et une maturation d'affinité des immunoglobulines (Ig) pour finir par se différencier en LB mémoire ou en plasmocytes qui sont des cellules spécialisées dans la production et la sécrétion d'Ig. La commutation de classe va permettre le changement d'isotype des IgD et IgM (peu affins pour un antigène donné) des LB, en IgG, IgA ou IgE (très affins pour un antigène donné). Les IgA vont être sécrétées dans la lumière intestinale grâce aux récepteurs aux Ig polymériques (pIgR). En effet, ces récepteurs vont se transloquer avec les IgA vers la lumière intestinale où ils vont se détacher en partie pour libérer les IgA, la partie restante servant de protection pour les IgA (Kaetzel and Mostov, 2005). Les IgA activent très peu le système du complément d'opsonisation permettant la phagocytose des pathogènes. Ils agissent en neutralisant les pathogènes par recouvrement empêchant ainsi leur interaction avec l'épithélium intestinal. Les IgG vont être sécrétées par le récepteur néonatal Fc (FcRn) par un procédé pH-dépendant. Cette transcytose des IgG par le FcRn est bidirectionnelle, traduisant une translocation des IgG de la muqueuse vers la lumière, mais également de la lumière vers la muqueuse (Baker et al., 2010). Les IgG agissent par de nombreux mécanismes : agglutination et immobilisation du pathogène, activation du complément et opsonisation. Des mécanismes d'activation des LB T-indépendants existent également, passant par des signaux de l'immunité innée, par exemple par la sécrétion de molécules comme les BAFF (*B cells-activating factor*) et APRIL (*a proliferation-inducing ligand*) par les DC. Parmi les LB, il existe les LB TFH (*T Follicular Helper*) spécialisés dans la formation et le maintien des centres germinatifs. Ces TFH sont essentiels dans la sélection et la survie des LB.

Comme décrit précédemment, les DC peuvent présenter des antigènes et initier la réponse adaptative. L'activation des LT naïfs par les DC se fait en trois étapes. Les LT passent d'un état naïf (faible expression de CD44, forte expression de CD62L) à un état activé (forte expression de CD44, faible expression de CD62L) pour finir à un état mémoire. Il y a tout d'abord reconnaissance du complexe CMH-II-peptide antigénique ou du complexe CMH-I-peptide antigénique par le TCR des LT $CD4^+$ ou $CD8^+$, respectivement. Ensuite, un signal d'identification et de co-activation s'effectue entre le CD28 des LT et le CD80/86 des DC. Cette étape est primordiale car si elle est absente, le LT ne pourra pas s'activer et va entrer dans un état d'anérgie qui empêchera toute activation ultérieure. Enfin, la dernière étape est la

signalisation induite par les cytokines produites par les DC ou présentes dans le milieu. Selon ces signaux, les LT vont s'engager dans un lignage effecteur : les LT $CD8^+$ vont devenir des LT cytotoxiques et les LT $CD4^+$ vont devenir des LT auxiliaires (ou helper) (Th1, Th17, Th2 ou Treg).

Les cellules Th1 sont les cellules effectrices de la réponse immunitaire intracellulaire contre les bactéries, les virus et les parasites (Hsieh et al., 1993; Szabo et al., 2003). Les Th1 sont induits par l'IL-12 et l'IL-2. Ils produisent plusieurs cytokines dont son propre inducteur l'IL-2, du TNF α et β et de l'interféron (IFN) γ. L'IFN-γ, produit après activation du facteur de transcription Tbet, induit l'augmentation de l'activité phagocytaire des macrophages, l'augmentation de l'expression des molécules de présentation antigénique CMH-I et CMH-II et l'augmentation de la production de l'IL-12 et d'agents anti-microbiens (Karupiah et al., 1993; Nathan, 1983; Wong et al., 1983). De plus, l'IFN-γ induit la différenciation des LT $CD8^+$ en LT cytotoxiques (Sad et al., 1995) qui entraînent l'apoptose des cellules infectées ou tumorales *via* la perforine et le granzyme. L'IFN-γ entraîne également la commutation de classe des Ig vers les isotypes IgG2a et IgG3 (Finkelman et al., 1988a; Snapper and Paul, 1987) qui permettent l'opsonisation des pathogènes et la liaison des molécules appartenant à la cascade du complément, ce qui favorise la phagocytose des pathogènes.

Les cellules Th17 ont été décrites la première fois comme les cellules effectrices de la réponse immunitaire contre les bactéries extracellulaires et les infections fongiques (Dubin and Kolls, 2008), ce qui en font des acteurs importants de l'homéostasie intestinale. Les Th17 sont induites par l'IL-6, le facteur de croissance transformant TGF-β, l'IL-21 et l'IL-23. Ils produisent de l'IL-6, IL-21 et IL-22 ainsi que de l'IL-17A et F, l'IL-17 A étant la cytokine prédominante (Bettelli et al., 2008). L'IL-17A et F, produites après activation du facteur de transcription RORγt, induisent la production de nombreuses cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL1-β, TGF-β, TNF (*Tumor Necrosis Factor*)-α…), de chimiokines, de peptides antimicrobiens et de métalloprotéines par les fibroblastes et les cellules épithéliales des tissus (Fossiez et al., 1998). De plus, ces cytokines favorisent le recrutement des neutrophiles en induisant la production d'IL-8 par les macrophages (Bettelli et al., 2008). Ainsi, les Th17 sont également impliquées dans les processus inflammatoires chroniques, les maladies auto-immunes comme la polyarthrite rhumatoïde et la sclérose en plaques ainsi que l'allergie (Irvin et al., 2014; Zambrano-Zaragoza et al., 2014). L'IL-21, en plus de permettre la multiplication et l'amplification des Th17, induit l'activation, la prolifération et la maturation des LB ainsi que la commutation de classe des Ig vers les IgG1 et les IgG3 (Pene et al., 2004).

Les cellules Th2 sont les cellules effectrices de la réponse immunitaire contre les parasites extracellulaires comme les helminthes ou les toxoplasmes. Les Th2 sont induits par l'IL-4 (Kopf et al., 1993). Ils produisent de l'IL-13 l'IL-5, et de l'IL-4, sa cytokine signature. L'IL-4 produite par les Th2 va favoriser la différenciation des cellules T naïfs en Th2. L'IL-5 est la cytokine principale de différenciation, d'activation et de recrutement des éosinophiles (Yamaguchi et al., 1988). L'IL-13 serait impliquée dans la prolifération de LB, leur différenciation en plasmocytes et la commutation de classe vers les IgE (Emson et al., 1998). La réponse globale Th2 induit également, chez les LB, une commutation isotypique des Ig vers les IgG1 et les IgE, des isotypes ne fixant pas le complément mais induisant l'activation et la dégranulation des mastocytes (Finkelman et al., 1988b; Ochel et al., 1991; Segal et al., 1977), ce qui implique les Th2 dans des pathologies associées à l'allergie et à l'asthme (Schatz and Rosenwasser, 2014).

Les T régulateurs (Treg) sont les cellules nécessaires au maintien de la tolérance immunitaire envers les antigènes du soi et protège contre le développement des maladies auto-immunes. Il existe deux grandes catégories de Treg : les Treg naturels (nTreg) qui proviennent du thymus et les Treg induits en périphérie (iTreg). Les nTreg sont éduqués dans le thymus pour reconnaitre les antigènes du soi. Les iTreg sont induits en périphérie par le TGF-β et peuvent reconnaitre des antigènes du soi mais également du non soi comme les antigènes provenant de l'alimentation (Bluestone and Abbas, 2003; Yadav et al., 2013). Les Treg produisent des cytokines immunosuppressives dont l'IL-10 et le TGF-β. L'IL-10 est capable d'inhiber la phosphorylation de la molécule de co-stimulation CD28, ce qui empêche l'activation des LT (Akdis et al., 2000). L'IL-10 induit également, dans les DC, non seulement une diminution de l'expression des molécules CMH et de co-stimulation (CD80/86), mais également la production de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines (Moore et al., 2001). Ainsi, il a été démontré que l'IL-10 est un facteur pouvant inhiber le développement d'inflammations intestinales (Asseman et al., 1999). Le TGF et l'IL-10 vont également permettre une commutation de classe dans les LB pour produire des IgA dont les effets sur les pathogènes ont été décrits précédemment. Les Treg sont donc essentiels pour l'inhibition et le contrôle de la réponse immunitaire, évitant tout emballement du système immunitaire (sur-inflammation, maladies auto-immunes).

Les lymphocytes intra-épithéliaux (IEL) sont des cellules hétérogènes abondantes et expriment le TCRγδ et CD8. Ils sécrètent de l'IFN-γ, de l'IL-2, IL-4, IL-17 et l'IL-15. Cette dernière est une cytokine primordiale pour leur maintien (Malamut et al., 2010). Les IEL

participent également au recrutement des LT $CD8^+$ mémoires, permettant une réponse mémoire importante lors d'une seconde stimulation (Huang et al., 2011).

2.2.3 Implication de AhR dans le système immunitaire intestinal

AhR, un des récepteurs susceptibles d'être une cible du BPA et de ses analogues, est primordial dans le développement et la différenciation de nombreux sous-types de cellules immunitaires. En effet, AhR est exprimé dans les DC, les macrophages, les Th17, les ILC, certains IEL ($TCR\alpha\beta^+$ $CD8\alpha\alpha^+$ et $TCR\gamma\delta^+$) et dans les LB (Stockinger et al., 2014). AhR est donc exprimé dans la muqueuse et l'épithélium intestinal. Son rôle dans le développement du système immunitaire intestinal n'a été caractérisé que partiellement (Figure 22) *via* la génération d'une lignée de souris déficiente (KO) pour AhR (*Ahr*$^{-/-}$).

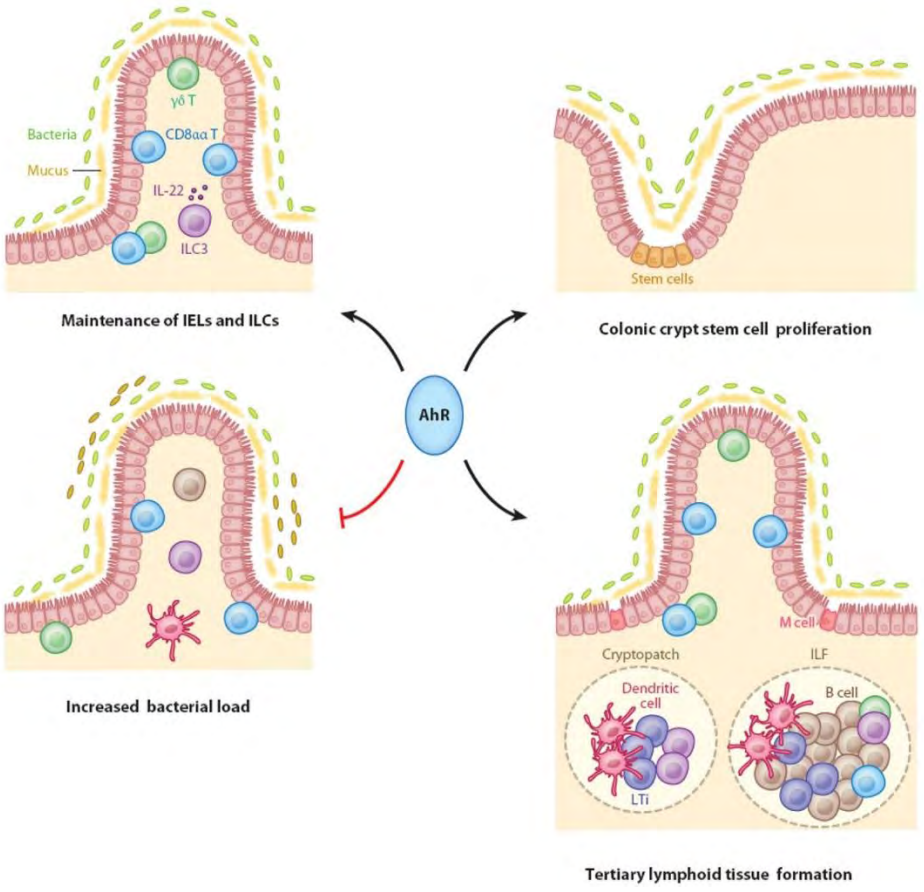


Figure 22 : Rôles de AhR dans l'intestin (souris KO) (Stockinger et al., 2014).

Il a été montré, grâce à cette lignée murine, qu'AhR jouait un rôle dans le maintien des IEL et des ILC (Li et al., 2011b; Qiu et al., 2012). Bien qu'AhR ne soit pas nécessaire pour spécifier la localisation tissulaire des IEL et ILC durant le développement embryonnaire, il est cependant primordial pour leur survie après la naissance. En effet, la déplétion d'AhR entraîne une perte des IEL TCR$\alpha\beta^+$ CD8$\alpha\alpha^+$ par un mécanisme impliquant la diminution de la survie de ces cellules sans impact sur leur prolifération (Li et al., 2011b). Elle entraîne également une diminution des LTi RORγt^+ et des ILC3 dans la LP ainsi qu'une diminution de la sécrétion d'IL-22 (Lee et al., 2011). Les ILC RORγt^+ déficientes en AhR sont également plus sensibles à l'apoptose. Une autre étude récente a suggéré que la production d'IL-22 *via* AhR par les ILC-3 était responsable de la suppression de la réponse inflammatoire Th17. En effet, les souris *Ahr*$^{-/-}$ présentent une augmentation des bactéries segmentées filamenteuses (favorisant la différenceiation des LT en Th17) et des Th17 (Qiu et al., 2013). Ces effets sur les cellules immunitaires ont également des conséquences sur le développement des organes lymphoïdes où les souris invalidées pour AhR présentent une absence de développement des cryptopatches et des follicules lymphoïdes isolés (Kiss et al., 2011).

Des effets nocifs de la déplétion d'AhR ont été également observés au niveau de l'épithélium intestinal. En effet, les souris *Ahr*$^{-/-}$ présentent une immunopathologie épithéliale exacerbée, avec des colites plus sévères après induction par le dextran sodium sulfate (DSS) et une augmentation de la charge bactérienne intestinale. De plus, la prolifération des cellules souches au sein des cryptes intestinales est fortement réduite en absence de signalement AhR (Stockinger et al., 2014).

2.3 Le microbiote intestinal

Anciennement appelé flore intestinale, le microbiote intestinal représente l'ensemble des microorganismes présents dans l'intestin. Parmi ces microorganismes, on compte les archées, les bactéries, les protistes, les fungi et les virus. Chez l'Homme adulte, ce microbiote représenterait approximativement 10^{14} bactéries, soit l'organe renfermant la plus grande colonie bactérienne (aucune information sur le nombre de bactéries intestinales chez la souris). Il a de nombreux rôles essentiels pour la survie de l'hôte. En effet, le microbiote intestinal participe à la nutrition de l'hôte, à la maturation de la barrière intestinale et à la mise en place de la tolérance.

Certains composés ne sont pas absorbés ou dégradés par les enzymes dans l'intestin. Parmi ces composés figurent les fibres, les oligosaccharides, les monosaccharides ou les disaccharides. Le microbiote intestinal intervient ainsi dans la dégradation de ces composés pour former des acides gras à chaines courtes comme le propionate ou le butyrate dans le côlon de l'hôte. Il intervient également pour la synthèse de certaines vitamines comme la vitamine K.

Qui plus est, le microbiote intestinal constitue une ligne de défense supplémentaire par compétition avec les bactéries pathogènes. En effet, du fait de leur nombre important, les bactéries commensales (non pathogènes) de l'intestin vont limiter le développement des bactéries pathogènes ainsi que leur adhésion aux cellules épithéliales.

Enfin le microbiote intestinal induit des fonctions immunomodulatrices, permettant la mise en place de la tolérance et la maturation de la barrière intestinale. En effet, des expériences sur des souris axéniques (i.e. sans microbiote intestinal) ont montré que la surface intestinale, la bordure en brosse et les cryptes étaient moins développées chez ces souris mutantes et que leurs villosités étaient plus allongées (Falk et al., 1998; Gordon, 1967). Le microbiote intestinal module aussi la production ainsi que la qualité du mucus qui participe à l'efficacité de la barrière intestinale (Wrzosek et al., 2013). De plus, ces animaux axéniques présentent des PP et les MLN sous-développés, preuve d'une immaturité et d'une déficience du système immunitaire (Renz et al., 2011). La réintroduction d'un microbiote chez ces individus provoque donc la maturation de l'épithélium intestinal, mais également une réponse immunitaire tolérogène, menant à l'établissement d'un écosystème adapté à la colonisation par le microbiote commensal (Sudo et al., 1997; Tomas et al., 2013). Certaines bactéries vont également favoriser la maturation du système immunitaire adaptatif, comme par exemple les bactéries filamenteuses segmentées (déviation des LT en Th17) (Ivanov et al., 2009). Ce mécanisme de différenciation n'a pas encore été élucidé.

Finalement, un consensus a été mis en place pour définir ce microbiote intestinal, tant pour sa dynamique que pour ses fonctions primordiales, comme un organe à part entière.

2.3.1 Mise en place du microbiote intestinal

Pendant la période de gestation (ou grossesse chez l'Homme), il est communément accepté que le tube digestif du fœtus et l'environnement intra-utérin de la mère sont stériles. Il existe cependant des données qui montrent la présence de bactéries dans l'environnement intra-

utérin, suggérant une pré-implantation chez le fœtus avant la naissance. Certaines publications démontrent la présence d'ADN bactérien et de bactéries dans le liquide amniotique, le placenta et le méconium (premières selles du nouveau-né) (DiGiulio et al., 2008; Jiménez et al., 2005, 2008; Satokari et al., 2009). Cependant, ces données font encore débat quant à leur nature (exceptionnelle ou systématique) et ce n'est que lors de l'accouchement que le microbiote intestinal s'implante de façon massive chez le nouveau-né. Lors de l'accouchement par voie basse, l'invasion bactérienne provient en grande partie de la flore vaginale et cutanée de la mère. Cette implantation peut être mesurée dans le méconium plusieurs jours après l'accouchement. Le microbiote intestinal des nouveau-nés est très différent par rapport à celui des adultes et il existe d'importantes variations inter-individuelles et inter-espèces. Néanmoins, des tendances générales peuvent définir une implantation « normale » du microbiote intestinal. En effet, le développement de ce microbiote passe tout d'abord par une colonisation précoce de bactéries anaérobies facultatives (capables de se développer en présence ou absence d'oxygène) comme *Escherischia coli* (*E.coli*) et d'autres *Enterobacteriaceae* (Fanaro et al., 2003; Mackie et al., 1999). Ces bactéries vont supprimer en quelques jours l'intestin de son oxygène, transformant l'intestin en un environnement anaérobie qui favorise le développement, après une semaine, des bactéries anaérobies strictes (capables de se développer seulement en absence d'oxygène) comme les *Bifidobacteria*, les *Clostridia* et les *Bacteroidetes* (Scholtens et al., 2012). Les *Bifidobacteria* deviennent alors l'espèce prédominante dans l'intestin. A l'âge de 6 mois, le microbiote intestinal se complexifie grâce à l'allaitement et les *Clostridia* et les *Bacteroidetes* (les deux grands groupes du microbiote intestinal) sont présents chez tous les enfants avec une prédominance des *Bacteroidetes* (Palmer et al., 2007). La transition de l'allaitement vers la nourriture solide (sevrage) permet la maturation quasi-définitive du microbiote intestinal vers l'âge de 1 an avec de très fortes similarités inter-individuelles. Ce microbiote est ensuite considéré comme « adulte » ou « mature » à l'âge de 3 ans. Peu de données existent chez la souris pour le développement du microbiote intestinal. Cela s'explique par le fait que le microbiote diffère selon l'espèce, la localisation, les conditions d'hébergement… Cependant, une étude chez le rongeur a montré que le développement du microbiote intestinal suit les même tendances que celui de l'Homme grâce à la primo-colonisation de rat axéniques (dépourvu de microbiote intestinal) avec le microbiote de ratons âgés de 15 jours (Tomas et al., 2013).

De nombreux facteurs influencent le développement dit « normal » du microbiote intestinal (Figure 23). En effet, certaines contaminations par des composés chimiques, la prise

de médicaments, les maladies, le stress et l'exposition aux métaux lourds durant la grossesse altèrent le développement intestinal chez la descendance (Matamoros et al., 2013). Le mode d'accouchement est aussi un paramètre important. En effet, l'accouchement par césarienne empêche le contact du nouveau-né avec la flore maternelle, ce qui perturbe et retarde l'implantation naturelle du microbiote. Le nouveau-né est ainsi en présence essentiellement de la microflore de l'environnement hospitalier, ce qui entraînent des différences dans le microbiote intestinal par rapport à des individus nés par voie basse (Biasucci et al., 2010; Huurre et al., 2008). Ces différences peuvent avoir des effets à long terme difficiles à caractériser. Cependant, des études ont montré que l'accouchement par césarienne augmente de 60% le risque de développement d'asthme et de 19% le risque de diabète de Type I chez la descendance (Cardwell et al., 2008; Renz-Polster et al., 2005). Les enfants nés par césarienne souffrent également plus souvent de maladies cœliaques (Decker et al., 2010). De plus, la durée de la grossesse influence le développement du microbiote, avec d'importantes différences chez les individus nés précocement (Arboleya et al., 2012). De telles différences peuvent avoir des conséquences lors du développement mais restent à caractériser. Pendant la période post-natale, le mode d'allaitement joue également un rôle important. En effet, le lait maternel contient des *Bifidobacteria*, des *Lactobacillus*, des *Streptococcus* et des *Staphylococcus* qui correspondent aux premières bactéries colonisatrices de l'intestin (Collado et al., 2009; Fernández et al., 2013). Les nouveau-nés allaités par le lait maternel présentent donc plus de bactéries de ces différentes familles et moins de *Bacteroides*, de *Clostridium coccoides* et d'*Enterobacteriaceae* par rapport aux enfants nourris au lait maternisé (lait premier âge) (Fallani et al., 2010; Harmsen et al., 2000; Rinne et al., 2005). La prise d'antibiotiques en période post-natale influence également négativement, de par l'élimination de nombreuses bactéries commensales, le développement du microbiote intestinal de l'individu (Arboleya et al., 2016). Enfin, l'environnement aussi bien géographique, individuel ou culturel joue aussi un rôle important pour l'implantation et la maturation du microbiote intestinal (Harmsen and de Goffau, 2016).

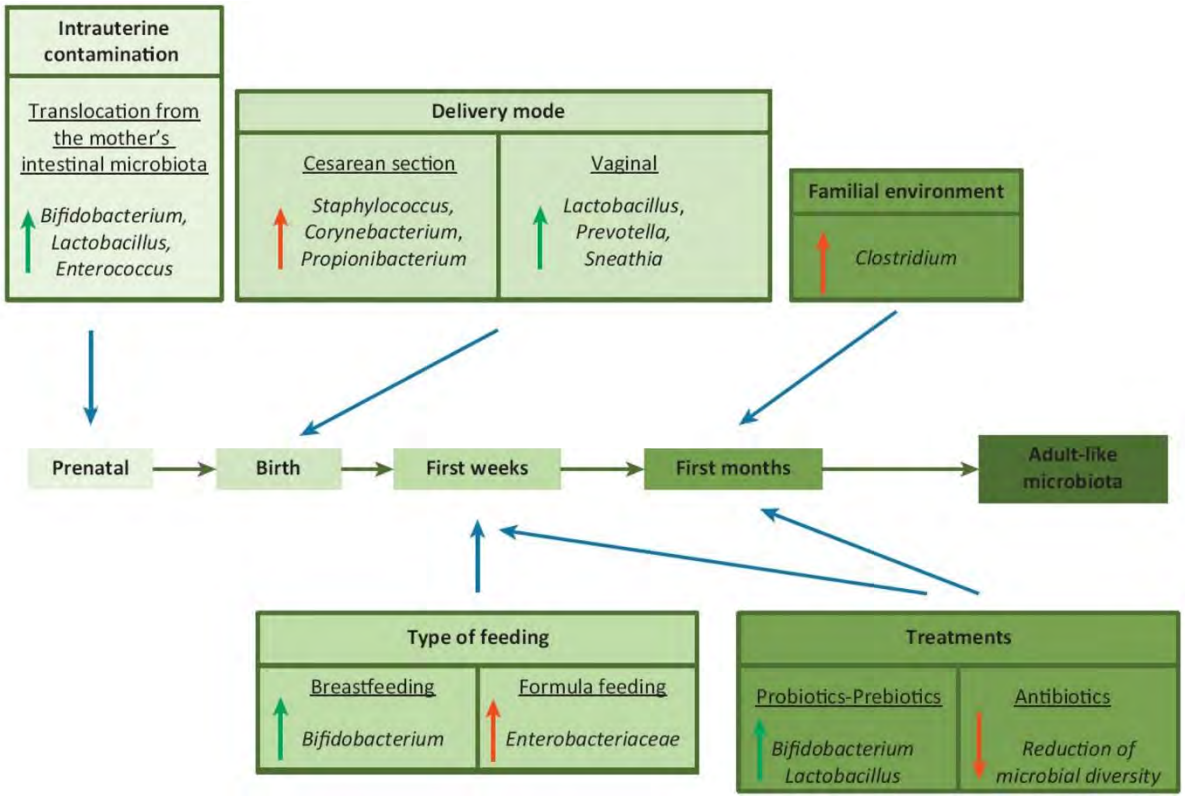


Figure 23 : Impacts des facteurs externes sur le développement du microbiote intestinal de l'individu (Matamoros et al., 2013).

2.3.2 Composition et diversité du microbiote intestinal

Le microbiote intestinal est composé en grande majorité de bactéries anaérobies strictes qui dominent les bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatives.

En condition physiologique, le microbiote intestinal adulte - bien que très variable d'un individu à un autre - reste stable et est caractérisé par deux familles majoritaires parmi la cinquantaine référencée : les Firmicutes et les Bacteroidetes. Les Firmicutes contiennent des bactéries majoritairement *gram*-positives et sont toujours très fortement représentés (65 et 52,1% respectivement chez l'Homme et la souris) (Figure 24). Ils sont impliqués dans la résorption d'énergie (Jandhyala, 2015). On compte parmi cette grande famille de bactéries, deux grands groupes à savoir les *Eubacterium* rectales – *Clostridium coccoides* et les *Clostridium leptum*. Le premier groupe, le plus représenté, est composé des *Eubacteria*, des *Clostridia*, des *Ruminococcus* et des *Butyrovibrio*. Le deuxième groupe est composé des *Fæcalibacterium prausnitzii*, *Ruminococcus albus* et *Ruminococcus flavefaciens*.

Les *Bacteroidetes* contiennent des bactéries *gram*-négatives et sont également très représentées dans le microbiote intestinal (30,4 et 37 % respectivement chez l'Homme et la souris). Ils sont spécialistes dans la dégradation des protéines et les carbohydrates (Thomas et al., 2011). Ils sont composés majoritairement par des genres apparentés au *Bacteroides* dont *Prevotella* et *Porphyromonas*. Une famille qui est aussi présente parmi le microbiote intestinal mais moins systématiquement détectée est celle des *Actinobacteria* qui comprend le groupe des *Bifidobacteria*. Si le microbiote intestinal est caractérisé majoritairement par ces grandes familles phylogénétiques qui sont très conservées parmi la population mondiale, il existe de nombreuses espèces bactériennes individu-spécifiques ce qui indique que le microbiote intestinal est propre à chaque individu avec une dynamique bien spécifique.

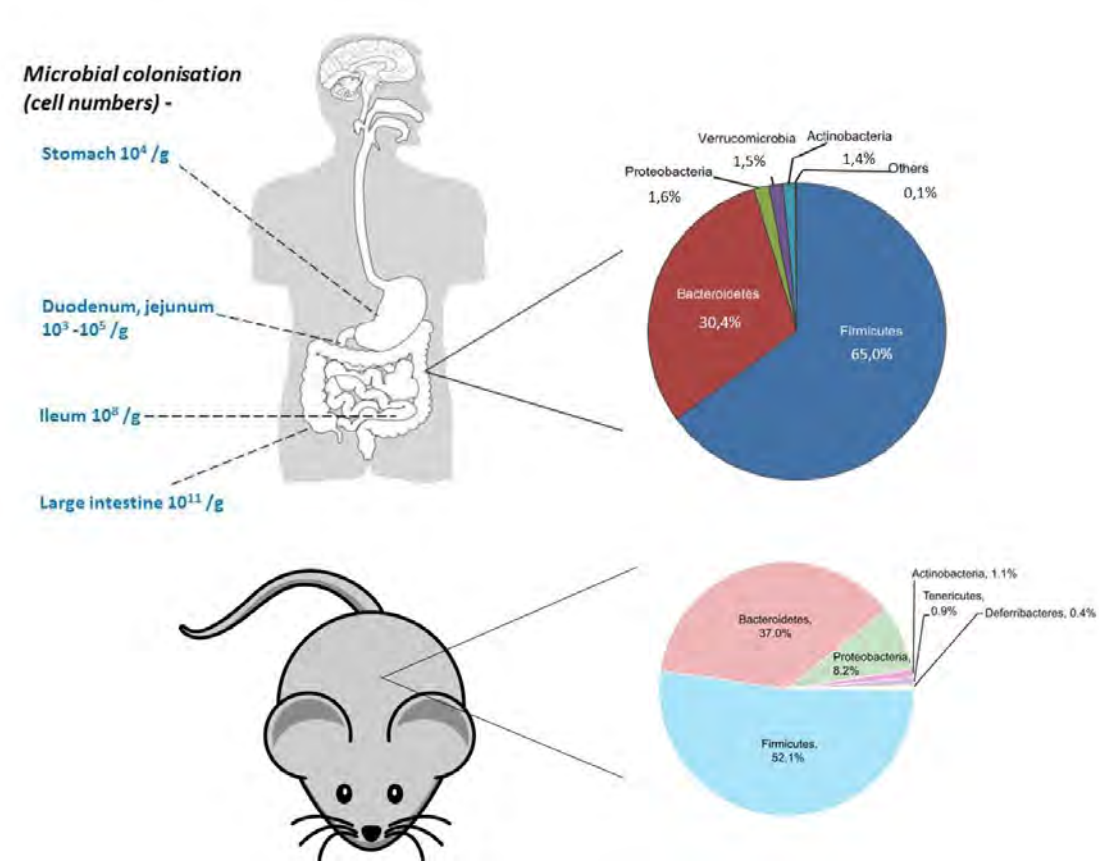


Figure 24 : Composition du microbiote intestinal chez l'Homme et la souris.

Il existe des variations qualitatives et quantitatives selon le segment intestinal observé (Drasar, 1974). En effet, la quantité de bactéries intestinales augmente au fur et à mesure du tractus digestif. Chez l'Homme, le duodénum contient seulement 10^3 bactéries par gramme de

contenu luminal en raison du temps de transit court, du pH acide et de nombreux peptides antimicrobiens produits dans ce segment. Dans cette portion de l'intestin, on dénote la prédominance des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatives. Le jéjunum et l'iléon contiennent quant à eux 10^4 et 10^8 bactéries par gramme de contenu du fait de leurs conditions plus promptes au développement bactérien. L'environnement de cette portion de l'intestin favorise le développement des bactéries anaérobies strictes. Le côlon est la partie intestinale contenant le plus de bactéries avec 10^{11}-10^{12} bactéries par gramme de contenu colique (O'Hara and Shanahan, 2006). Les bactéries anaérobies strictes y sont encore une fois grandement majoritaires (1000 bactéries anaérobies pour 1 bactérie aérobie).

2.3.3 Facteurs d'altérations du microbiote intestinal adulte

Le microbiote intestinal adulte, bien que stable, peut subir de très fortes variations (dysbiose), en terme de composition et de diversité, en fonction de certains paramètres physiologiques et/ou environnementaux. Parmi ces facteurs influençant le microbiote, on compte principalement l'âge, l'alimentation et l'administration de composés exogènes comme les antibiotiques ou les contaminants chimiques (Figure 25).

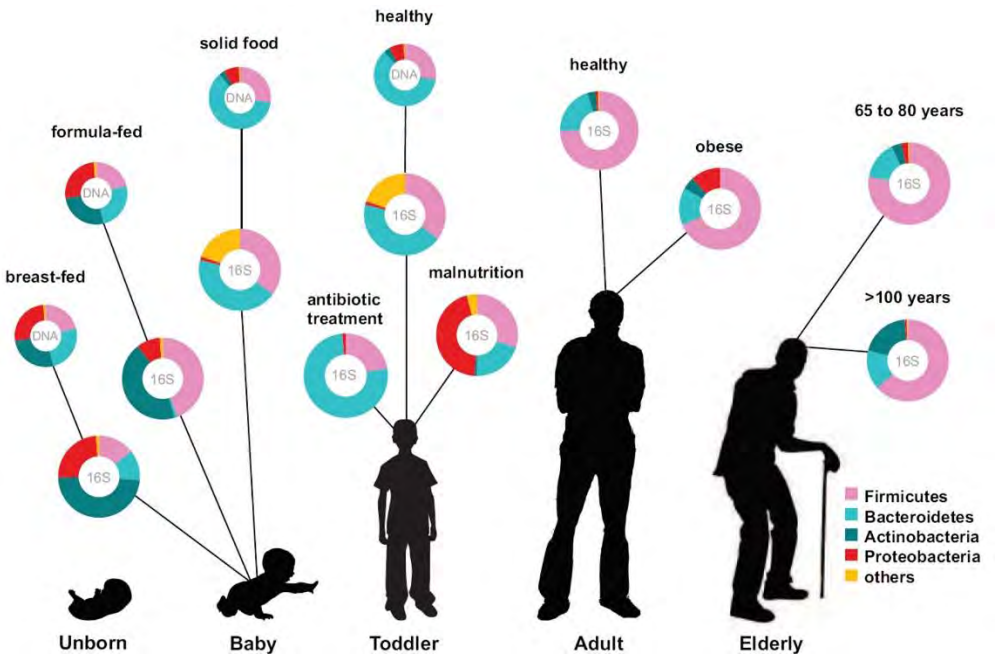


Figure 25 : Evolution du microbiote intestinal humain en fonction de l'âge et de différents paramètres environnementaux (Ottman et al., 2012).

Le processus de vieillissement a des effets négatifs sur la diversité du microbiote intestinal chez l'Homme. En effet, il a été démontré que le microbiote intestinal des personnes âgées présentait des hauts niveaux d'*E.coli* et de *Bacteroidetes* avec une différence significative dans le ratio *Firmicutes*/*Bacteroidetes* par rapport à de jeunes adultes (Marcobal et al., 2011). De plus, les sujets âgés présentent également une diminution significative du nombre total de bactéries intestinales. Cette évolution du microbiote intestinal en fonction de l'âge peut être expliquée par l'utilisation plus importante d'antibiotiques dans cette catégorie d'âge (Zapata and Quagliarello, 2015). Un changement dans les habitudes alimentaires des personnes vieillissantes n'est également pas à exclure.

En effet, les habitudes alimentaires ont des effets significatifs sur la composition du microbiote intestinal. Ainsi, celui des enfants européens, riche en *Firmicutes* et *Proteobacteria*, est différent de celui des enfants africains qui est enrichi en *Actinobacteria* et en *Bacteroidetes* (De Filippo et al., 2010). La composition en nutriments du régime joue également un rôle important. En effet, un régime riche en protéines et en graisses animales est caractérisé par un microbiote avec de hauts niveaux de bactéries de la famille des *Bacteroidetes* (Wu et al., 2011). De plus, des enfants issus du Bangladesh souffrant de malnutrition (régime alimentaire caractérisé par la déficience ou l'excès d'un ou plusieurs nutriments) présentent un microbiote intestinal moins diversifié avec moins de *Bacteroidetes* et une dominance des *Proteobacteria*, comparé aux enfants issus de familles à revenu modéré de la même région (Monira et al., 2011). Enfin, les individus obèses, consommant de grandes quantités de sucres et de graisses, présentent un microbiote également différent par rapport aux individus sains, caractérisé par de fortes capacités d'extraction énergétique des nutriments (Turnbaugh et al., 2006). Sa composition ne fait pas encore l'objet d'un consensus, du fait de résultats non reproductibles montrant une augmentation du ratio *Firmicutes*/*Bacteroidetes* chez l'Homme et la souris (Ley et al., 2005, 2006; Nadal et al., 2009).

De nombreuses études rapportent des changements dans la composition du microbiote intestinal lors de la prise répétée d'antibiotiques (Hu et al., 2015; Lange et al., 2016; Mikkelsen et al., 2015). En effet, les antibiotiques vont déstabiliser le ratio bactéries commensales / bactéries étrangères, induisant une rupture de l'homéostasie du microbiote intestinal. De plus certains composés chimiques contaminants, comme le BPA, sont connus pour créer des dysbioses dans l'intestin (Javurek et al., 2016; Lai et al., 2016). Ce point sera discuté plus en détail dans la suite du mémoire. (Chapitre 2.4.3 des données bibliograpiques).

2.4 Conséquences de l'exposition directe et périnatale au BPA sur la physiologie intestinale

De nombreux effets du BPA sur la physiologie de l'intestin ont été étudiés, portant aussi bien dans la fonction « barrière » de l'intestin que sur l'homéostasie du système immunitaire et celui du microbiote intestinal.

2.4.1 Bisphénol A et barrière intestinale

Le BPA à 5mg et 50µg/kg de poids corporel/jour en exposition directe chronique par gavage pendant 15 jours, est capable de diminuer, de manière dose-dépendante, la perméabilité paracellulaire colique chez la rate adulte ovarieoctimisée (Braniste et al., 2010). Dans cette étude, l'ED50 (dose à laquelle 50% de l'effet est observé) du BPA pour la diminution de la perméabilité intestinale a été calculée à 5,2 µg/kg de poids corporel/jour, correspondant à la DJT actuelle (4 µg/kg de poids corporel/jour). Il a été montré que cet effet est dû à la surexpression des protéines transmembranaires des jonctions serrées Occludine et JAM-A de façon ER-dépendant. Ce résultat a été confirmé *in vitro* sur la lignée cellulaire humaine Caco-2 exposée 24h au BPA à 10 nM, proche des concentrations circulantes chez l'Homme (Braniste et al., 2010).

Toujours dans la même étude, le BPA à 5 mg/kg de poids corporel/jour administré par voie orale induit une hypersensibilité viscérale chez la rate ovariectomisée, ce qui pourrait augmenter les symptômes des maladies coeliaques et du syndrome du côlon irritable. De plus, la réponse à la douleur est similaire à celle produit par l'estradiol. Cependant aucune hypersensibilité n'est observée à la dose 50 µg/kg de poids corporel/jour. Dans cette étude, le BPA à la NOAEL de 5 mg/kg de poids corporel/jour administré par voie orale pendant la période périnatale diminue la perméabilité intestinale de la descendance femelle et ce de manière sexe-dépendant (non retrouvé chez le mâle). Le BPA peut donc agir de manière sexe-spécifique dans ses effets biologiques et altérer la fonction « barrière » de l'intestin par modulation de la perméabilité, contemporain d'une hypersensibilité viscérale accrue.

2.4.2 Bisphénol A et homéostasie du système immunitaire intestinal

Deux études témoignent d'effets importants du BPA sur le développement du système immunitaire intestinal et son homéostasie chez l'adulte. Dans la première étude, des rates gestantes ont été exposées à des doses faibles à modérées de BPA (0,5, 5 ou 50 µg/kg de poids corporel/jour) et la tolérance orale vis-à-vis d'un antigène alimentaire modèle (l'ovalbumine, OVA) a été étudiée chez la descendance femelle adulte (jour (J) 45) (Menard et al., 2014b). Dans ce but, la descendance a été soit tolérisée à l'OVA (gavage puis injection suivi d'un rappel) soit immunisée (injection suivi d'un rappel) pour étudier le niveau de la réponse adaptative envers l'OVA. Les résultats ont montré que la descendance tolérisée exposée en périnatal au BPA présentait une augmentation de la réponse à l'antigène caractérisée par une élévation des IgG anti-OVA sanguins, et ce, à très faible dose de BPA. Ce résultat a été également retrouvé chez la descendance BPA immunisée mais seulement à la dose de 5 µg/kg de poids corporel/jour. De plus, la descendance BPA tolérisée, suite à un challenge oral à l'OVA, présente une augmentation de l'inflammation colique avec infiltration neutrophilaire, une augmentation d'IFN-γ (réponse Th1) et la diminution de TGF-β. L'exposition périnatale au BPA peut donc altérer, chez la descendance, le développement du système immunitaire intestinal aboutissant à une intolérance alimentaire.

La deuxième étude a cherché à comprendre si cette altération du développement du système immunitaire en réponse à l'exposition périnatale au BPA avait des conséquences chez la descendance jeune à J25, soit juste après le sevrage et avant la puberté (Menard et al., 2014a). Pour cela, le même protocole d'exposition au BPA a été utilisé chez des rates gestantes et allaitantes exposées par gavage à 5 µg/kg de poids corporel/jour. L'étude a mis en évidence des conséquences du désordre immunitaire induit par le BPA sur la susceptibilité de la descendance à l'infection par un nématode intestinal *Nippostrongylus brasiliensis* (*N.brasiliensis*). Les résultats n'ont montré aucune modification de la réponse anti-OVA chez les femelles à J25, immunisées ou tolérisées, bien qu'une diminution significative de la production d'IFN-γ soit présente au niveau des MLN et de la rate chez la descendance immunisée. Cependant, une diminution des Th, des Treg et des DC dans les MLN a été observée chez la descendance BPA. De façon intéressante, ces individus présentent une susceptibilité accrue à *N.brasiliensis* associée à une réponse Th1/Th2 inappropriée dans le jéjunum (augmentation de la production d'IL-13, 4, 10 et d'IFN-γ). L'exposition périnatale au BPA manifestement impacte le développement du système immunitaire intestinal augmentant la susceptibilité aux infections intestinales chez les jeunes et aboutissant à l'intolérance alimentaire à l'âge adulte.

Il existe cependant une étude n'observant aucun effet sur le système immunitaire intestinal (Nygaard et al., 2015). Dans celle-ci, des souris C3H/HeJ femelles ont été exposées au BPA dans l'eau de boisson (1, 10 et 100 µg/ml) à partir de l'accouplement jusqu'au jour 35 post-natal et la descendance femelle a été étudiée pour la tolérance orale au lupin. Aucun changement dans la réponse allergique clinique et systémique chez la descendance femelle n'a été constatée, des résultats en contradiction de ceux obtenus par Ménard et al. (2014). Cependant, cette étude reste difficile à comparer à celle de Ménard et al. du fait des différences dans le protocole expérimental (lignée murine, durée, dose et voie d'exposition du traitement, modèle de tolérance alimentaire). Le paramètre d'exposition au BPA (eau de boisson) reste problématique de par la faible solubilité du BPA dans l'eau et de la correspondance de la dose en µg/kg de poids corporel/jour : 180-340 µg/kg de poids corporel/jour pour la dose la plus faible, ce qui est peu relevant par rapport à la DJT actuelle (4 µg/kg de poids corporel/jour). Une autre étude ne trouve également aucun changement cette fois-ci dans l'apparition, la sévérité ou la résolution de la colite inflammatoire, lors d'une exposition directe ou en période périnatale à 50 µg/kg de poids corporel/jour (Roy et al., 2013). Cependant cette étude diffère également de l'étude de Ménard et al. de par la lignée murine (C57BL/6), du temps d'exposition au BPA (jour gestationnel 6 jusqu'au jour 21 post-natal et du sexe étudié (tout confondu dans cette étude). De plus cette étude se base seulement sur des paramètres physiologiques et macrologiques (morbidité, score histologique et longueur du côlon) et non immunologiques.

2.4.3 Bisphénol A et microbiote intestinal

Le BPA affecte le microbiote intestinal menant à une dysbiose. Une première étude a comparé le microbiote de souris mâles âgées de 21 jours après exposition en direct au BPA (eau de boisson, 120µg/mL) pendant 70 jours avec celui de souris nourries à un régime riche en graisse (HFD pour *High-Fat Diet*) ou en sucre (HSD pour *High-Sucrose Diet*) (Lai et al., 2016). Les résultats ont montré une diminution significative de la diversité du microbiote intestinal des individus exposés au BPA. De plus, l'exposition au BPA mène à une dysbiose similaire à celui d'un régime HFD ou HSD. En effet, les analyses comparatives ont montré que l'exposition au BPA ou à un régime HFD favorisait le développement des *Proteobacteria* et des bactéries de la famille des *Helicobacteraceae*, et réduisait les populations de *Firmicutes* et des *Clostridia*. L'exposition au BPA mène donc à une dysbiose intestinale qui pourrait avoir les mêmes effets néfastes sur l'intestin qu'un régime riche en graisse.

Une deuxième étude a évalué les conséquences sur le microbiote intestinal de l'exposition périnatale au BPA à 50mg/kg de nourriture ou à l'ethinyl estradiol (0,1 ppb) deux semaines avant accouplement et jusqu'au jour 30 post natal, à la fois chez la descendance (âgée de 30 jours) et chez les parents (Javurek et al., 2016). Les résultats ont montré des changements générationnels et sexe-dépendants du microbiote intestinal. De manière plus précise, les *Bacteroides*, les *Mollicutes*, les *Prevotellaceae*, les *Erysipelotichaceae*, les *Akkermansia*, les *Methanobrevibacter* et les *Sutterela* sont retrouvés augmentés, ce qui est également décrit dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, les désordres métaboliques et les cancers colorectaux (Baxter et al., 2014; Tamboli et al., 2004; Weir et al., 2013; Zackular et al., 2013). De manière intéressante, les *Bifidobacteria*, bénéfiques pour l'intestin, sont retrouvés augmentées seulement chez la descendance femelle. L'exposition au BPA provoque donc une dysbiose intestinale qui pourrait avoir les mêmes effets néfastes sur l'intestin que des maladies intestinales graves (Tamboli et al., 2004).

Le mécanisme du BPA sur ses effets modulateurs de microbiote intestinal fait encore débat. En effet, le BPA est de base un anti-bactérien avéré et peut agir en conséquence (Abdul Rasheed Md et al., 2013). Cependant, étant donné le lien étroit entre le système immunitaire et le microbiote intestinal, les dysbioses observées après exposition au BPA peuvent également être soit la cause soit la conséquence de l'altération du système immunitaire intestinal (Palm et al., 2015; Peterson et al., 2007).

CHAPITRE III –OBÉSITÉ ET DIABÈTE DE TYPE 2 : UNE PHYSIOPATHOLOGIE MODÈLE DE L'EXPOSITION AU BPA

Le BPA est classé parmi les facteurs de risque pour le développement des syndromes métaboliques et *in fine* de l'obésité et du diabète de type 2 (T2D). Un rappel sur ces syndromes et leurs liens avec le BPA est donc nécessaire pour la compréhension de ce travail de thèse.

3.1 Syndrome métabolique, diabète de type 2 et obésité : une préoccupation mondiale

Les syndromes métaboliques, comprenant entre autres, l'obésité, sont considérés comme un des plus importants fléaux au niveau mondial du 21ème siècle (Egger and Dixon, 2014; Tabish, 2007). Leurs conséquences d'un point de vue sociétal, médical et économique en font l'un des grands centres d'intérêt de la recherche scientifique et les classe parmi les syndromes émergents (i.e. syndromes nouveaux qui pourraient être provoqués par l'évolution et/ou la modification de l'environnement). Malgré tout l'intérêt porté sur ces troubles, la définition de syndrome métabolique n'est pas encore harmonisée. Cependant, quelques consensus permettent d'apporter un début de définition et ainsi un meilleur diagnostic.

3.2 Définition

Le terme de « syndrome métabolique » a été utilisé la première fois, dans son contexte, en 1977 pour décrire l'association de l'obésité, du diabète, de l'hyperlipoprotéinémie, de l'hyperuricémie et de la stéatose hépatique comme facteurs de risque pour l'athérosclérose (Haller, 1977). Le syndrome métabolique n'est pas une maladie en soi, mais désigne la présence d'un ensemble de signes physiologiques asymptomatiques représentant un facteur de risque pour le développement du T2D, des maladies cardiovasculaires et des accidents vasculaires cérébraux.

L'obésité, à la fois cause et conséquence de syndromes métaboliques, n'est pas une maladie à proprement parlé. Elle correspond à une condition physiopathologique dans laquelle l'excès de graisse corporelle s'est accumulé engendrant des effets négatifs sur la santé. Un individu humain est considéré comme obèse lorsque son indice de masse corporelle (IMC),

c'est-à-dire son poids (kg) divisé par le carré de sa taille (m), est supérieur à 30 kg/m^2 (Tableau 3).

Weight Categories	BMI (kg/m^2)
Underweight	< 18.5
Healthy Weight	18.5-24.9
Overweight	25-29.9
Obese	30-34.9
Severely Obese	35-39.9
Morbidly Obese	≥40

Tableau 3 : Indices de masse corporel et leur catégorie de poids associé (BMI : *Body Mass Index* (IMC)).

L'obésité augmente la probabilité de développer d'autres maladies physiologiques notamment les maladies cardiovasculaires, le T2D, l'apnée du sommeil, certains types de cancer et l'arthrose (Gallagher and LeRoith, 2015; Kelsey et al., 2014; Mathew and Castriotta, 2014; Nikolopoulou and Kadoglou, 2012; Schulert and Graham, 2014).

Le T2D est considéré comme une complication des syndromes métaboliques. Cette maladie métabolique touche le métabolisme du glucose en entraînant une résistance de l'organisme à l'insuline. L'insuline produit n'est plus assez efficace pour effectuer son rôle de régulateur de glycémie, ce qui conduit à une surproduction d'insuline par les cellules béta du pancréas, phénomène appelé « hyper-insulinémie réactionnelle ». Cette hyper-insulinémie mène à l'épuisement du pancréas qui sécrète donc moins d'insuline, un effet qui à terme conduit à un taux de glucose sanguin anormalement élevé. Le T2D peut être diagnostiqué lorsque la glycémie prise hors jeûne est supérieure ou égale 2 g/L, accompagnée d'autres symptômes comme la polyurie (urines fréquentes), polydipsie (augmentation de la soif) ou polyphagie (augmentation de la faim) ; lorsque la glycémie à jeun est supérieure à 1,26 g/L ou lorsque la glycémie est supérieure à 2g/L lors d'un test de tolérance au glucose (après absorption de 75g de glucose). Les personnes diabétiques présentent également un facteur de risque supérieur de développer d'autres syndromes métaboliques, augmentant de 2 à 4 fois le risque de maladies cardiovasculaires (Kovacic et al., 2014)

3.3 Prévalence et estimations

Les syndromes métaboliques incluant l'obésité -bien que n'étant pas des maladies à proprement parler- ont atteint un stade qualifié d'« épidémique » à travers le monde posant de nombreux problèmes à la fois médicaux, économiques et sociaux. La prévalence varie selon la région géographique, l'ethnicité, la culture, le sexe, l'âge et la catégorie sociale. Cependant, faute de consensus, la prévalence des syndromes métaboliques reste difficile à calculer d'un point de vue mondial.

La prévalence mondiale de l'obésité est plus simple à calculer, du fait de sa définition claire et suivant un consensus commun (IMC > 30 kg/m^2). Sa prévalence dépend, comme les syndromes métaboliques, de la région géographique, l'ethnicité, la culture, le sexe, l'âge et la catégorie sociale. L'obésité induit la mort de près de 3 millions de personnes chaque année dans le monde et sa prévalence ne cesse d'augmenter. En effet, d'après une étude longitudinale de l'OMS, celle-ci a quasiment doublé entre les années 1980 et 2008 (WHO, 2017a). En 2008, 10% des hommes et 14% des femmes adultes de plus de 20 ans étaient considérés comme obèses contre 5% et 8% respectivement en 1980. Il a été estimé qu'un demi-milliard de la population mondiale (205 millions d'hommes et 297 millions de femmes) souffrent d'obésité.

La prévalence de l'obésité a été calculée comme étant la plus importante dans les régions américaines de l'OMS (26% d'obèses tout sexe confondu, 23% d'hommes et 29% de femmes), et comme étant la moins importante dans les régions sud-est de l'Asie de l'OMS (3% d'obèses tout sexe confondu, 2% d'hommes et 4% de femmes). L'Europe possède un pourcentage moins important d'obèse dans sa population avec 21,4% de cas, tout sexe confondu (20,6% d'hommes et 22,2% de femmes) (Figure 26). Les femmes sont plus touchées par l'obésité que les hommes, montrant l'effet sexe et/ou genre comme un facteur déterminant. De plus, il a été montré que la prévalence de l'obésité dépendait également du revenu moyen du pays. En effet, la prévalence de l'obésité dans les pays à haut revenu est triplée par rapport à celle des pays à faible revenu (24% et 7% tout sexe confondu dans les pays à haut et faible revenu respectivement) (Figure 26) (WHO, 2017a).

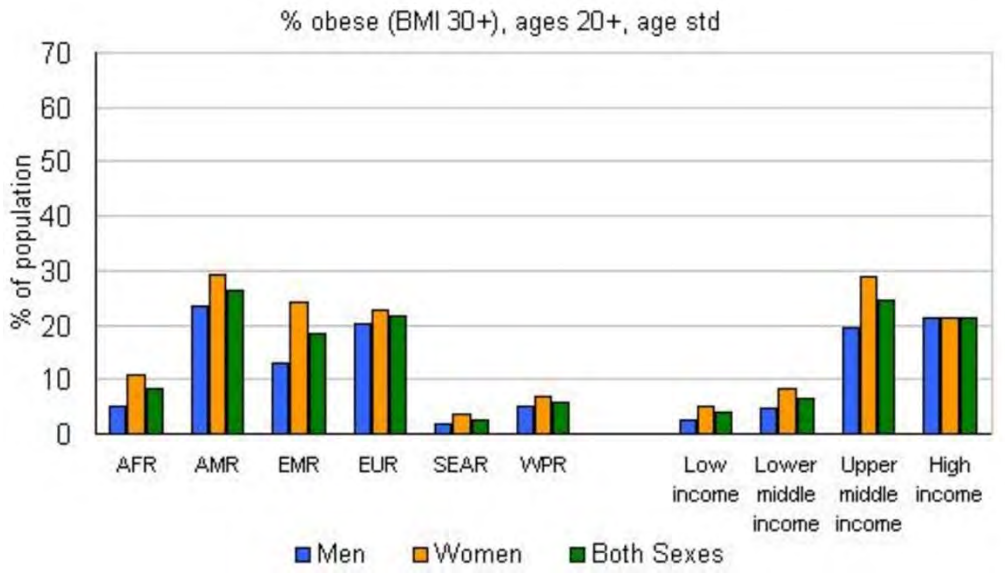


Figure 26 : Pourcentage d'obèses (IMC > 30 kg/m2) de la population mondiale âgée de plus de 20 ans dans les régions africaines (AFR), américaines (AMR), est-méditerranéennes (EMR), européennes (EUR), sud-est asiatiques (SEAR) et ouest-pacifiques (WPR) et par rapport au revenu moyen des pays (WHO, 2017a).

La prévalence de l'obésité chez l'enfant est également importante. En effet, aux Etats-Unis, cette prévalence a été calculée à 17% des enfants âgés de 2 à 19 ans sur la période de 2011 à 2014, par le centre du contrôle et de la prévention des maladies (CDC). De manière plus précise, la prévalence de l'obésité représente 8,9 % des 2-5 ans, 17,5% des 6-11 ans et 20,5% des 12-19 ans (Ogden et al., 2015). En Europe, la prévalence de l'obésité combinée au surpoids chez les enfants de 2 à 10 ans représente plus de 40 % pour les régions sud de l'Europe et moins de 10 % pour les régions nord (Ahrens et al., 2014). L'OMS a quant à elle calculée qu'un enfant sur trois âgé de 11 ans souffre de surpoids ou d'obésité en Europe (WHO, 2017b).

La prévalence mondiale du diabète dépend également des mêmes facteurs que l'obésité, à savoir la région géographique, l'ethnicité, la culture, le sexe, l'âge et la catégorie sociale. Cette prévalence ne cesse d'augmenter depuis ces dernières décennies et aurait causé le décès d'1,6 million de personnes en 2015. En effet, la prévalence mondiale du diabète chez l'adulte est passé de 4,7% en 1980 à 8,5% en 2014, selon l'OMS (Mathers and Loncar, 2006). Aux Etats-Unis, 62,8 millions de personnes adultes (~ 9,3 %) souffrent de diabètes selon l'OMS, celui-ci estimant que 91,1 millions de personnes souffriront de diabète en 2030 (WHO, 2017c). En Europe, l'OMS a estimé que 60 millions d'adultes souffrent de diabète (10,3% d'hommes et 9,6% de femmes âgés de 25 ans et plus) (WHO, 2017d). Le T2D étant une maladie

apparaissant avec le vieillissement, peu d'étude mentionne sa prévalence chez l'individu jeune. Cependant, il a été calculé aux Etats-Unis une prévalence en augmentation chez les jeunes de 10 à 19 ans (0.034 % en 2001 par rapport à 0.12% en 2009) (Dabelea et al., 2014).

3.4 Obésité, diabète de type 2 et perturbateurs endocriniens

Les perturbateurs endocriniens sont liés au développement des syndromes métaboliques comme le T2D et l'obésité. Il a été montré par des études épidémiologiques et chez l'animal, que le BPA était un des PE majeur pouvant mener à l'obésité et au T2D chez l'Homme.

De par leur capacité à perturber le système hormonal endogène et d'autres fonctions physiologiques comme le système immunitaire et le microbiote intestinal, les PE peuvent induire l'obésité par différentes voies d'action, seules ou en combinaison (Figure 27) (Darbre, 2017). En effet, il a été montré chez les rongeurs que l'ovariectomie (entraînant une forte diminution d'estrogènes) augmentait l'adiposité (Wade et al., 1985). De manière similaire, les femmes ménopausées présentent une adiposité plus importante, elle-même contrée par l'utilisation d'hormones synthétiques (Haarbo et al., 1991). De plus, les souris KO pour ERα présentent également une adiposité plus importante, et ce, chez les deux sexes (Heine et al., 2000). Certains PE comme les phtalates et le BPA peuvent se fixer sur des récepteurs nucléaires comme PPARγ. La suractivation de PPARγ augmente la prolifération des adipocytes (Takasawa et al., 2008). Aussi, les PE anti-androgéniques peuvent altérer le partage des éléments nutritifs menant à une composition corporelle plus grasse chez la souris mâle (Navarro et al., 2015). Les PE peuvent également inhiber les aromatases, ce qui a pour conséquence d'augmenter l'adiposité (Woodhouse and Cooke, 2004). Il a été démontré que la présence de certains PE comme le BPA est corrélée positivement avec les niveaux circulants d'hormones régulant l'appétit et la satiété (leptine et ghrelin) (Rönn et al., 2014). Enfin, les PE comme les dioxines, les pesticides et le BPA sont également connus comme étant diabétogènes, provoquant insulino-résistance et altérations fonctionnelles des cellules béta du pancréas (Alonso-Magdalena et al., 2006; Novelli et al., 2005).



Figure 27 : Résumé des mécanismes d'action des PE obésogènes. Adaptée de Darbre, 2017.

3.5 Obésité, diabète de type 2 et BPA

3.5.1 Etudes épidémiologiques

Bien que les scientifiques tendent vers un consensus confirmant l'effet obésogène du BPA, les études épidémiologiques sur l'obésogénécité du BPA restent divisées. En effet, plusieurs études observent malgré tout des corrélations positives, nulles ou négatives entre l'obésité et le niveau de BPA selon s'il est sanguin ou urinaire.

Quelques études ont utilisé les données de la cohorte NHANES (*National Health and Nutrition Examination Survey*) pour étudier la relation entre niveau urinaire de BPA et obésité. Parmi elles, Bhandari et al. ainsi que Shankar et collaborateurs ont observé une corrélation positive entre niveau urinaire de BPA et obésité chez des adultes et des enfants sur une période de 2003/2008 (Bhandari et al., 2013; Shankar et al., 2012). En s'appuyant sur ces mêmes données, Trasande et collaborateurs ont également observé une corrélation positive et dose-dépendante entre niveau urinaire de BPA et obésité des individus de 6 à 19 ans (Trasande et al., 2012). Cependant, l'étude de Carwile et collaborateur des adultes a montré des associations positives mais quartiles-dépendants sans dose-réponse (Carwile and Michels, 2011). Quatre études chinoises ont également montré des corrélations positives entre niveau urinaire de BPA et IMC et/ou tour de taille (Li et al., 2012; Ning et al., 2011; Wang et al., 2012, 2013).

Cependant l'étude de Duan et collaborateurs n'a trouvé aucune corrélation entre ces deux paramètres (Duan et al., 2013).

Neuf études ont comparé le niveau sanguin de BPA et obésité. Sept d'entre elles n'ont trouvé aucune association entre ces deux paramètres (Bloom et al., 2011; Fenichel et al., 2012; Kandaraki et al., 2011; Kim et al., 2012; Olsén et al., 2012; Padmanabhan et al., 2008; Takeuchi and Tsutsumi, 2002). Chou et al. ont observé une corrélation négative entre niveau sanguin de BPA et obésité chez les femmes enceintes d'une cohorte taiwanaise (Chou et al., 2011), en contraste avec Takeuchi et al. qui ont observé une corrélation positive chez des femmes japonaises non enceintes (Takeuchi et al., 2004).

Les conclusions des études épidémiologiques sur l'effet diabétogène du BPA sont elles aussi divisées. Une corrélation positive entre niveau urinaire de BPA et T2D a été retrouvé dans quatre études mais seulement lorsqu'elle prenait en compte les données NHANES de 2003/2004 (Lang, 2008; Melzer et al., 2010; Shankar and Teppala, 2011; Silver et al., 2011). Une étude chinoise a observé des ratios importants de T2D seulement dans les 2èmes et 4èmes quartiles des niveaux urinaires de BPA, montrant juste une tendance à la corrélation positive (Ning et al., 2011). Trois études sur les données NHANES de 2005/2006, 2007/2008 et 2009/2010 ainsi qu'une étude sur la population coréenne, n'ont trouvé aucune association entre niveau urinaire de BPA et T2D (Kim and Park, 2013; LaKind et al., 2012; Melzer et al., 2010; Silver et al., 2011).

Aucune étude corrélative entre niveau sanguin de BPA et T2D n'est à ce jour disponible.

3.5.2 Etudes chez l'animal

De nombreuses études ont montré le caractère obésogène du BPA chez l'animal et avec un impact plus prononcé lors d'une exposition périnatale. Parmi ces données, Rubin et collaborateurs ont montré, chez le rat, qu'une exposition *via* l'eau de boisson de 100 µg ou 1200 µg/kg de poids corporel/jour augmentait le poids de la descendance mâle et femelle très précocement après la naissance (J4) et qui progressait à l'âge adulte (J110) (Rubin et al., 2001). De même, une étude japonaise chez la souris a montré que l'exposition au BPA par l'eau de boisson à 1 ou 10 µg/mL durant la périnatalité augmentait le poids ainsi que la lipidémie de la descendance au jour 31 post-natal (Miyawaki et al., 2007). Dans cette étude, l'effet sur le poids est sexe-dépendant avec une augmentation plus forte chez le mâle (respectivement 22 et 59% dans le groupe à faible et forte dose, comparé au groupe contrôle) que chez la femelle

(respectivement 13 et 11% dans le groupe à faible et forte dose, comparé au groupe contrôle). Enfin, Angle et al. ont montré que l'exposition périnatale au BPA de 5 à 50 000 µg/kg de poids corporel/jour par gavage chez la souris provoquait des changements dans la prise alimentaire aboutissant à une augmentation du poids corporel et celui du foie (Angle et al., 2013). Les effets observés n'étaient pas dose-dépendants, soulignant un effet non-monotone du BPA (effets survenant à des doses comprises entre 5 et 500 µg/kg de poids corporel/jour).

D'autre part, Song et collaborateurs ont observé, chez le rat, une hyperglycémie ainsi qu'une résistance à l'insuline à J50 et J100 chez la descendance mâle exposée en période périnatale au BPA (1 ou 10 µg/ml chez les mères par eau de boisson correspondant à 80 et 758 µg/kg de poids corporel/jour, respectivement) (Song et al., 2014). Une autre étude a confirmé ces résultats en montrant qu'une exposition périnatale de BPA en sous-cutanée à 10 ou 100 µg/kg de poids corporel/jour diminuait la tolérance au glucose et augmentait le niveau plasmatique d'insuline chez les mères traitées (Alonso-Magdalena et al., 2010). Dans cette même étude, seule la descendance mâle présentait à J180 une diminution de la tolérance au glucose et une augmentation de la résistance à l'insuline. De plus, la dose 10 µg/kg de poids corporel/jour augmentait significativement le poids de la descendance tout sexe confondu jusqu'au jour 21 post-natal. Enfin l'étude de Angle et collaborateurs décrite précédemment montre également une diminution de la tolérance au glucose à la dose 5, 50, 500 et 5000 µg/kg de poids corporel/jour de BPA et une augmentation du niveau plasmatique d'insuline seulement à 5 µg/kg de poids corporel/jour de BPA chez la descendance souris mâle (Angle et al., 2013).

3.5.3 Etudes mécanistiques sur le développement de l'obésité et du diabète de type 2 lors d'une exposition au BPA

Les études épidémiologiques chez l'Homme et chez l'animal, bien que contradictoires quelques fois, ont démontré la forte corrélation entre BPA et développement de l'obésité et du T2D, suggérant des effets importants sur le tissu adipeux et le pancréas. Des études *in vitro* ont permis d'identifier des cibles moléculaires ainsi que des voies de signalisation qui peuvent être impliquées dans le développement de l'obésité et du T2D après exposition au BPA. En effet, il a été montré que la culture de la lignée fibroblastique 3T3-L1 murine en présence de BPA à 8,8 µM augmente le contenue en triacylglycérol et l'activité de la LPL (Lipoprotéine Lipase) et de la GPDH (Glycérol-3-Phosphate DésHydrogénase) -enzymes impliquées dans le métabolisme lipidique- avant et après différentiation en adipocyte (Masuno et al., 2002). De plus, Ohlstein

et al. a démontré qu'une exposition au BPA à 1 µM pendant 21 jours induit l'adipogénèse à partir de cellules adipeuses souches (Ohlstein et al., 2014). A faible dose (1nM), une exposition au BPA pendant 48h diminue la sensibilité à l'insuline des cellules 3T3-L1 différenciées, associée avec une diminution de l'expression du transporteur au glucose 1 (GLUT1) et de la phosphorylation du récepteur à l'insuline (Valentino et al., 2013). De plus, dans ces conditions, le BPA augmente l'expression d'IL-6 et d'IFN-γ et active la voie pro-inflammatoire NFκB. Ces résultats réunis montrent un effet différentiel selon la concentration en BPA. Une forte concentration en BPA induit la différentiation adipocytaire par une possible liaison avec les récepteurs nucléaires comme les ER et/ou PPARγ, alors qu'une faible concentration en BPA induit une diminution de la sensibilité à l'insuline et une augmentation de la réponse pro-inflammatoire (Figure 28).

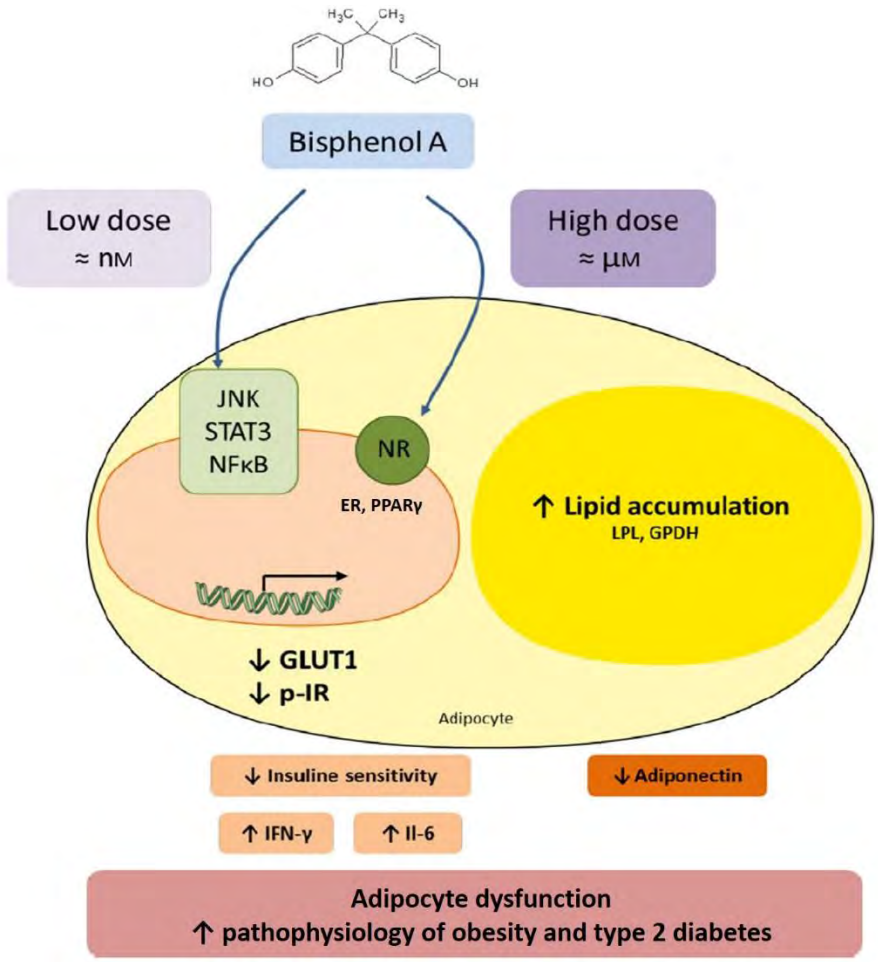


Figure 28 : Voies de signalisation activées par de faibles et fortes concentrations en BPA durant la différentiation adipocytaire. Adaptée de Legeay and Faure, 2017.

Ces résultats démontrés *in vitro* manquent cependant de transpositions *in vivo*. De plus, il subsiste de nombreuses part d'ombres et autres hypothèses pour les mécanismes du BPA menant au développement de l'obésité et du T2D, notamment l'implication et le rôle du système immunitaire et du microbiote intestinal dans ce processus. Une caractérisation chronologique des impacts biologiques du BPA sur les paramètres aboutissant à l'obésité permettrait une meilleure compréhension de l'effet obésogène et diabétogène du BPA.

Objectifs de la thèse

OBJECTIFS DE LA THÈSE

Le BPA est retrouvé de manière ubiquitaire dans notre environnement, résultat de sa présence dans des produits de consommation courants. Son utilisation conséquente dans l'industrie agro-alimentaire, notamment dans la fabrication de polycarbonates et de résines époxy en contact avec les denrées alimentaires, a mené l'Homme à une exposition constante au BPA. Il est ainsi retrouvé dans les urines, le sang, de nombreux tissus et jusqu'au fœtus. Si les niveaux circulants restent faibles (0,1-10 nM), la question de l'exposition chronique à ce PE, en particulier pendant le développement, soulève des interrogations pour la santé de l'individu jeune et adulte. Les études chez l'animal ont montré que la période périnatale représente une fenêtre critique d'exposition au BPA, menant à l'apparition de différents troubles chez la descendance, en particulier liés au développement du système immunitaire. L'altération de l'éducation du système immunitaire en lien avec le BPA a des conséquences néfastes sur le développement des nouveau-nés, favorisant par exemple l'apparition d'intolérances alimentaires ou la susceptibilité à des inflammations sévères chez la descendance femelle adulte. De plus, de nombreuses corrélations mettent en évidence un possible lien entre le système immunitaire, le microbiote intestinal et le développement de l'obésité ou du T2D. Il subsiste cependant un manque d'informations quant à la caractérisation des effets immunotoxiques du BPA, après exposition périnatale, pouvant mener au développement de l'intolérance orale et des désordres métaboliques. Enfin, les conséquences sur le système immunitaire d'une exposition périnatale au BPS ou au BPF, analogues structuraux du BPA, n'ont jamais été étudiés à ce jour.

Le premier objectif de ce travail de thèse a donc été de caractériser, chez la descendance souris femelle, les effets d'une exposition périnatale au BPA sur le développement du système immunitaire intestinal et systémique pouvant expliquer l'apparition d'intolérances alimentaires à l'âge adulte. Cette étude a été réalisée en utilisant des approches d'immunohistochimie, de cytométrie en flux et d'ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), permettant d'évaluer la fréquence et la fonctionnalité de différentes populations du système immunitaire.

Le deuxième objectif a été de caractériser les conséquences d'une exposition périnatale au BPA sur le développement du système immunitaire intestinal et systémique, la fonction barrière intestinale et l'homéostasie du microbiote intestinal corrélant l'apparition de désordres métaboliques comme l'obésité et le T2D, chez la descendance souris. Ces troubles apparaissant

préférentiellement chez le mâle lors du vieillissement, cette étude a été effectuée de manière longitudinale en utilisant les mêmes approches que la première étude en plus de caractérisations bactériologiques et métaboliques chez la descendance mâle. Ce travail a permis de caractériser la chronologie d'apparition des altérations des fonctions immunitaires et du microbiote intestinal, précédant puis accompagnant l'apparition d'un phénotype obèse et des troubles associés du métabolisme du glucose (Figure 29).

Une discussion générale reprenant ces éléments terminera le mémoire en apportant différentes hypothèses sur les différents effets sexe-, âge- ou période d'exposition-dépendants d'une exposition périnatale au BPA. De plus, des données préliminaires concernant les impacts sur le système immunitaire d'une exposition périnatale au BPS ou au BPF en comparaison au BPA seront également discutées.

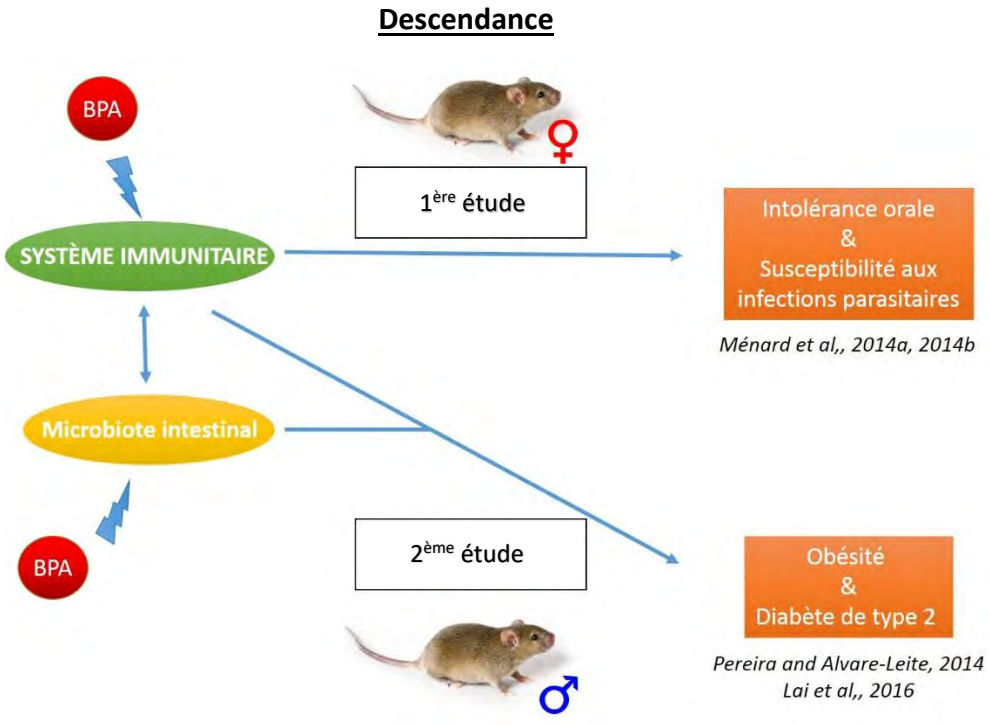


Figure 29 : Schéma récapitulatif des études effectuées lors du travail de thèse.

Résultats expérimentaux

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

1. Consequence of bisphenol a perinatal exposure on immune responses and gut barrier function in mice

Arch. Toxicol. 2017 jul 21. doi: 10.1007/s00204-017-2038-2

Comme décrit dans la partie introduction, l'Homme est fortement exposé au BPA *via* son alimentation, menant à la contamination générale des populations (de l'ordre du ng/mL dans le sang et les urines des grands pays industrialisés) (Mikołajewska et al., 2015; Völkel et al., 2008; Ye et al., 2015). Une telle imprégnation par un PE a inquiété la communauté scientifique, conduisant à de nombreuses études démontrant, chez l'animal ou *in vitro*, des effets nocifs du BPA ayant permis de justifier la récurrence de troubles sexuels et autres troubles développementaux, ainsi que l'incidence croissante de cancers hormono-dépendants chez l'Homme (Konieczna et al., 2015). La période périnatale représente une fenêtre critique d'exposition des PE, à l'exemple du BPA, pour le développement de l'embryon au nouveau-né et la santé future de l'adulte. En effet, de nombreuses études chez l'animal appuient les effets nocifs d'une exposition périnatale au BPA sur le développement cérébral et sexuel ainsi que sur la mise en place des fonctions immunitaires (Honma et al., 2002; Howdeshell et al., 1999; Menard et al., 2014b, 2014a; Monje et al., 2007).

Les preuves de toxicité du BPA ont mené les pouvoirs publics à appliquer une règlementation stricte du BPA, banni de la fabrication de biberons en Europe depuis 2011, une interdiction étendue, en France, à la fabrication de tout contenant alimentaire à partir de janvier 2015.

Au niveau européen, l'EFSA a déterminé une DJT provisoire de 4µg/kg de poids corporel/jour en s'appuyant sur des estimations de l'exposition alimentaire et non alimentaire chez l'enfant et l'adolescent (EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzymes, Flavourings and Processing Aids (CEF), 2015). Ce rapport a toutefois conclu que le BPA, compte tenu des niveaux d'imprégnation estimé des populations, et hors études récentes (après fin 2012), ne représentait pas un danger par voie orale. Cependant, l'EFSA a recommandé plus d'investigations, en particulier sur l'impact immunotoxique *via* une méthodologie robuste.

Ménard et collaborateurs ont publié deux études après 2012 concernant l'impact du BPA à faible dose (5µg/kg de poids corporel/jour) sur le développement du système immunitaire

intestinal. Ces études concluaient que le BPA, à cette dose, représente un danger pour l'homéostasie du système immunitaire avec des effets notoires dans le développement de la tolérance orale et des défenses immunitaires contre les pathogènes (notamment les infections parasitaires) (Menard et al., 2014b, 2014a). Ces études ont été analysées en 2016 par un panel d'experts, réunis par l'EFSA des suites d'une demande du Ministère Néerlandais, mais n'ont pas pu être pris en compte pour un nouveau calcul de la DJT malgré des résultats probants (Panel on Food Contact Materials, Enzymes, Flavourings and Processing Aids (CEF) et al., 2016).

Dans ce cadre, la première étude a donc porté sur une caractérisation plus approfondie des impacts de l'exposition périnatale au BPA sur le développement du système immunitaire et de la fonction barrière de l'intestin chez la souris femelle permettant de comprendre le défaut de tolérance et de défenses induit par le BPA.

Pour cela, nous avons exposé oralement des souris C3H/HeN gestantes à 50 µg/kg de poids corporel/jour de BPA du 15ème jour de gestation jusqu'au jour 21 post-natal. Cette dose correspond à l'ancienne DJT fixée par l'EFSA. De plus, l'utilisation de ces doses nous a permis de comparer nos effets avec ceux retrouvés dans de précédentes études de l'équipe (Braniste et al., 2010; Menard et al., 2014b). Toujours en relation avec ces publications et du fait des effets sexe-dépendants du BPA observés par Braniste et al. (2010) (effets sur la perméabilité et l'inflammation essentiellement observés chez la femelle), la descendance femelle adulte a été privilégiée dans cette étude. Avec une approche *ex vivo*, nous avons déterminé la perméabilité para et transcellulaire intestinale de ces souris par la mesure du passage de molécules à faible et haut poids moléculaire (FSS - *Fluorescent Sodium Salt* et HRP – *HorseRadish Peroxydase*, respectivement) en chambres de Ussing. Cette technique nous a permis également de mesurer des paramètres de résistance de la barrière intestinale. Nous avons également déterminé l'activité antimicrobienne de l'intestin, notamment par l'activité du lysozyme dans les fèces ainsi que par l'expression du lysozyme dans les cellules de Paneth.

Les ILC3 sont importants, pour l'organogenèse des tissus lymphoïdes dans l'intestin durant le développement fœtal, et pour le maintien de l'homéostasie intestinale à l'âge adulte. Nous avons déterminé par une approche moléculaire, l'impact du BPA sur la synthèse de l'acide rétinoïque (AR), importante pour la migration des ILC3, la mise en place de la tolérance orale et le développement général dans l'intestin, grâce à l'analyse de l'activité et l'expression de l'enzyme clé rétinaldéhyde déshydrogénase (RALDH1) dans les IEC et l'intestin. Cette analyse

a été couplée avec l'observation de la production d'IgG totaux, d'IgG spécifiques d'*E.coli* ou de la nourriture dans le sang et d'IgA totaux dans le sang et les fèces.

Enfin, des analyses par cytométrie en flux ont permis de caractériser différentes populations de cellules immunitaires. Nous avons déterminé la fréquence des cellules positives pour IgA dans le côlon et la LP jéjunale, les ILC3 dans la LP jéjunale ainsi que la fréquence des sous-populations de DC dans la LP, les MLN et la rate. L'expression de différents marqueurs membranaires up-régulés chez les DC matures (MHCII, CD80, CCR7 et CD40) a également été analysée au sein des sous-populations. De plus, nous avons caractérisé la fréquence des T activés, les Th, les Treg, les Th1 et Th17 dans la LP, les MLN et la rate, en lien avec la production d'IFN-γ et d'IL17, déterminée par ELISA suite à une re-stimulation CD3/CD28 *in vitro*.

Les observations montrent une augmentation de la perméabilité para- et transcellulaire chez la descendance adulte exposée au BPA en période périnatale, associée à une diminution de l'activité antimicrobienne envers *E.coli* dans les fèces et une diminution de l'expression et de l'activité du lysozyme dans les cellules de Paneth. De plus, nous observons une diminution des cellules productrices d'IgA dans le côlon et la LP du jéjunum, couplé à une diminution des IgA dans les fèces de ces individus. La synthèse de RA est perturbée chez la descendance BPA avec une diminution des IEC productrices de RA et une diminution de l'expression de la RALDH1 dans l'iléon. Ce résultat est associé à une diminution de la fréquence des ILC3 dans la LP jéjunale et une augmentation des IgG spécifiques d'*E.coli*. La fréquence des DC n'est pas affectée chez la descendance BPA mais l'expression des marqueurs de maturation est par contre diminuée. L'exposition périnatale au BPA mène également à une diminution des T activés et des Treg ainsi qu'à une augmentation des Th17 dans la LP associée avec une augmentation de la production d'IFN-γ et d'IL-17 après re-stimulation *in vitro*. La descendance BPA présente également une augmentation des cellules Th17 et de Th1 dans la rate associée à une augmentation d'IL-17 après restimulation *in vitro*.

Ces résultats mettent en évidence des mécanismes de dérégulation de la barrière épithéliale et du système immunitaire de l'intestin après exposition périnatale au BPA. Cette dérégulation du système immunitaire local a également des conséquences sur le système immunitaire systémique. Ces résultats appuient ceux obtenus par Ménard et collaborateurs. Ils permettent d'apporter des explications mécanistiques sur la prédisposition des individus exposés au BPA lors de la période périnatale à développer des intolérances alimentaires et une susceptibilité aux infections parasitaires.

Arch Toxicol
DOI 10.1007/s00204-017-2038-2

IMMUNOTOXICOLOGY

Consequences of bisphenol a perinatal exposure on immune responses and gut barrier function in mice

Yann Malaisé[1] · Sandrine Ménard[2] · Christel Cartier[1] · Corinne Lencina[2] · Caroline Sommer[1] · Eric Gaultier[1] · Eric Houdeau[1] · Laurence Guzylack-Piriou[1]

Received: 22 May 2017 / Accepted: 13 July 2017
© Springer-Verlag GmbH Germany 2017

Abstract The potent immunomodulatory effect of the endocrine disruptor bisphenol A during development and consequences during life span are of increasing concern. Particular interests have been raised from animal studies regarding the risk of developing food intolerance and infection. We aimed to identify immune disorders in mice triggered by perinatal exposure to bisphenol A. Gravid mice were orally exposed to bisphenol (50 µg/kg body weight/day) from day 15 of pregnancy until weaning. Gut barrier function, local and systemic immunity were assessed in adult female offspring. Mice perinatally exposed to bisphenol showed a decrease in ileal lysozyme expression and a fall of fecal antimicrobial activity. In offspring mice exposed to bisphenol, an increase in colonic permeability was observed associated with an increase in interferon-γ level and a drop of colonic IgA^+ cells and fecal IgA production. Interestingly, altered frequency of innate lymphoid cells type 3 occurred in the small intestine, with an increase in IgG response against commensal bacteria in sera. These effects were related to a defect in dendritic cell maturation in the *lamina propria* and spleen. Activated and regulatory T cells were decreased in the *lamina propria*. Furthermore, perinatal exposure to bisphenol promoted a sharp increase in interferon-γ and interleukin-17 production in the intestine and elicited a T helper 17 profile in the spleen. To conclude, perinatal exposure to bisphenol weakens protective and regulatory immune functions in the intestine and at systemic level in adult offspring. The increased susceptibility to inflammatory response is an interesting lead supporting bisphenol-mediated adverse consequences on food reactions and infections.

Keywords Bisphenol A · Perinatal exposure · Immune responses · Intestine

Introduction

The chemical bisphenol A (BPA), an endocrine disruptor compound displaying estrogenic mimetic activity, is used to manufacture polycarbonate plastics (Vandenberg et al. 2007) and epoxy resins lining food and beverage metal cans, as well as in thermal printer papers in a free form (Biedermann et al. 2010). Due to its widespread use in the daily life, human exposure to BPA is ubiquitous, highlighted by its presence in saliva, blood and urine samples in significant levels (ng/ml), depicting chronic contamination of exposed populations (Vandenberg et al. 2010). Based on the current estimations of total exposure to BPA from dietary and non-dietary sources for infants, EFSA's latest scientific opinion published in 2015 concludes that children and adolescents are below the temporary tolerable daily intake (TDI) of 4 µg/kg bw/day (EFSA 2015). However, BPA has been shown to affect various physiological functions in animal models at environmentally relevant exposure levels (Rubin 2011), particularly on immune system following developmental exposure (Rogers et al. 2012). Indeed, the developmental programming of later-life immune functions

Yann Malaisé and Sandrine Ménard contributed equally to this work.

✉ Laurence Guzylack-Piriou
laurence.guzylack@inra.fr

[1] Intestinal Development, Xenobiotics and ImmunoToxicology, Université de Toulouse, INRA, ENVT, INP-Purpan, UPS, Toulouse, France

[2] Neuro-Gastroenterology and Nutrition, Toxalim (Research Centre in Food Toxicology), Université de Toulouse, INRA, ENVT, INP-Purpan, UPS, Toulouse, France

Published online: 21 July 2017

and innate immune responses in specific tissues is determined during critical windows of vulnerability in prenatal and early postnatal periods of development (Dietert 2011). Many studies indicate that the developing fetus is more sensitive to estrogenic chemicals than the adult (Vandenberg et al. 2007), and it is well established that mothers can pass BPA to their offspring through the placenta, and after birth through breast-feeding (Zalko et al. 2010).

From animal studies, a consensus exists that BPA at a low dose is able to disrupt immune response during development, with long-lasting effects through life. Indeed, we showed in previous studies that perinatal BPA increased the risk of food intolerance at adulthood, as well as the susceptibility to intestinal infection and/or to exacerbated mucosal inflammation (Braniste et al. 2010; Menard et al. 2014a, b). More specifically, BPA at 5 µg/kg bw/day given to mothers impaired oral tolerance and exacerbated immunization to ovalbumin (OVA, a dietary antigen model) in adult offspring (Menard et al. 2014b). Similar BPA treatment also impaired systemic immune response in young rats, hence predisposed them to a parasitic infection in the gut (Menard et al. 2014a). Both these studies concluded that low doses of BPA interfere with the maturing immune system and provide novel information that warrants serious consideration for human safety (Hessel et al. 2016).

In the present study, we aimed to decipher more precisely the immune disorders in adult mice triggered by perinatal exposure to BPA and investigate whether the developmental immunotoxicity may induce long-term alterations in immune cell populations and functions at adulthood.

Materials and methods

Animals and BPA treatment

All experiments were approved by the Local Animal Care and Use Committee (TOXCOM 0035/EH-2013), in compliance with the European directive 2010/63/UE. To minimize desertion induced by handling during perinatal period, we used C3H/HeN (Janvier, Roubaix, France) mice known to be excellent breeders. Perinatal experiment was conducted as previously described (Menard et al. 2014b). Nulliparous female C3H/HeN mice (Janvier, Roubaix, France) were mated with male for 5 days and then individually isolated. Pregnant and lactating mice were daily treated orally from 15th day of gravidity to weaning of pups (day21; d21) with 50 µg/kg bw/day of BPA or the vehicle alone (0.1% ethanol in corn oil) as control group. In our study, we used 50 µg/kg bw/day a tenfold higher dose that the current TDI that is still relevant for human exposure levels (Taylor et al. 2011) and in the range of doses used in previous studies related to BPA-mediated immune impacts after perinatal treatment (Braniste et al. 2010; Menard et al. 2014b). All animals (mothers and offspring) were kept at a constant temperature (22 ± 1 °C) and maintained on a 12:12-h light/dark cycle (light on at 7 h 30 am). Due to sex-related differences in intestinal BPA effects in rats (Braniste et al. 2010), our study was conducted in d50 females perinatally exposed through their dams. At d50, female mice were euthanized, and blood, ileum, colon and feces were collected. Mesenteric lymph node (MLN), *lamina propria* from small intestine (siLP) and spleen were sampled for primary cell culture.

Colonic permeability

Colon fragments were mounted in Ussing chambers (Easy Mount, Physiologic Instruments) and bathed on each side with oxygenated thermostated Kreb's solution (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Total electrical resistance (*R*) was recorded at regular intervals during the 2-h period of experimentation. HRP (44 kDa, Sigma-Aldrich) and FSS (377 Da, Sigma-Aldrich) were added to the mucosal compartment at a final concentration of 0.4 and 40 µg/ml, respectively. Epithelial permeability to intact HRP was determined by an enzymatic assay, whereas total HRP was measured by ELISA. Epithelial permeability to FSS was determined by measuring the fluorescence intensity (FI) 485 nm/525 nm. Intestinal fluxes (µg/2 h cm^2) were calculated by measuring serosal activity of the markers. Permeability was calculated as the ratio of flux/concentration, as previously described (Artursson and Magnusson 1990) and expressed as cm/second.

Immunofluorescence

For analyzing lysozyme expression in Paneth cell, ileal samples were fixed in 4% formalin, dehydrated through graded ethanol and embedded in paraffin. Sections (5 µm) were rehydrated and submerged in antigen retrieval solution (citrate buffer, 10 mM, pH 6, 99 °C) for 30 min. After incubation in blocking solution (PBS 0,01% Tween 20, 1% bovine serum albumin and 2% donkey normal serum) for 15 min, sections were incubated with rabbit antimouse lysozyme antibody (1/100, overnight, +4 °C) (Abcam, Paris, France) followed by an Alexa fluor 488-conjugated donkey antirabbit IgG [0.75 µg/ml, 1 h, room temperature (RT)] (Jackson, Sullfolk, UK). After washing, sections were incubated with Alexa fluor 594-conjugated wheat germ agglutinin (WGA) (10 µg/ml, 45 min) (Invitrogen, Life Technology, Cergy Pontoise, France). IgA^+ cells were revealed on frozen colonic tissues by antimouse IgA (ebioscience, Lutterworth, UK). Sections were mounted in Prolong gold antifade mounting medium with DAPI (Invitrogen) and examined under a Nikon 90i fluorescence

microscope. Lysozyme fluorescence intensity in Paneth cells was quantified employing the software Nis-Elements Ar (Nikon, Champigny sur Marne, France), and results were expressed as fluorescence intensity per cell.

Lysozyme activity in feces content

Feces were collected and frozen at −80 °C. Activity of lysozyme was determined using the EnzChek® Lysozyme Assay Kit (Molecular probes, life technology, St Aubin, France).

Antimicrobial activity of feces content against *Escherichia coli* (*E. coli*)

Antibacterial activity of fecal supernatant resuspended in 20% ethanol was tested against commensal *E. coli* isolated from our mice. 10^5 *E. coli* CFU grown to mid-logarithmic phase was co-incubated with fecal supernatant corresponding to 1 mg of fecal protein. The number of viable bacteria (CFU) was analyzed by serial dilution after 2 h of incubation at 37 °C.

Quantitative real-time PCR

Total RNA from ileum was extracted with Trizol Reagent (Extract all, Eurobio). Then, reverse transcription and real-time qPCR steps were performed as previously described (Cano et al. 2013). Non-reverse transcripted RNA was used as non-template control for verification of genomic DNA amplification signal. Specificity of qPCR products was assessed at the end of the reactions by analyzing dissociation curves. The following primer pairs were used: retinaldehyde dehydrogenase 1 (RALDH1); forward: ATGGTTTAGCAG CAGGACTCTTC; reverse: CCAGACATCTT GAATCC ACCGAA. The PCR efficiency with all primer pairs was >90%. Amplification efficiency and initial fluorescence were determined by the ΔΔCt method, and then, obtained values were normalized using reference gene, TATA-box binding protein (TBP): forward: CCTTCACCAATGACTCCTATG; reverse: CCAAGATTACGGTAGATACAA.

Humoral response in plasma and feces

Blood and feces were sampled. Intracardiac blood was recovered with heparinized needle, and plasma was kept at −80 °C. Fecal proteins were extracted mechanically in complete antiprotease cocktail (Roche Diagnostic, Meylan, France) and frozen at −80 °C. Plasma and fecal IgG and IgA concentrations were measured by ELISA. Plates were coated overnight at +4 °C with 50 µl of 5 µg/ml sheep anti-mouse IgA (Sigma-Aldrich) or goat antimouse IgG (SouthernBiotech, France) in PBS. Plates were blocked with PBS-5% fetal calf serum (FCS) (Invitrogen) before incubation with diluted samples or purified IgA or IgG (SouthernBiotech). Horseradish-peroxidase (HRP)-conjugated goat antimouse IgA (Sigma-Aldrich) or goat antimouse IgG (SouthernBiotech) was added, and HRP was revealed using TMB (Becton–Dickinson, France). To analyze immunoglobulin specificity, plates were coated overnight at +4 °C with 5 µg/ml of *E. coli* lysate or 20 µg/ml of soluble food lysate. After blocking with PBS 5%-FCS, plates were incubated for 2 h at 37 °C with plasma samples. HRP-conjugated goat antimouse IgG (SouthernBiotech) or goat antimouse IgA (Sigma-Aldrich) was incubated for 2 h at 37 °C and revealed as above mentioned.

Spleen, MLN, small intestine lamina propria (siLP) and epithelial cells (IECs) isolation

Spleens and MLN were removed, and cells were isolated through 70 and 40 µm cell strainer, respectively, to make a single-cell suspension in PBS-1% KnockOutTM SR (KO SR) (Gibco). Small intestines were washed in cold PBS, cut into 0.5 cm pieces, incubated four times in 30 ml of PBS 3 mM EDTA (Sigma-Aldrich) and digested in 20 ml of DMEM added with 20% FCS and 100 U/ml of collagenase (Sigma-Aldrich) for 40 min at 37 °C. *SiLP* cells were purified on a 40–80% Percoll gradient run for 15 min at 1800 g at RT. To measure dendritic cells maturation, cells were stimulated overnight by 40 µg/ml poly I:C (Sigma-Aldrich) and 20 µg/ml lipopolysaccharide (LPS) (Sigma-Aldrich) prior antigen-presenting cells (APC) analysis by flow cytometry. IECs were isolated from jejunum. The tissue was washed in cold PBS, cut into small pieces and incubated in PBS 3 mM EDTA for 10 min at 37 °C. The suspension was filtered through nylon mesh (70 µm in pore diameter) and was purified on percoll gradient.

Antibodies and flow cytometry

All antibody incubations were performed at 4 °C for 30 min. For detection and phenotyping of cell subsets in cell suspension from spleen and siLP, cells were stained with monoclonal antibodies directed against anti-CD11b, CD11c, CD40, MHCII, RORγt, CD4, CD44, CD62L, CD103, CD127, NKp46, CCR7, IL17, IFNγ, T-bet, RORγt and CD25 purchased from BD Biosciences, anti-IL-22 and FoxP3 from ebioscience. Flow cytometry data collection was performed on MACSQuant® Analyzers (Miltenyi Biotec, Paris, France). Data were analyzed using VenturiOne® (AppliedCytometry) software. The intracellular expression of T-bet, RORγt and FoxP3 in $CD4^+$ LT was analyzed by intracellular cytokine FACS using a Cytofix/Cytoperm Kit Plus (BD Biosciences, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. For intracellular cytokine staining, siLP cells

were stimulated with a cocktail of phorbol 12-myristate 13-acetate (15 nM, Sigma-Aldrich) and ionomycin (1 µg/ml, Sigma-Aldrich) for 5 h at 37 °C. Brefeldin A (10 µg/ml; Sigma-Aldrich) was added after the first hour of incubation. These cells were harvested, washed and stained with mAbs against mouse IL-17A, IL-22 and IFN-γ for 30 min at 4 °C. Aldehyde dehydrogenases (ALDH) activity was determined using the ALDEFLUOR staining kit (STEMCELL Technologies) according to the manufacturer's instructions.

Cytokines measurement

To culture, cells were seeded on 24-well plates at 1×10^6 cells per well for cytokines assays in Cerrotini culture medium (Dulbecco modified Eagle medium supplemented with 8% knockout serum replacement (Gibco, Lifetechnologies, Paisley, UK), 36 mg/l asparagine, 116 mg/l arginine, 10 mg/l folic acid, 1 g/l 4-[2-hydroxyethyl]-1-piperazineethanesulfonic acid, 0.05 mmol/l β-mercapto-ethanol, 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin and 1 µg/ml fungizone) in the presence or absence of 5 µg/ml hamster antimouse CD3 and hamster antimouse CD28 (BD biosciences) coated wells. After 3 days of stimulation, culture supernatants were collected and frozen at −80 °C prior cytokines measurement. Cytokines were measured in supernatant of primary cell culture of spleen and MLN or siLP by ELISA: IFN-γ, IL-22 and IL-17 present in primary cells culture supernatant were assayed using commercial enzyme-linked immunosorbent assays (Duoset R&D Systems, Lille, France).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism version 6.00 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Results were expressed as mean ± SEM. Mean comparisons were performed using *t* test analysis followed by non-parametric Mann–Whitney tests. Differences were considered significant for $P < 0.05$.

Results

Perinatal exposure to BPA affects intestinal barrier function in adult offspring

We investigated the impact of perinatal exposure to BPA on lysozyme expression by Paneth cells at adulthood. We noticed a significant decrease in ileal expression of lysozyme in Paneth cells from offspring mice exposed to BPA perinatally exposed offspring (Fig. 1a), without modification of the number of Paneth cells producing lysozyme (data not shown). Moreover, fecal lysozyme activity against peptidoglycan was decreased in BPA-treated offspring compared to vehicle group (Fig. 1b). As a response to lysozyme disruption, a decrease in fecal antimicrobial activity against commensal bacteria *E. coli* was observed in BPA-exposed animals (Fig. 1c). In parallel, perinatal BPA exposure impaired significantly total IgA secretion in feces (Fig. 2a). This decrease was associated with a fall of IgA plasma cells (IgA^+, $B220^+$) frequency in siLP (Fig. 2b) and of colonic IgA^+ cells without changes in IgA concentration in colon (Fig. 2c). The level of fluorescence intensity of IgA in colon appears higher in treated animals (Fig. 2c), which is consistent with the trend in IgA plasma level. Furthermore, in these animals, a significant increase in IFN-γ level in colon was measured (Fig. 2d) and found associated with a rise of para- (FSS) and of trans-intact and total (HRP) cellular permeability. This altered permeability was concomitant to a decreased colonic electrical resistance (Fig. 2e).

Perinatal BPA exposure affects intestinal antibacterial immunity dependent of innate cells

To examine whether perinatal BPA exposure might also affect the RA synthetic machinery of IEC, we analyzed the activity of RALDH and expression of RALDH1 in this cell type. A lower frequency of RA producing cells was observed in IECs isolated from the SI of mice perinatally exposed to BPA compared to those from unexposed animals (Fig. 3a). Under all tested conditions, RALDH activity was blocked by the RALDH inhibitor DEAB. This result was associated with a significantly lower expression of RALDH1 mRNA in ileum of BPA-treated offspring mice (Fig. 3b). Recent study (Kim et al. 2016) showed that RA derived from mucosal compartment can regulate the migration of innate lymphoid cells ILC3 to the gut. Then, we investigated the impact of BPA exposure on ILC3 frequency in siLP. We showed that perinatal BPA exposure decreased the ILC3 frequency in siLP (Fig. 4a). To determine whether the fall of ILC3 has negative consequences on adaptive response to commensals, we analyzed IgG-specific response against mice the commensal bacteria *E. coli*. Interestingly, the decreased ILC3 was associated with a significant increase in anti-*E. coli* IgG in plasma of BPA-exposed offspring at adulthood (Fig. 4b). Perinatal exposure to BPA did not induce any modification of total IgG and IgA concentrations in plasma or reactivity against hydrosoluble food antigens (Fig. 4b).

Perinatal BPA exposure affects maturation of dendritic cell subsets isolated from siLP, MLN and spleen

We investigated the effects of perinatal BPA exposure on the frequency of two subpopulations of DC presents in siLP and MLNs. The frequency of these DC subsets in siLP was

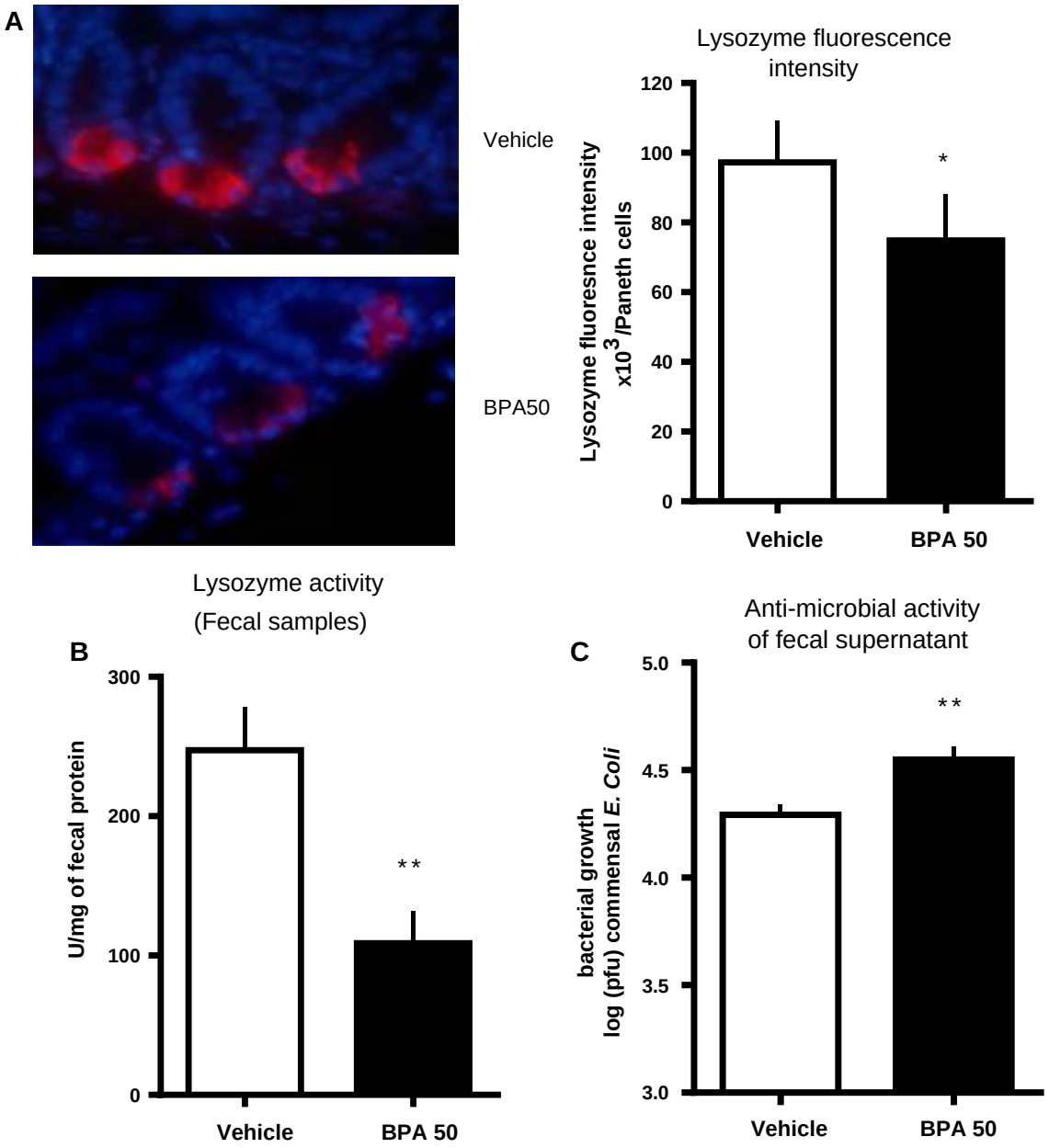


Fig. 1 Perinatal exposure to BPA disrupts intestinal antimicrobial functions on adult offspring. **a** Immunostaining of ileum paraffin section with anti lysozyme-FITC, wheat germ agglutinin (WGA)-Texas red and DAPI. Lysozyme fluorescence intensity per crypt cell ($n = 5$ crypts/animal) in mice perinatally exposed or not to BPA ($n = 8$–9 mice per group). **b** Lysozyme enzymatic activity against peptidoglycan measured in feces ($n = 6$–8 mice per group). **c** Total CFU of commensal *E. coli* culture in the presence of 1 mg protein of feces supernatant ($n = 10$–14 mice per group). The increased CFU represents a decreased antimicrobial activity of feces supernatants. Data were representative from two batches of experiments. $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ vs. non-exposed group

not modified by perinatal BPA treatment in basal conditions (Fig. 5a). However, expression of maturation markers after in vitro stimulation by a TLR cocktail LPS/poly(I:C) was significantly reduced on siLP DCs subsets isolated from BPA-treated offspring in comparison with control group (Fig. 5b). The two subsets of DCs showed a reduction in MHCII expression associated with a decreased expression of co-stimulation molecule CD80 (Fig. 5c). Moreover, the inability of CD103$^+$ DCs to mature in response to TLR ligands was associated with a reduction in the C–C chemokine receptor type 7 (CCR7), allowing for constitutive migration to MLNs at the steady state and imprinting gut-homing markers to naive T cells (Fig. 5b, c). As a consequence of the drop of CCR7 expression on CD103$^+$ DC isolated from siLP, we showed a reduction in this DC subset in MLNs suggesting a migration defect (Fig. 5a). As

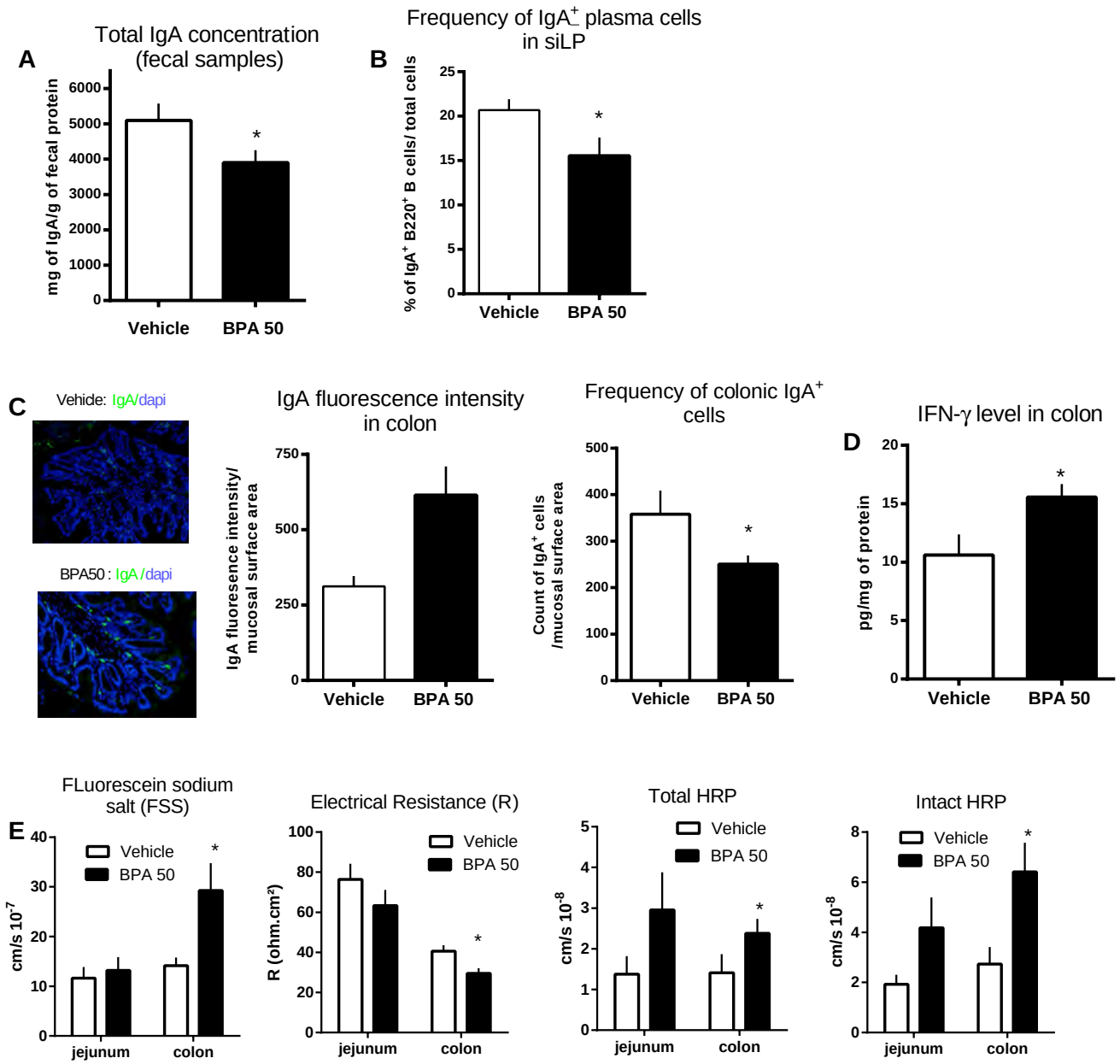


Fig. 2 Perinatal exposure to BPA disturbs intestinal IgA production and colonic permeability. **a** Total IgA concentration measured by ELISA in fecal samples ($n = 10$ mice per group). **b** Frequency of IgA plasma cells in small intestine *lamina propria* (siLP) from mice perinatally exposed or not to BPA ($n = 10$ mice per group). **c** Immunostaining of IgA cells and DAPI in colon section from mice perinatally exposed or not to BPA (5 sections/animals, $n = 8$ mice/groups). **d** Representative histograms of IFN-γ level in colonic tissues. **e** representative histograms of jejunal and colonic permeability of fluorescein sodium salt (FSS), horse radish peroxidase (HRP) and total electrical resistance (*R*) measured after 2-h bathing in Ussing chambers in mice exposed or not to BPA ($n = 15$–18 mice per group). Data were representative from three batches of experiments. *$P < 0.05$ vs. non-exposed group

observed in siLP, perinatal exposure to BPA did not affect frequency of DCs in spleen (Fig. 5a). We investigated the ability of these DC subsets to mature in response to LPS/poly(I:C) cocktail. We observed, as noticed in siLP, a default in maturation process associated with a decrease in MHCII and CD80 expression in DC subsets from BPA-exposed offspring mice compared to control group (Fig. 5c).

Perinatal BPA exposure induces T helper (TH)1/TH17 inflammatory responses in siLP by modulating T cell responses

We further investigated the consequences of barrier disruption and DC unresponsiveness on the T cell populations involved in intestinal and systemic homeostasis. Perinatal

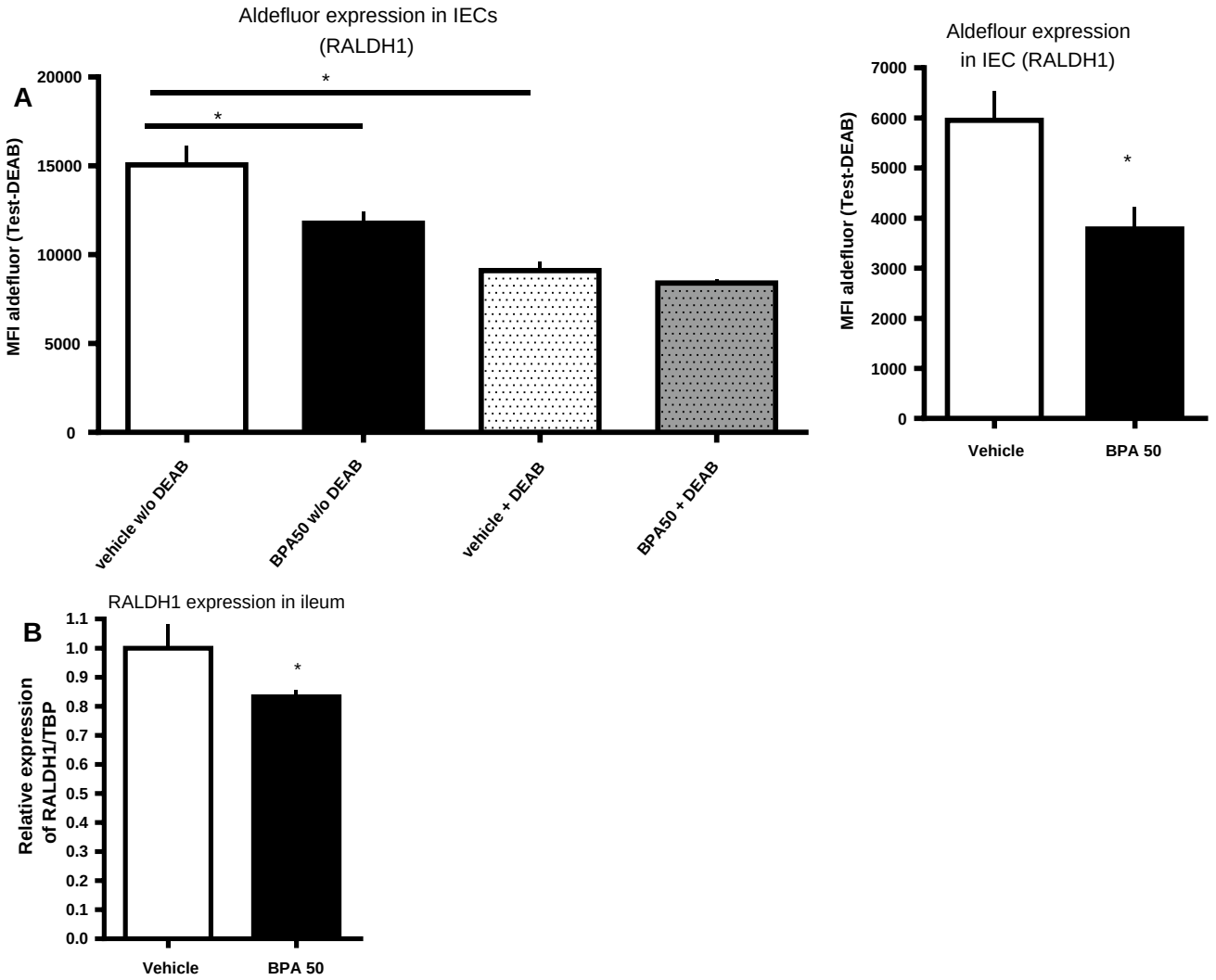


Fig. 3 Perinatal exposure to BPA decreases RA activity in intestinal epithelial cells. **a** Flow cytometry analysis of mean fluorescence intensity (MFI) of aldefluor with or without DEAB in isolated intestinal epithelial cells of mice perinatally exposed or not to BPA ($n = 8$ mice per group). **b** RALDH1 expression measured by RT-PCR in ileum. Data are expressed relative to TBP ($n = 9$ mice per group). Data were representative from two batches of experiments. *$P < 0.05$ vs. non-exposed group

exposure to BPA led to a decrease in activated T lymphocytes in the siLP of offspring, associated with a significant reduction in regulatory T (Treg) lymphocytes (Fig. 6a). Moreover, in these animal groups, we observed a significant increase in TH17, which was correlated with a jump of IL-17 and IFN-γ secretion by isolated T cells from siLP after anti-CD3/CD28 in vitro restimulation. However, the frequency of TH1 was not affected (Fig. 6a). In MLNs, we observed significant decrease in TH cells (Fig. 6b). As noticed in LP, perinatal exposure to BPA elicited a potent TH1/TH17 immune response through increased production of IFN-γ and IL-17 after in vitro anti-CD3/CD28 restimulation (Fig. 6b). Perinatal exposure to BPA did not affect the frequency of systemic activated T cells or T helper cells in adult offspring but induced a significant drop of Treg in this compartment (Fig. 6c). However, we observed an increase in TH17 cells in spleen compartment (Fig. 6c). Related to this result, anti-CD3/CD28 in vitro restimulation induced a significant increase in IL-17 secretion by splenocytes isolated from BPA-treated offspring mice compared to controls (Fig. 6c). The frequency of TH1 subsets cells was also increased without modification in IFN-γ secretion in systemic compartment after perinatal BPA exposure (Fig. 6c).

Discussion

During the neonatal period, the immune system, the intestinal epithelium and the microbiota form one entity, in which all parameters influence each other for their respective

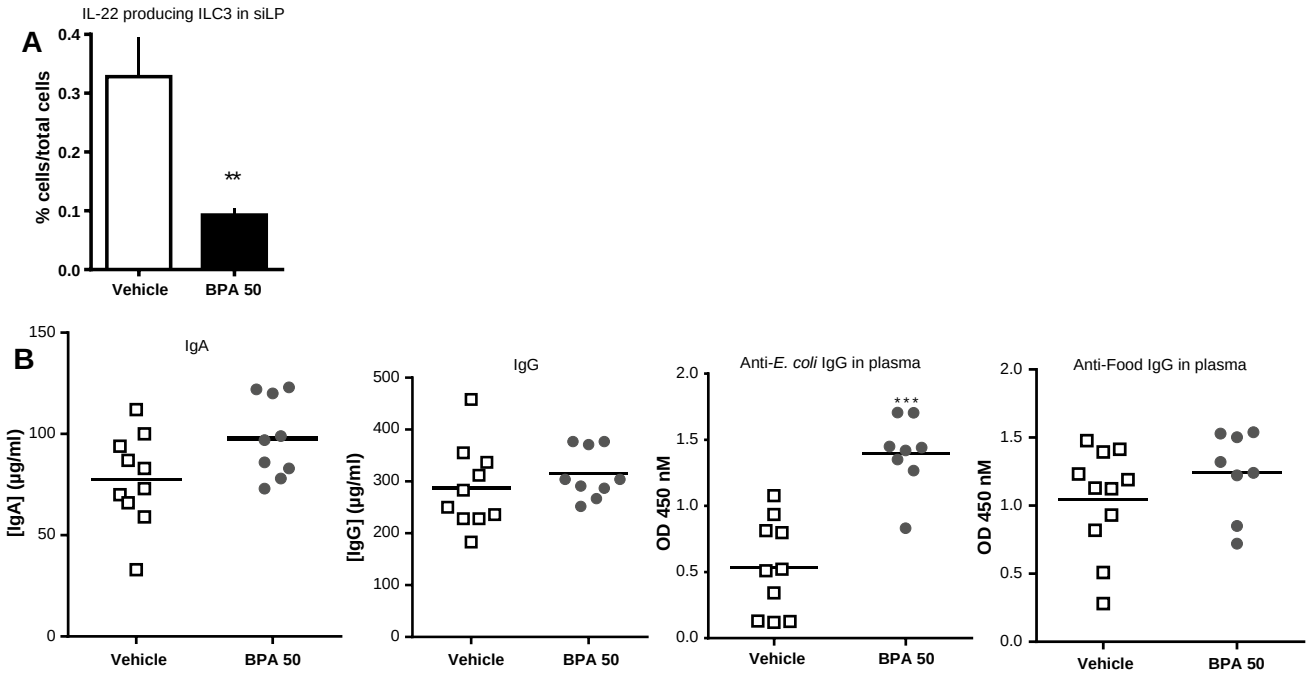


Fig. 4 Perinatal exposure to BPA decreases ILC3 frequency in siLP and systemic IgG-specific responses against *E. coli*. **a** Flow cytometry analysis of ILC3 population from siLP of offspring mice exposed to 50 µg/kg BW/day or control mice. ILC3 was defined as $CD127^+ROR\gamma t^+NKp46^+IL\text{-}22^+$ or $CD127^+ROR\gamma t^+NKp46^+IL\text{-}17^+$ cells. **b** Plasma IgA and IgG concentrations measured by ELISA. The *lines* represent the median (the 50th percentile). IgG specificity against *E. coli* or food lysate (hydrosoluble fraction) assessed by ELISA after normalizing to IgG concentrations ($n = 10$ mice per group). Data were representative from two batches of experiments. $^*P < 0.05$ vs. non-exposed group

development until the equilibrium is reached. To achieve this stage, the immune system is first primed in utero by microbial metabolites of the mother, while high intestinal permeability at birth permits lumen-to-mucosa exchanges for further maturation of intestinal immune functions. Dysregulations during these "windows of opportunities" might favor the development of diseases in later life, such as allergies and food intolerance (Dietert 2011). Prompted by these findings, we focused the current study on dysregulations in the development of local and systemic immune homeostasis provoked by perinatal exposure to BPA, which could explain the predisposition to inflammation in offspring at adulthood, leading to food intolerance, parasitic infection and inflammatory bowel disease (IBD).

Intestinal epithelial surface plays a critical role in host protection by producing a diverse repertoire of antimicrobial proteins that directly kill or hinder the growth of luminal microorganisms. Secretory IgA (sIgA) and antimicrobial peptides such as lysozyme ensure the intestinal barrier on the mucosal side, while a variety of immune cells such as ILCs, DC or T cells contribute to mucosal defenses in the serosal side. Our results demonstrated that perinatal exposure to BPA induced a general defect of fecal antimicrobial activity, hence showing a defect in the protection of the gut. On the other hand, intestinal IgA is involved in the development and maintenance of the homeostasis between the commensal microbiota and the host immune system (Reikvam et al. 2012). Interestingly, the current study showed that perinatal BPA treatment induced a fall of fecal IgA in offspring adult mice. A reduced IgA production by the intestine can ever be a cause or a consequence of aberrant commensal microbiota implantation (Kurashima et al. 2013) in BPA-exposed animals. Consistently, a recent study (Lai et al. 2016) showed an abnormal microbiota establishment in BPA-treated animals. Related to these observations, we showed that BPA exposure increased para- and trans-cellular permeability in the colon associated with an increase in IFN-gamma. Indeed, IFN-gamma is known to increase intestinal permeability in vitro (Madara and Stafford 1989) and in vivo (Ferrier et al. 2003). Our results emphasized that this dysbiosis might be a consequence of BPA-induced defect in IgA production, hence weakening gut barrier functions.

We next focused on consequences of perinatal exposure to BPA on intestinal ILC3. ILC3 population is enriched at mucosal sites, driving lymphoid tissue organogenesis during fetal life, and maintaining intestinal homeostasis in adults through IL-22 production downstream the transcription factor retinoic acid-related orphan receptor (ROR)γt (van de Pavert and Vivier 2016). Moreover, it was

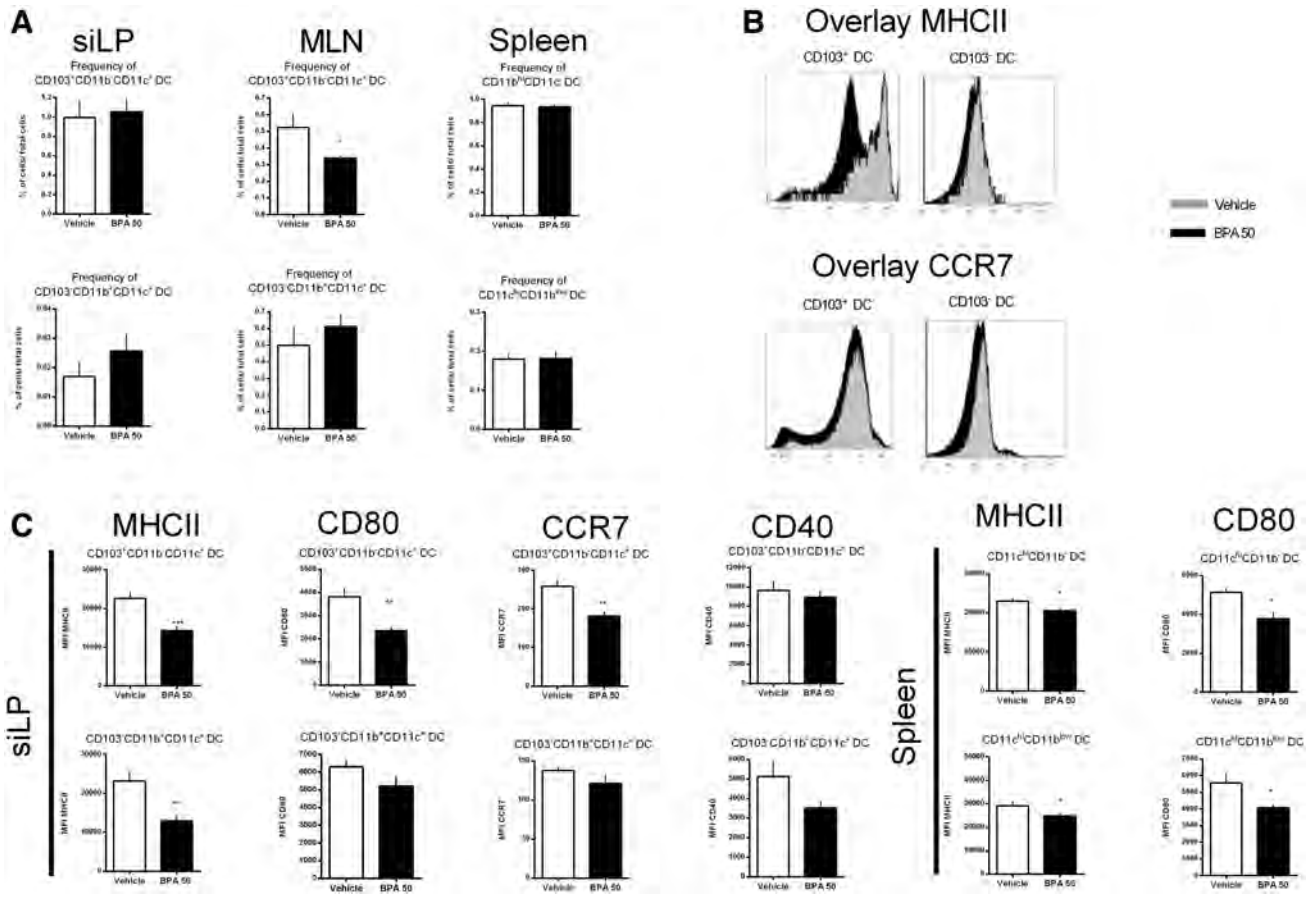


Fig. 5 Perinatal exposure to BPA affects frequency and function of dendritic cells subsets. **a** Flow cytometry analysis of percent of $CD103^{+}CD11b^{-}CD11c^{+}$ DC and $CD103^{-}CD11b^{-}CD11c^{+}$ DCs isolated from siLP, MLNs or $CD11b^{hi}CD11c^{-}$ DC and $CD11b^{hi}CD11c^{low}$ DC from spleen of mice perinatally exposed or not to BPA ($n = 10$ mice per group). **b** Isolated cells from siLP were matured using LPS/poly(I:C) cocktail for 24 h. Overlay of mean fluorescence intensity (MFI) of MHCII and CCR7 in DC subsets from siLP of mice perinatally exposed vs. not exposed to BPA. **c** CD80, MHCII, CCR7 and CD40 expression on matured DC subsets isolated cells from siLP or spleen of mice perinatally exposed or not to BPA ($n = 10$ mice per group). Data were representative from two batches of experiments. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ vs. non-exposed group

demonstrated that microenvironmental factors would mediate the differentiation of ILC subsets (Bar-Ephraim and Mebius 2016). An interesting factor possibly playing this role is RA (Kim et al. 2015). Moreover, RA synthesis by IECs contributes to intestinal mucosa homeostasis (Agace and Persson 2012). In agreement with these data, the present study showed a decreased RA activity in IEC isolated from adult mice perinatally exposed to BPA, and this effect was found associated with the fall of ILC3 frequency observed in the same group of animals compared to controls. Moreover, Hepworth et al. (2013) reported that loss of $ROR\gamma t^{+}$ ILC3 was associated with dysregulated adaptive immune cell response against commensal bacteria and low-grade systemic inflammation. Consistent with these data, our study revealed that the decrease in ILC3 frequency in offspring mice after perinatal exposure to BPA leads to a peaked increase in plasma *E. coli*-specific IgG titers without change in antifood IgG response.

ILC3 has also been reported to support DC populations in the intestine (Mortha et al. 2014), and conversely, DCs are key factors in regulating cytokine production by ILCs. Our results demonstrated that perinatal exposure to BPA has no impact on the frequency of the two DC subsets in siLP. In contrast, the frequency of $CD103^{+}$ DC was decreased in the MLN compartment. We, then, analyzed expression of chemokines and markers involved in T cell co-stimulation by the two DC subsets. We observed a decrease in MHCII, CD80 and CCR7 expression particularly in $CD103^{+}$ DC, which can explain the fall of $CD103^{+}$ DC in MLN. No difference in DC frequency was observed, but a default of maturation occurred in both DC subsets isolated from siLP and spleen of BPA-exposed offspring mice at adulthood.

It is known that oral tolerance requires the participation of regulatory T (Treg) cells (Kim et al. 2016). In the MLNs, migratory $CD103^{+}$ DCs from LP promote

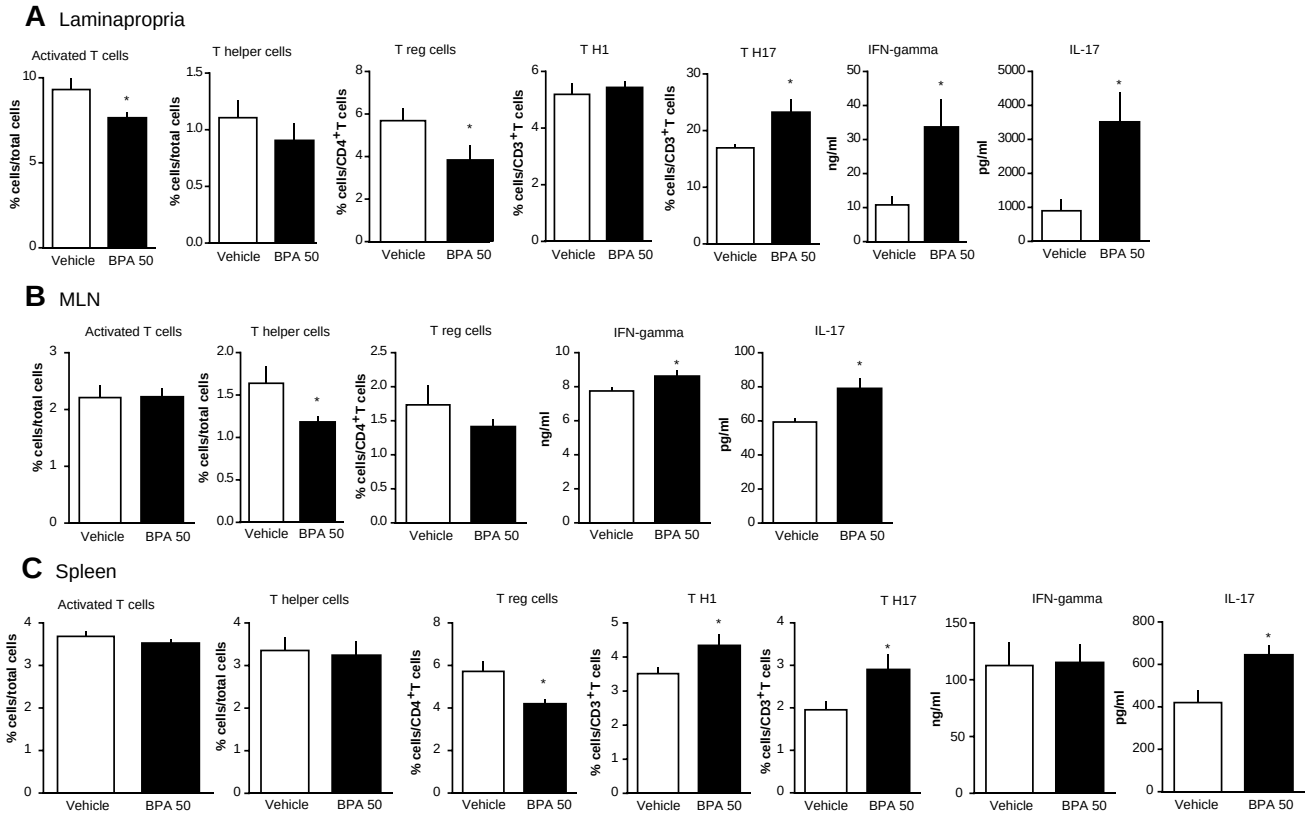


Fig. 6 Perinatal exposure to BPA influences T cell frequency and promotes a potent TH1/TH17 intestinal and systemic immune response. Flow cytometry analysis of $CD4^+$ $CD44^{high}CD62L^{low}$ T-activated cells, T helper $CD4^+CD25^+$ and T regulatory $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ lymphocytes, TH17 $CD3^+Ror\gamma t^+IL\text{-}17^+$ cells and TH1 $CD3^+IFN\gamma^+T\text{-}bet^+$ lymphocytes. Representative histograms of IL-17, IFN-γ and/or IL-22 secretion after anti-CD3/CD28 in vitro restimulation of isolated lymphocytes from siLP (**a**), MLN (**b**), spleen (**c**) (n = 8–9/group). Data were representative from three batches of experiments. *$P < 0.05$ vs. non-exposed group

the development of gut-homing Tregs (Pabst and Mowat 2012). Consistent with these data, we observed a decrease in Tregs isolated from siLP and spleen in BPA-exposed offspring mice. These results are in accordance with those obtained by Ménard et al. (2014b) showing that perinatal treatment with BPA at 5 µg/kg bw/day decrease splenic Tregs. The decrease in ILC3 frequency observed in siLP after perinatal BPA treatment can prevent the differentiation of naive T cells into Tregs. In contrast, it has been shown that 17-estradiol (i.e., E2) increased FoxP3 expression in vitro and in vivo (Polanczyk et al. 2004). Moreover, treatment of naive mice with E2 increased both $CD25^+$ cell number and FoxP3 expression level. Altogether, it can be hypothesized that BPA, despite estrogenic mimetic properties, may have distinct mechanisms in comparison with E2 on immune system development, particularly for Treg subset. Interestingly, it is also known that Treg cells homed in the GALT also promote B cell production of non-inflammatory IgA (Tsuji et al. 2009; Chinthrajah et al. 2016). On this basis, it is suggested that the fall of IgA level observed in intestinal compartment may be related to the decrease in local Treg cells in our model. Finally, regarding the decrease in Treg in siLP, our study reveals the ability of BPA to provoke a sharp increase in TH17 and TH1 cell-mediated inflammation after in vitro anti-CD3/CD28 restimulation of intestinal immune cells, which is extended to MLN in adult mice. These results are in accordance with our previous studies demonstrating that perinatal exposure to BPA predisposed to aberrant inflammation responses (Braniste et al. 2010; Menard et al. 2014b). At the systemic level, we also reported an increase IL-17 cytokine production after in vitro anti-CD3/CD28 restimulation of splenocytes from BPA-exposed offspring mice. Similar observation was recently reported by Luo et al. (2016) after gestational and lactational exposure to BPA. Interestingly, these authors showed gender-specific persistent rise in TH17 cells after perinatal exposure to BPA with changes more pronounced on female than in male offspring.

A previous study reported that the amount of TH cells in spleen was reduced in mice exposed to BPA, either prenatally or during adulthood, although the extent of

reduction was greater in the prenatal exposure group (Yan et al. 2008). Another study involving in utero exposure to BPA in mice and during nursing showed that subsequent oral tolerance and accumulation of Treg cells were diminished in these mice (Ohshima et al. 2007). These data demonstrated that BPA exposure during the perinatal period deeply influences the development of T cells and consequently the establishment of tolerance. The BPA-mediated TH2 skewing has been proposed to promote allergic reactions (Guo et al. 2010) and asthma (Midoro-Horiuti et al. 2010), while TH1 or TH17 promoted autoimmune and inflammatory diseases (Rogers et al. 2017). Recent study demonstrates that ILC3s can inhibit TH17 cell-mediated inflammation through aryl hydrocarbon receptor (AhR) (Pedicord and Mucida 2015), highlighting a potential role of AhR in the immune response modulation evoked by BPA. However, the AhR role in the immune response modulation requires further investigation. Moreover, ILCs can act to limit commensal bacteria-specific $CD4^+$ T cell responses. Consistent with this, a selective deletion of ILCs as reported herein can result in dysregulated commensal bacteria-dependent $CD4^+$ T cell responses that promoted spontaneous intestinal inflammation (Hepworth et al. 2013). These data could explain the increase in intestinal inflammation observed after perinatal BPA exposure (Braniste et al. 2010). Then, contribution of commensal microbiota in the modulation of immune response and, hence, of oral tolerance after perinatal exposure to BPA needs to be studied. Moreover, because an appropriate microbe–immune interaction play an important role in early life and may result, when disrupted, in potentially persistent immune abnormalities, it is worth considering whether a BPA-induced modification of microbiota in early life may affect susceptibility to disease in later life.

In summary, we demonstrated that perinatal exposure to BPA influences the well establishment of intestinal barrier functions, gut-associated immune system and even has consequences on systemic immune response (cellular and humoral). Altogether, these dysregulations could explain a predisposition of BPA perinatally exposed rodents to food intolerance and susceptibility to infections in adulthood.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare they have no conflict of interest.

Funding This work was supported by Grant ANR-10-CESA-005 from the Agence Nationale de la recherche (France), Grant EST-2015/1/026 from Agence Nationale de Sécurité Sanitaire, de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail (ANSES), grant from AlimH from the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) and grant from the Region of Midi-Pyrénées.

References

Agace WW, Persson EK (2012) How vitamin A metabolizing dendritic cells are generated in the gut mucosa. Trends Immunol 33:42–48. doi:10.1016/j.it.2011.10.001

Artursson P, Magnusson C (1990) Epithelial transport of drugs in cell culture. II: Effect of extracellular calcium concentration on the paracellular transport of drugs of different lipophilicities across monolayers of intestinal epithelial (Caco-2) cells. J Pharm Sci 79:595–600

Bar-Ephraim YE, Mebius RE (2016) Innate lymphoid cells in secondary lymphoid organs. Immunol Rev 271:185–199. doi:10.1111/imr.12407

Biedermann S, Tschudin P, Grob K (2010) Transfer of bisphenol A from thermal printer paper to the skin. Anal Bioanal Chem 398:571–576. doi:10.1007/s00216-010-3936-9

Braniste V, Jouault A, Gaultier E et al (2010) Impact of oral bisphenol A at reference doses on intestinal barrier function and sex differences after perinatal exposure in rats. Proc Natl Acad Sci USA 107:448–453. doi:10.1073/pnas.0907697107

Cano PM, Seeboth J, Meurens F et al (2013) Deoxynivalenol as a new factor in the persistence of intestinal inflammatory diseases: an emerging hypothesis through possible modulation of Th17-mediated response. PLoS One 8:e53647. doi:10.1371/journal.pone.0053647

Chinthrajah RS, Hernandez JD, Boyd SD et al (2016) Molecular and cellular mechanisms of food allergy and food tolerance. J Allergy Clin Immunol 137:984–997

Dietert RR (2011) Role of developmental immunotoxicity and immune dysfunction in chronic disease and cancer. Reprod Toxicol 31:319–326. doi:10.1016/j.reprotox.2010.09.006

EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzymes, Flavourings and Processing Aids (CEF) (2015) Scientific opinion on the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs: opinion on BPA. EFSA J 13:3978. doi:10.2903/j.efsa.2015.3978

Ferrier L, Mazelin L, Cenac N et al (2003) Stress-induced disruption of colonic epithelial barrier: role of interferon-gamma and myosin light chain kinase in mice. Gastroenterology 125:795–804

Guo H, Liu T, Uemura Y et al (2010) Bisphenol A in combination with TNF-alpha selectively induces Th2 cell-promoting dendritic cells in vitro with an estrogen-like activity. Cell Mol Immunol 7:227–234. doi:10.1038/cmi.2010.14

Hepworth MR, Monticelli LA, Fung TC et al (2013) Innate lymphoid cells regulate $CD4^+$ T-cell responses to intestinal commensal bacteria. Nature 498:113–117. doi:10.1038/nature12240

Hessel EV, Ezendam J, van Broekhuizen FA et al (2016) Assessment of recent developmental immunotoxicity studies with bisphenol A in the context of the 2015 EFSA t-TDI. Reprod Toxicol. doi:10.1016/j.reprotox.2016.06.020

Kim MH, Taparowsky EJ, Kim CH (2015) Retinoic acid differentially regulates the migration of innate lymphoid cell subsets to the Gut. Immunity 43:107–119. doi:10.1016/j.immuni.2015.06.009

Kim KS, Hong SW, Han D et al (2016) Dietary antigens limit mucosal immunity by inducing regulatory T cells in the small intestine. Science 351:858–863. doi:10.1126/science.aac5560

Kurashima Y, Goto Y, Kiyono H (2013) Mucosal innate immune cells regulate both gut homeostasis and intestinal inflammation. Eur J Immunol 43:3108–3115. doi:10.1002/eji.201343782

Lai KP, Chung YT, Li R et al (2016) Bisphenol A alters gut microbiome: comparative metagenomics analysis. Env Pollut. doi:10.1016/j.envpol.2016.08.039

Luo S, Li Y, Li Y et al (2016) Gestational and lactational exposure to low-dose bisphenol A increases Th17 cells in mice

offspring. Env Toxicol Pharmacol 47:149–158. doi:10.1016/j.etap.2016.09.017

Madara JL, Stafford J (1989) Interferon-gamma directly affects barrier function of cultured intestinal epithelial monolayers. J Clin Invest 83:724–727. doi:10.1172/JCI113938

Menard S, Guzylack-Piriou L, Lencina C et al (2014a) Perinatal exposure to a low dose of bisphenol A impaired systemic cellular immune response and predisposes young rats to intestinal parasitic infection. PLoS One 9:e112752. doi:10.1371/journal.pone.0112752

Menard S, Guzylack-Piriou L, Leveque M et al (2014b) Food intolerance at adulthood after perinatal exposure to the endocrine disruptor bisphenol A. FASEB J 28:4893–4900. doi:10.1096/fj.14-255380

Midoro-Horiuti T, Tiwari R, Watson CS, Goldblum RM (2010) Maternal bisphenol a exposure promotes the development of experimental asthma in mouse pups. Environ Health Perspect 118:273–277. doi:10.1289/ehp.0901259

Mortha A, Chudnovskiy A, Hashimoto D et al (2014) Microbiota-dependent crosstalk between macrophages and ILC3 promotes intestinal homeostasis. Science 343:1249288. doi:10.1126/science.1249288

Ohshima Y, Yamada A, Tokuriki S et al (2007) Transmaternal exposure to bisphenol a modulates the development of oral tolerance. Pediatr Res 62:60–64. doi:10.1203/PDR.0b013e3180674dae

Pabst O, Mowat AM (2012) Oral tolerance to food protein. Mucosal Immunol 5:232–239. doi:10.1038/mi.2012.4

Pedicord VA, Mucida D (2015) "A sledgehammer breaks glass but forges steel": bacteria adhesion shapes gut immunity. Cell 163:273–274. doi:10.1016/j.cell.2015.09.040

Polanczyk MJ, Carson BD, Subramanian S et al (2004) Cutting edge: estrogen drives expansion of the $CD4^+CD25^+$ regulatory T cell compartment. J Immunol 173:2227–2230

Reikvam DH, Derrien M, Islam R et al (2012) Epithelial-microbial crosstalk in polymeric Ig receptor deficient mice. Eur J Immunol 42:2959–2970. doi:10.1002/eji.201242543

Rogers JA, Metz L, Yong VW (2012) Review: endocrine disrupting chemicals and immune responses: a focus on bisphenol-A and its potential mechanisms. Mol Immunol 53:421–430. doi:10.1016/j.molimm.2012.09.013

Rogers JA, Mishra MK, Hahn J et al (2017) Gestational bisphenol-A exposure lowers the threshold for autoimmunity in a model of multiple sclerosis. Proc Natl Acad Sci USA. doi:10.1073/pnas.1620774114

Rubin BS (2011) Bisphenol A: an endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. J Steroid Biochem Mol Biol 127:27–34. doi:10.1016/j.jsbmb.2011.05.002

Taylor JA, Vom Saal FS, Welshons WV et al (2011) Similarity of bisphenol A pharmacokinetics in rhesus monkeys and mice: relevance for human exposure. Environ Health Perspect 119:422–430. doi:10.1289/ehp.1002514

Tsuji M, Komatsu N, Kawamoto S et al (2009) Preferential generation of follicular B helper T cells from $Foxp3^+$ T cells in gut Peyer's patches. Science 323:1488–1492. doi:10.1126/science.1169152

van de Pavert SA, Vivier E (2016) Differentiation and function of group 3 innate lymphoid cells, from embryo to adult. Int Immunol 28:35–42. doi:10.1093/intimm/dxv052

Vandenberg LN, Hauser R, Marcus M et al (2007) Human exposure to bisphenol A (BPA). Reprod Toxicol 24:139–177. doi:10.1016/j.reprotox.2007.07.010

Vandenberg LN, Chahoud I, Heindel JJ et al (2010) Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A. Environ Health Perspect 118:1055–1070. doi:10.1289/ehp.0901716

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. doi:10.1289/ehp.10829

Zalko D, Jacques C, Duplan H et al (2010) Viable skin efficiently absorbs and metabolizes bisphenol A. Chemosphere 82:424–430. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.09.058

2. Gut dysbiosis and impairment of immune system homeostasis in perinatally-exposed mice to Bisphenol A precede obese phenotype development

Sci Rep. 2017 nov 3. doi: 10.1038/s41598-017-15196-w

L'obésité ainsi que le T2D sont deux atteintes de la population générale parmi les plus préoccupantes dans les pays riches et industrialisés en ce 21ème siècle. Une mauvaise hygiène de vie, une mauvaise alimentation, peu d'exercice physique, des dispositions génétiques sont autant de facteurs aggravants de ces désordres métaboliques. Cependant, depuis quelques années, les PE émergent comme possible cause de l'expansion mondiale de ces troubles du métabolisme. Le BPA a été rapporté comme étant un des PE susceptible d'avoir un impact important sur l'apparition et l'expansion de l'obésité et du T2D. En effet, de nombreuses études démontrent une corrélation positive entre les niveaux urinaires de BPA et l'apparition de l'obésité et du T2D (Bagchi and Preuss, 2013; Trasande et al., 2012). De plus, l'exposition au BPA lors de la période périnatale chez l'animal augmente l'apparition de ces désordres métaboliques, appuyant l'importance de cette fenêtre critique de développement (Angle et al., 2013; Miyawaki et al., 2007; Rubin et al., 2001). Cependant, aucune étude n'apporte de précisions sur le mécanisme d'action du BPA susceptible de mener à l'obésité et au T2D, en prenant en considération les perturbations du système immunitaire.

En effet, il existe de nombreux facteurs non phénotypiques qui permettent de caractériser ces désordres métaboliques, dont le système immunitaire. En effet, l'obésité et le T2D sont associés à une inflammation de bas-grade au niveau du tissu adipeux (Pereira and Alvarez-Leite, 2014). Ce tissu possède des macrophages spécifiques, appelés ATM (*Adipose Tissue Macrophages*), régulant les réponses immunitaires. Les ATM sont classés en deux sous-populations différenciées selon leurs marqueurs membranaires et leur capacité à réguler l'inflammation: les macrophages M2 anti-inflammatoires caractérisés par l'expression des cytokines IL-10 et TGF-β, et les macrophages M1 pro-inflammatoires produisant de grandes quantités de TNF-α et d'IL-6. Lors du développement de l'obésité, une déviation des macrophages M2 vers des macrophages M1 s'opère, augmentant la production de cytokines pro-inflammatoires au détriment de celles anti-inflammatoires (Kalupahana et al., 2012). Ces conditions font partie des facteurs critiques menant au développement de l'insulino-résistance, au T2D et aux complications associées à l'obésité (Itoh et al., 2011).

D'autre part, l'obésité et le T2D sont caractérisés par un microbiote intestinal altéré aussi appelé dysbiose intestinale (Cani and Delzenne, 2009). Le microbiote intestinal joue un

rôle important dans la perméabilité intestinale (de manière indirecte *via* l'inflammation) ainsi que pour l'absorption des nutriments par l'intestin (Prakash et al., 2011). Il a été démontré une diminution du rapport *Firmicutes*/*Bacteroidetes* dans le microbiote intestinal de la souris *ob/ob* ainsi que chez l'Homme, suggérant une dysbiose intestinale spécifique de l'obésité (Turnbaugh et al., 2006). De plus, le microbiote intestinal peut moduler l'apparition de l'obésité. En effet, une étude de cas a montré le développement de l'obésité chez une femme après transplantation de selles provenant d'une personne pré-obèse (Alang and Kelly, 2015). Il a été reporté, chez les patients diabétiques, que le T2D agissait comme promoteur de communautés microbiennes dites pathogéniques comme *Faecalibacterium prausnitzii*, et inhibiteur des souches bénéfiques comme *Clostridium cluster IV* et *Clostridium cluster XIVa* (Remely et al., 2014).

L'inflammation et le microbiote intestinal sont deux facteurs étroitement liés. En effet, le microbiote peut moduler le développement du système immunitaire intestinal. Il a été montré que des souris axéniques (i.e. dépourvu de microbiote intestinal) présentent une déficience dans le développement des tissus lymphoïdes associés à l'intestin, avec une diminution de la taille des plaques de Peyer et des MLN (Falk et al., 1998; Macpherson and Harris, 2004). De plus les IEC de ces mêmes souris présentent des défauts de structures, notamment dans la formation des microvillosités cellulaires, ainsi que dans leur renouvellement (Abrams et al., 1963). Ces souris sont également déficientes dans le développement des Th17 de l'intestin (Ivanov et al., 2008). Ces défauts mènent à une susceptibilité accrue aux infections par les pathogènes (Nardi et al., 1989; Zachar and Savage, 1979). Dans l'autre sens, les maladies inflammatoires peuvent moduler le microbiote intestinal. En effet, il a été démontré que lors de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), la réponse inflammatoire contre le microbiote intestinal commensal est dérégulée, avec un taux d'anticorps contre les bactéries commensales augmenté chez les patients souffrant de MICI (Macpherson et al., 1996).

Or la littérature rapporte clairement que le BPA a la capacité de moduler ces deux facteurs importants pour le développement de l'obésité et du diabète de type 2 (cf. chapitres 2.4.2 et 2.4.3 des données bibliographiques). Cependant, aucune étude n'a fait le lien entre l'exposition au BPA, le développement des troubles métaboliques et la modulation du système immunitaire et du microbiote dans l'intestin. Le but de cette deuxième étude a donc été de caractériser les effets d'une exposition périnatale au BPA sur le système immunitaire et le microbiote intestinal en prenant comme modèle de facteur d'impact le développement de l'obésité et du T2D, dans une étude longitudinale chez la descendance souris mâle.

Pour cela, nous avons utilisé le même protocole expérimental que dans la première étude en exposant des souris C3H/HeN gestantes à 50 µg/kg de poids corporel/jour de BPA du 15ème jour de gestation jusqu'au jour 21 post-natal. Dans cette étude, seule la descendance mâle a été étudiée car les souris mâles sont plus affectées par l'obésité et le T2D que les femelles (Hong et al., 2009; Pettersson et al., 2012). Nous avons défini deux âges d'études : le jour 45 post-natal correspondant à l'âge « jeune adulte » et le jour 170 post-natal correspondant à l'âge « adulte vieillissant ». Ces animaux ont été nourris du début jusqu'à la fin de l'expérience avec un régime normal. Nous avons suivi leur poids et leur prise alimentaire de manière hebdomadaire jusqu'au jour 170 post-natal. Nous avons également testé leur tolérance au glucose et à l'insuline de manière chronique. Nous avons analysé le profil inflammatoire dans le pancréas et le foie par ELISA, notamment en dosant le niveau de TNF-α et d'IFN-γ pour le pancréas et d'IL-17, d'IL-22, de TNF-α et d'IFN-γ pour le foie. Nous avons analysé dans le tissu adipeux l'expression de TNF-α, IFN-γ, Inos, IL-17, IL1-β et IL-6 par Q-PCR, ainsi que pour la fréquence des macrophages M1 et M2 par cytométrie en flux. La fréquence des cellules Th1, Th17 et Treg a été déterminée par cytométrie en flux et la production d'IFN-γ et d'IL-17 après re-stimulation CD3/CD28 *in vitro par* ELISA dans la LP et la rate. Les perturbations des défenses intestinales ont été analysées par la production d'IgA et de son translocateur pIgR dans les fèces de ces animaux par ELISA. L'activité antimicrobienne envers une *E.coli* commensale ainsi que l'activité du lysozyme a également été déterminée chez ces animaux. Enfin, le microbiote intestinal a été caractérisé par Q-PCR chez ces mêmes souris.

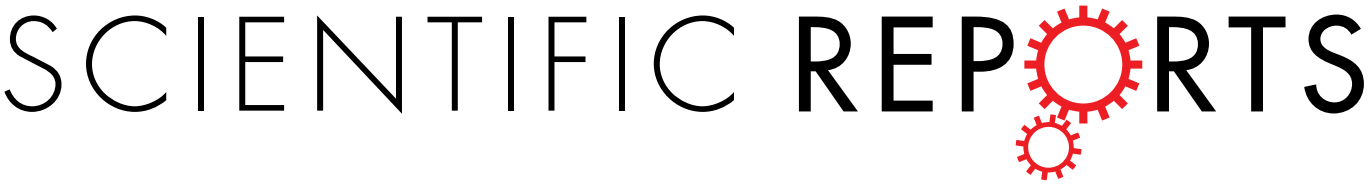
Nos observations confirment les effets du BPA en période périnatale sur le développement du phénotype obèse et des troubles du métabolisme du glucose apparaissant avec le vieillissement. En effet, la descendance mâle a présenté une augmentation de poids significative dès le jour 70 post-natal par rapport au groupe contrôle et jusqu'au jour 170. De plus, ces animaux ont aussi présenté une augmentation de la masse du tissu adipeux périgonadique. Ils ont également développé une baisse de la sensibilité au glucose et à l'insuline à partir du jour 35 et 125 post-natal, respectivement, et maintenue jusqu'au jour 160.

Aucune inflammation n'a été constaté dans le pancréas des animaux BPA et ce, quel que soit l'âge. Cependant, les animaux BPA jeunes adultes ont présenté une inflammation transitoire de type IL-17 et TNF-α et une inflammation de type IL-22 lors du vieillissement dans le foie. De plus, une augmentation de macrophages pro-inflammatoires M1 a été observée chez ces animaux, associée à une inflammation de type IL-17, seulement lors du vieillissement, c'est-à-dire lorsque les désordres métaboliques sont présents.

Nous avons également observé une diminution de la fréquence des cellules Th17 et Th1 associée à une diminution de la sécrétion d'IFN-γ dans la LP de la descendance BPA à J45. De plus, la fréquence des cellules Th1 et Th17 ainsi que la production d'IFN-γ et d'IL-17 augmentent dans la rate de ces mêmes animaux. Aucun changement dans la fréquence des Treg n'a été observé à cet âge. Lors du vieillissement, seule la diminution de la fréquence Th1 est retrouvée dans la LP des animaux BPA. Cette diminution est cependant associée à une augmentation de la fréquence des Treg. Dans la rate des animaux BPA en vieillissement, il est observé une augmentation de la production d'IL-17 significative par rapport aux contrôles.

Au niveau des défenses intestinales, les animaux BPA jeunes adultes présentaient une diminution transitoire de la sécrétion d'IgA et de pIgR dans les fèces. De plus, ces mêmes animaux ont montré une diminution de l'activité antimicrobienne envers une *E.coli* commensale ainsi qu'une diminution de l'activité du lysozyme dans les fèces. Ces troubles étaient également retrouvés lors du vieillissement. Nous avons observé une différence significative du microbiote intestinale chez les animaux BPA par rapport aux contrôles et ce quel que soit l'âge. En effet, à l'âge jeune adulte, les animaux BPA présentent une très forte diminution de la communauté des *Bifidobacteria* par rapport au groupe control, alors qu'en vieillissant, apparaissait une diminution de l'abondance de *Clostridium butyricum* et *Clostridium Cluster XIVa*, retrouvée lors de l'apparition de désordres métaboliques (Remely et al., 2014).

Ces résultats ont confirmé l'effet obésogène et diabétogène d'une exposition périnatale au BPA, en apportant des éléments nouveaux sur le rôle important du système immunitaire en relation avec le microbiote dans la mise en place de tels désordres. En effet, cette étude démontre que des souris exposées en période périnatale au BPA présentent des perturbations dans l'homéostasie du système immunitaire associée à une dysbiose intestinale et une altération de la tolérance au glucose chez le jeune adulte, qui précèdent le développement du phénotype obèse lors du vieillissement.



OPEN

Received: 19 May 2017
Accepted: 16 October 2017
Published online: 03 November 2017

Gut dysbiosis and impairment of immune system homeostasis in perinatally-exposed mice to Bisphenol A precede obese phenotype development

Yann Malaisé[1], Sandrine Menard[2], Christel Cartier[1], Eric Gaultier[1], Frédéric Lasserre[3], Corinne Lencina[2], Cherryl Harkat[2], Nancy Geoffre[4], Laïla Lakhal[3], Isabelle Castan[4], Maïwenn Olier[2], Eric Houdeau[1] & Laurence Guzylack-Piriou[1]

Epidemiology evidenced the Bisphenol A (BPA), a chemical found in daily consumer products, as an environmental contributor to obesity and type II diabetes (T2D) in Humans. However, the BPA-mediated effects supporting these metabolic disorders are still unknown. Knowing that obesity and T2D are associated with low-grade inflammation and gut dysbiosis, we performed a longitudinal study in mice to determine the sequential adverse effects of BPA on immune system and intestinal microbiota that could contribute to the development of metabolic disorders. We observed that perinatal exposure to BPA (50 µg/kg body weight/day) induced intestinal and systemic immune imbalances at PND45, through a decrease of Th1/Th17 cell frequencies in the *lamina propria* concomitant to an increase of splenic Th1/Th17 immune responses. These early effects are associated with an altered glucose sensitivity, a defect of IgA secretion into faeces and a fall of faecal bifidobacteria relative to control mice. Such BPA-mediated events precede infiltration of pro-inflammatory M1 macrophages in gonadal white adipose tissue appearing with ageing, together with a decreased insulin sensitivity and an increased weight gain. Our findings provide a better understanding of the sequential events provoked by perinatal exposure to BPA that could support metabolic disorder development in later life.

Obesity is an increasing health concern worldwide and poses a major risk in the progress of type II diabetes (T2D), cardiovascular disease and hypertension[1]. Risk factors such as bad dietary habits, lack of physical activity or genetic factors, and environmental chemicals with endocrine-disrupting activity may promote adipogenesis and weight gain[2,3]. Among these products, bisphenol A (BPA) has been reported as a potential determinant of obesity epidemic[4,5]. BPA is omnipresent in our daily life due to its wide use in manufacturing polycarbonate plastics, epoxy resins as well as in thermal printing papers, making BPA exposure ubiquitous for humans due to these multiple sources and daily contact. Accordingly, BPA is detectable in the urine but also in the placenta, umbilical blood, amniotic fluid and breast milk in humans, at relevant concentrations for health concern for the foetus, then for breastfed child[6,7]. Indeed, animal studies emphasized that perinatal exposure to low doses of BPA increases the risk of metabolic disorders in off pring, making this period of development a critical window of exposure to this chemical[8,9]. In Humans,

[1]Intestinal Development, Xenobiotics and ImmunoToxicology team, Toxalim (Research Centre in Food Toxicology), Université de Toulouse, INRA, ENVT, INP-Purpan, UPS, Toulouse, France. [2]Neuro-Gastroenterology and Nutrition team, Toxalim (Research Centre in Food Toxicology), Université de Toulouse, INRA, ENVT, INP-Purpan, UPS, Toulouse, France. [3]Integrative Toxicology and Metabolism team, Toxalim (Research Centre in Food Toxicology), Université de Toulouse, INRA, ENVT, INP-Purpan, UPS, Toulouse, France. [4]Adipocyte secretions, obesities and related diseases team, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Université Paul Sabatier (UPS), Unité Mixte de Recherche (UMR) 1048, Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires (I2MC), Toulouse, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to E.H. (email: eric.houdeau@inra.fr) or L.G.-P. (email: laurence.guzylack@inra.fr)

high BPA levels have been associated with obesity and T2D, and the economic impacts of obesity due to BPA have been recently estimated to represent 42 000 new cases and € 1.54 billion loss by year in Europe[5,10–13].

How perinatal exposure to BPA contributes to metabolic disorders in adulthood is still unclear. One of the major drivers in obesity and diabetes is inflammation[14]. In obese mice and humans, white adipose tissue (WAT) presents infiltrating M1 macrophages that secrete pro-inflammatory cytokines such as TNF-α and IL-6, characterizing chronic low-grade inflammation in parallel to adipogenesis and weight gain[15,16]. Moreover, the Th1/Th cell ratio is increased in obesity, proved by increased IFN-γ production in obese mice[17]. Perinatal exposure to BPA in rats has been shown to deeply affect homeostasis of the gut immune system[18,19], and has been also regarded as a risk factor of developing pro-inflammatory conditions in adult life[20]. Altogether, these observations underline a possible link between perinatal exposure to BPA, inflammation and the development of obesity later in life.

On the other hand, obesity and T2D are also found associated with intestinal dysbiosis, suggesting that the microbiota is crucial for the metabolic development of the host. Indeed, conventionalization of germ-free mice increases about 57% the total body fat and increases insulin resistance[21]. Furthermore, *ob/ob* mice and obese humans displayed an increased ratio *Firmicutes*-to-*Bacteroidetes* compared to lean individuals, suggesting an obese-leading gut dysbiosis[22]. Th s is consistent with a recent case report showing obesity development in a woman after faecal microbial transplantation from a pre-obese subject[23]. Faecal transfer from obese mice to germ-free mice also increased adiposity of recipients compared to faecal transfer from lean mice to germ-free mice[22]. Regarding BPA exposure, a role in dysbiosis-induced obesity could exist since perinatal exposure not only affects the immune system but also the gut microbiome in adult life[24,25]. The microbiota plays also a major role in inflammation because of its tight relationship with immune system development and maturation[26]. However, reports on BPA effects analysed these parameters separately or together through transversal studies in adults, i.e., without chronological consideration. It should be hypothesized that a possible multi-effect of BPA on immune system development, gut microbiota and obesity may be sequential with immune system dysregulation and/or intestinal dysbiosis preceding the BPA-related obesogenic effects. To this purpose, we performed a longitudinal study in mice aimed at investigating the immunologic, microbial and metabolic parameters from early adulthood ((Postnatal day (PND) 45) until ageing (PND170) after perinatal exposure to BPA.

Results

Perinatal exposure to BPA contributes to obese phenotype and metabolic disorders at adulthood. We studied fi st the effect of perinatal exposure to BPA on body weight under normal diet (Fig. 1a). We noted that at early life (PND25), mice perinatally exposed to BPA (BPA off pring) were signifi antly leaner than vehicle off pring mice, associated with a decrease of gWAT at PND45 in BPA off pring. However, from PND70 until PND170, BPA off pring exhibited a signifi ant rise in weight gain compared to vehicle off pring. Although perinatal exposure to BPA increased the body weight of mice, it did not change the food intake (Fig. 1a). The weight gain in BPA off pring was associated with an increase of gWAT weight at PND170, which was not observed at PND45 (Fig. 1b).

At PND35, BPA off pring developed fi st signifi ant glucose intolerance (Fig. 1c). The disturbance in glucose tolerance was followed by a decrease of the insulin sensitivity at PND125. We also observed a decrease of the Quantitative Insulin Sensitivity Check Index (QUICKI) in these animals at PND160. However, no signifi ant differences on inflammatory cytokines TNF-α and IFN-γ level were detected in the pancreas between the two groups regardless of age of mice (Fig. 2a). We then determined the level of IL-17, IL-22, TNF-α and IFN-γ in liver. BPA perinatal exposure induced at PND45 hepatic inflammation in male off pring compared to vehicle group characterized by an increase of IL-17 and TNF-α levels, which returns to baseline at PND170 (Fig. 2b). A trend to increased IL-22 levels was observed at PND45 compared to vehicle off pring, and became signifi ant in later life at PND170. IFN-γ level did not change whatever the age of mice.

Therefore, we isolated macrophages from gWAT and discriminated M1 and M2 macrophages subsets (Fig. 3a,b). We found a significant increase of the percentage of inflammatory M1 macrophages in gWAT of BPA offspring at PND170, but not at PND45, relative to the control vehicle group, without changes in anti-inflammatory M2 macrophages frequency. Those results were validated by isotype control assessment (Supplementary Figure S1). Only the IL-17 expression was increased in gWAT of BPA off pring compared to the vehicle group (Fig. 3c), whereas all others tested genes were unaffected.

BPA perinatal exposure affect local and systemic immune response. Perinatal BPA induced a signifi ant drop of Th1 frequency in the *lamina propria* (LP) at PND45, associated to a trend to a decreased IFN-γ secretion after anti-CD3/CD28 *in vitro* re-stimulation compared to vehicle group (Fig. 4a). Moreover, the Th1 subsets signifi antly decreased in the LP of BPA off pring with no change in IL-17 secretion and Treg frequency, compared to vehicle group (Fig. 4b,c). On the other hand, we noticed a signifi ant increase of Th1 and Th17 subsets in association with IFN-γ and IL-17 secretion after *in vitro* re-stimulation of splenocytes from BPA off pring compared to vehicle group (Fig. 4a,b). No change was observed in Treg frequency in this compartment (Fig. 4c).

At PND170, in the LP of BPA offspring, we observed a significant decrease of Th1 subset frequency associated with an increase of Treg and no change in Th17 cell frequency or IL-17/IFN-γ productions in response to CD3/CD28 (Fig. 4d,e,f). Furthermore, we found a signifi ant decrease of Th1 frequency in splenocytes from BPA off pring, without association with IFN-γ level (Fig. 4d). Treg and Th17 frequencies did not change in BPA off pring while the IL-17 level in systemic compartment was signifi antly higher at PND170 compared to vehicle group (Fig. 4e,f).

Perinatal exposure to BPA impairs local IgA production and antimicrobial activity in parallel to faecal dysbiosis. We then investigated the impact of perinatal exposure to BPA on intestinal barrier defences and its possible impact on the microbiota. We investigate fi st the IgA secretion and the analysis of pIgR level in faeces. pIgR performs the transfer of IgA to the lumen from gut mucosa[27]. We observed a decrease in IgA production

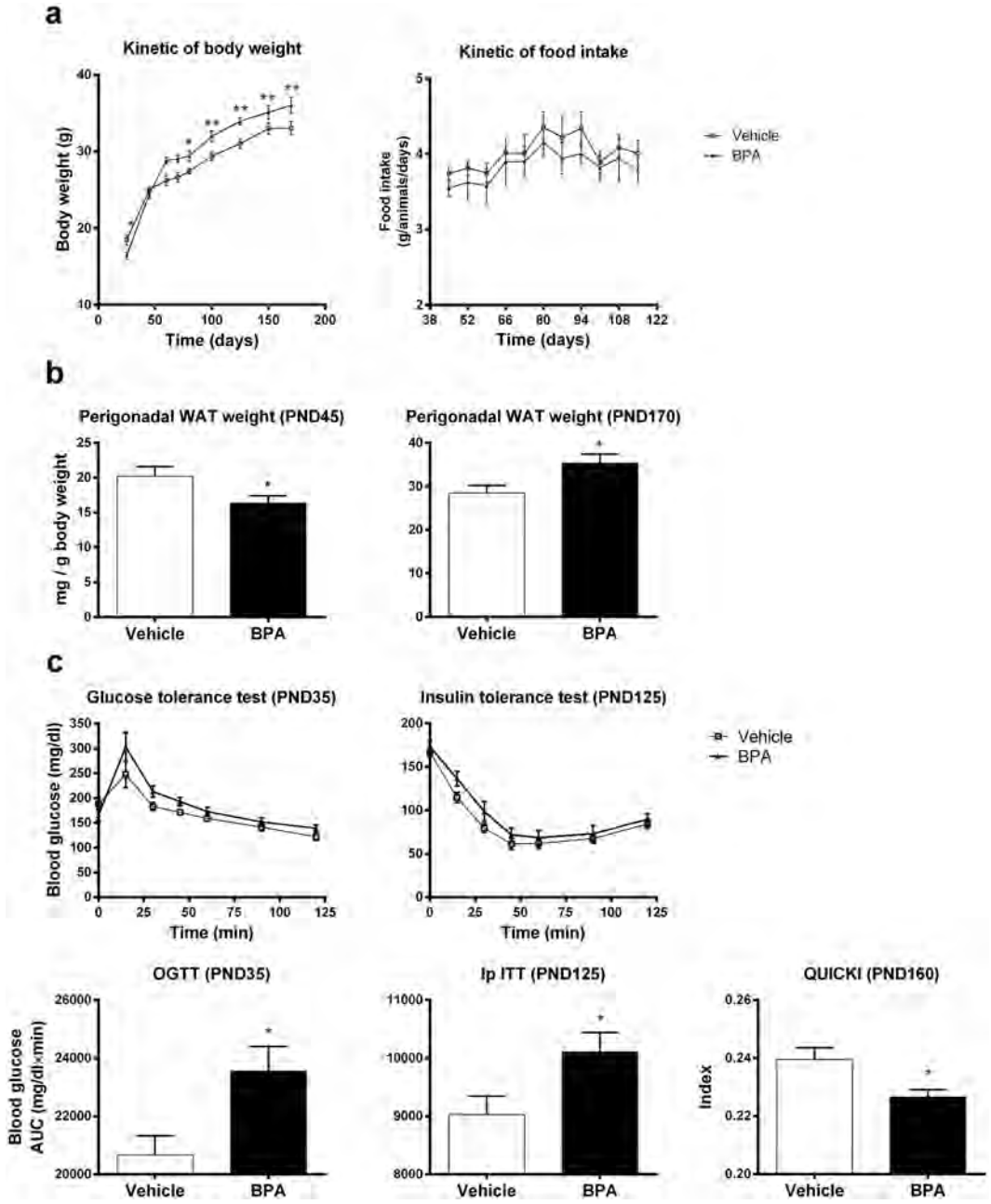


Figure 1. Perinatal exposure to BPA provokes metabolic disorders in off pring male mice. (**a**) Body weight of BPA and vehicle mice was measured from PND21 to PND170. (**b**) Perigonadal WAT weight of BPA and vehicle off pring was determined at PND45 and PND170. (**c**) Glucose and insulin tolerance tests were performed at PND35 and 125 respectively. The Quantitative Insulin Sensitivity Check Index (QUICKI) was calculated at PND160. Data represent the mean ± s.e.m. (n = 10–16). Data were representative from two batches of experiments. *P < 0.05, **P < 0.01, vs. non-exposed group using a Mann-Whitney's post-hoc analysis.

at PND45 in faeces of BPA off pring compared to vehicle group. Th s decrease was associated with a default of pIgR production, which was found restored at PND170 (Fig. 5a). Since IgA are important for the gut barrier integrity and the homeostasis between host and gut microbiota, we then determined the faecal antimicrobial activity against commensal *Escherichia coli* (*E. coli)* (Fig. 5b). Faecal supernatant of BPA mice allowed more *E. coli* colony formation than faecal supernatant of vehicle mice at PND45 and PND170, meaning that faecal antimicrobial activity against commensal *E. coli* is decreased in these animals. We also observed a signifi ant decrease in the faecal lysozyme activity against peptidoglycan in BPA off pring at PND170, and a strong trend to the decrease at PND45, compared to vehicle group. Those effects occurred without any change in intestinal permeability (Supplementary Figure S2).

We further study whether the BPA-mediated changes in antimicrobial activity could affect the gut microbiota. Score plot shows a clear separation between the microbial profiles of mice according to perinatal intervention both at PND45 and PND170 (Fig. 6a). Among the targeted microbial communities, *Bifidobacterium spp*. was the

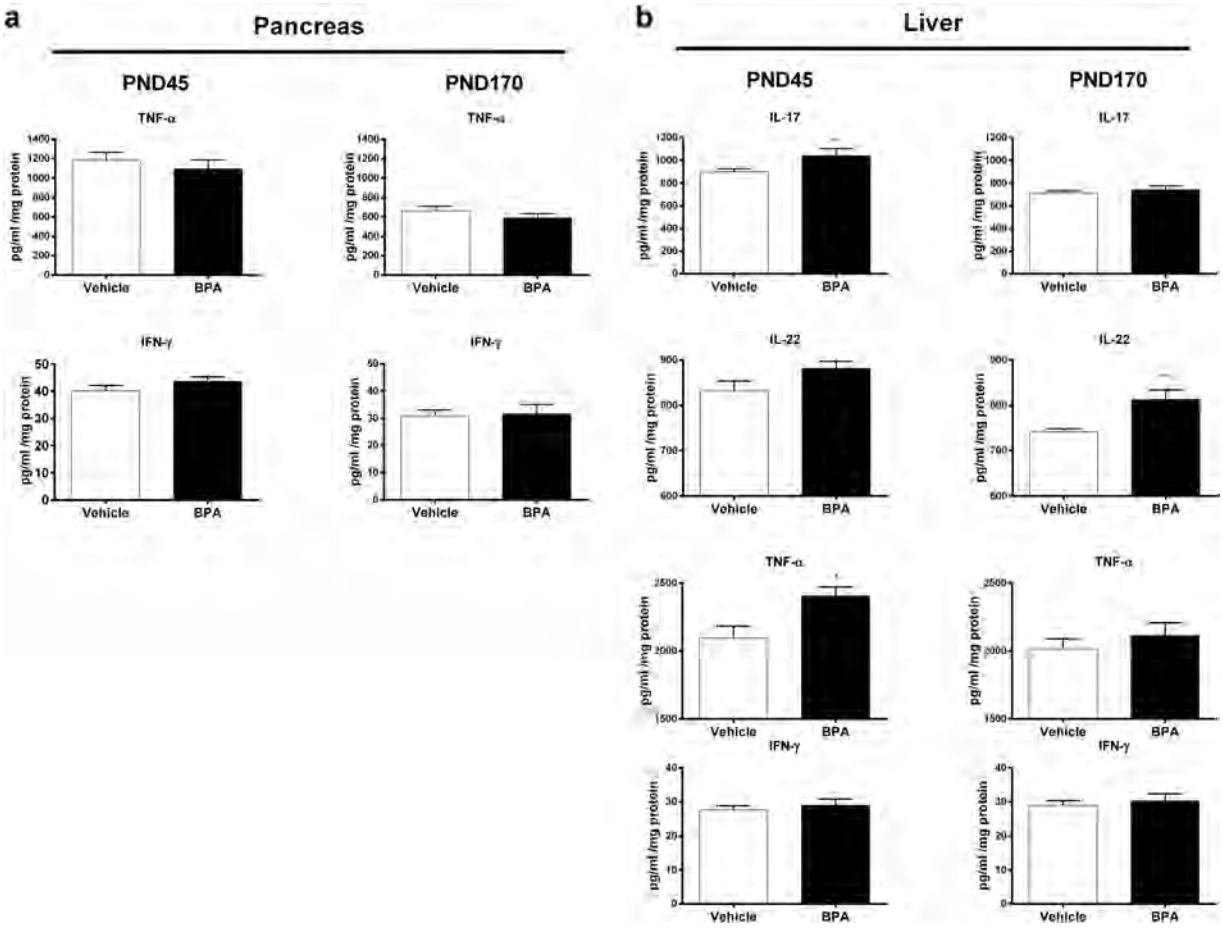


Figure 2. The metabolic disorders due to BPA is associated with liver but not with pancreas inflammation. At PND45 and PND170, cytokine levels were determined in pancreas (TNF-α and IFN-γ) (**a**) and in liver (IL-17, IL-22, TNF-α and IFN-γ) (**b**) of BPA and vehicle exposed off pring. Data represent the mean ± s.e.m. (n = 10–16). Data were representative from two batches of experiments. *P < 0.05, **P < 0.01, vs. non-exposed group using a Mann-Whitney's post-hoc analysis.

most important contributor to the observed differences at PND45 (Fig. 6b). We reported a signifi ant decrease of bifid bacteria in BPA off pring at PND45 compared to vehicle group (Fig. 6c). We further observed the decline in bifid bacteria at PND170 in BPA off pring associated to a signifi ant drop in the phylum of Firmicutes, among which more precisely the relative abundances of *Clostridium butyricum* and *Clostridium Cluster XIVa* were signifi antly affected (Fig. 6b,c).

Discussion

The obesogenic effect of the chemical BPA for humans is still under debate while animal studies commonly reported correlation between perinatal exposure to BPA and metabolic disorders throughout life. However, the mechanisms by which BPA exposure leads to diabetes and obesity are not understood yet. Recent data suggested that the immune system, by promoting inflammation, is closely linked to metabolic diseases and obesity developments[14–16]. These observations of a close relationship between immune and metabolic status lead to an emerging field of research named "immunometabolism"[28]. It became clear that low-grade inflammation is a key feature of obesity and T2D by the fact that the excess of pro-inflammatory cytokines impairs cellular insulin signalling[29–34]. Both innate and adaptive immune cells contribute to metabolic disorders. In the gut, $CD4^+$ T cells contribute to immunity by differentiating into various subsets, notably inflammatory (Th17 Th1) and regulatory cells (Treg), Th17 cells being the most abundant $CD4^+$ T cells in mucosal tissues[35–37]. They secrete isoforms of IL-17 and/or IL-22, which confer protection against fungi and pathogenic bacteria. BPA's role in the occurrence of metabolic disorders associated with inflammation remains unclear while a consensus exists that the perinatal period is a critical window for BPA exposure imprinting immune system development and function for life[8,9,18–20]. The gut microbiota plays also a crucial role in the development of obesity and diabetes, and its relationship with the immune system makes it a great point of interest. Moreover, it is admitted that male mice are more affected by diabetes and obesity than in females[38,39]. In this report, we performed a longitudinal study of male mice perinatally-exposed to BPA to better understand the chronological order of appearance of immunologic, microbial and metabolic disturbances at adulthood (PND45) and at ageing (PND170).

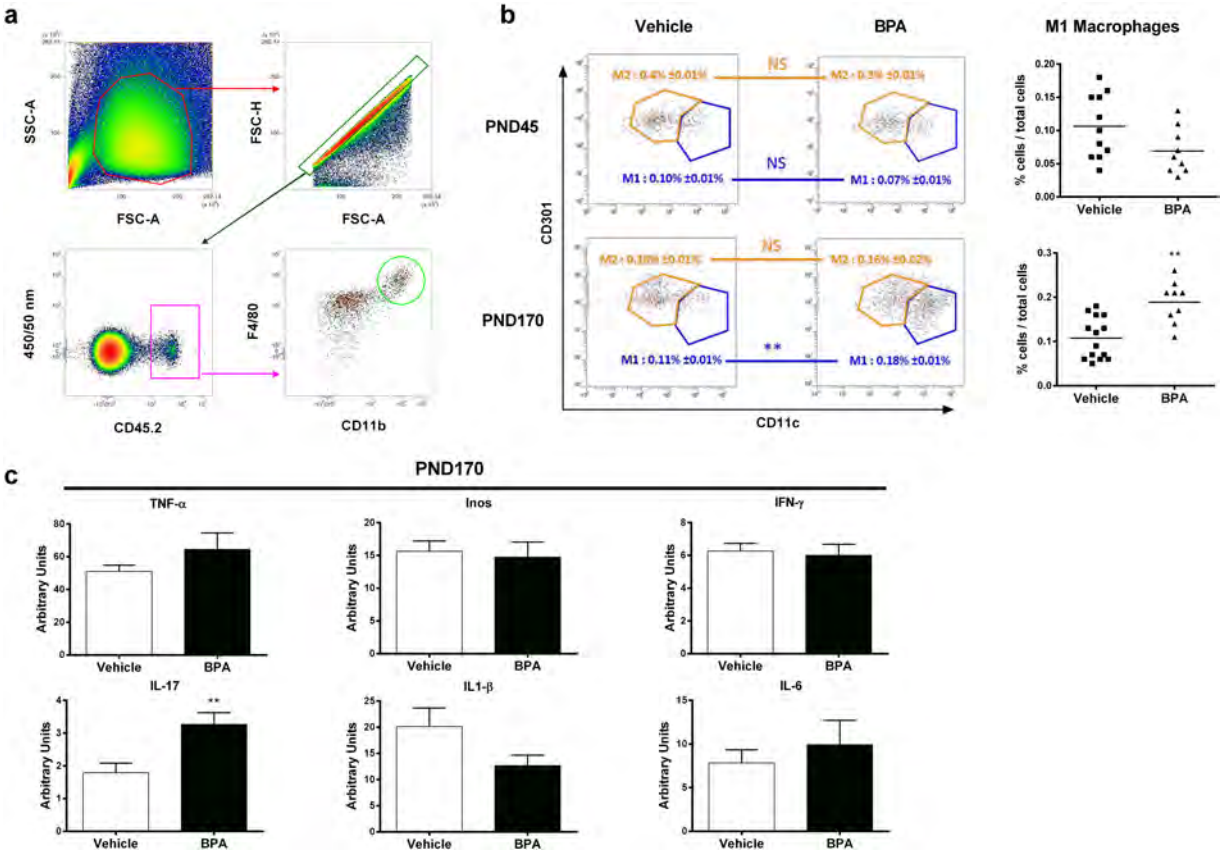


Figure 3. Perinatal exposure to BPA induces inflammated-M1 deviation in gonadal WAT associated with IL-17 inflammation. (**a**) Gating strategies for perigonadal WAT macrophages (**b**) M1 and M2 macrophages were phenotypically characterized from CD45.2$^+$ F4/80$^+$ CD11b$^+$ cells in perigonadal WAT of BPA and vehicle-exposed off pring at PND45 and PND170. (**c**) TNF-α, Inos, IFN-γ, IL-17, IL1-β and IL-8 expression levels were determined in perigonadal WAT by RT-PCR at PND170. Data represent the mean ± s.e.m. (n = 10–16). Data were representative from two batches of experiments. **P < 0.01, vs. non-exposed group using a Mann-Whitney's post-hoc analysis.

Firstly, we confi med the obesogenic impact of *in utero* and early life exposure to BPA at a dose of 50 µg/kg body weight (BW)/day, which is 100 times below the current no observed adverse effect level (NOAEL, 5 mg/kg BW/day), in male mice. In our study, young mice perinatally exposed to BPA were leaner and exhibited less perigonadal WAT than vehicle off pring, which have been already reported in other studies[40,41]. However BPA mice recovered rapidly to a normal weight that drifted into an increased body and gWAT weight compared to vehicle off pring. Intolerance to glucose and decreased insulin sensitivity was observed in young and elder mice perinatally exposed to BPA. Indeed, the observed decrease QUICKI in BPA off pring at PND160 refl cts their greater insulin resistance[42]. Similar metabolic disorders have been described in BPA-exposed animals[8]. We could not associate this obese phenotype with pancreatic inflammation whatever the age of mice. Nevertheless, a recent study showed that BPA exposure is associated with an increase in pancreatic β-cell proliferation in early life but not at PND120; the authors explain that an excess of insulin signalling during early life may contribute to impaired glucose tolerance during adulthood[40]. Interestingly, we provide evidence that perinatal exposure to BPA leads to metabolic disorders and obese phenotype in association with gWAT inflammation *via* M1 macrophages infiltration in ageing off pring, as observed in obese humans[15,16]. Similar results were obtained in *ex vivo* culture of bone marrow differentiated macrophages from C57BL/6 mice and cultured in presence of BPA[43]. In our study, the M1 macrophages infiltration is associated with IL-17 overexpression in gWAT. Th s fi ding is concordant with studies showing tight correlation between IL-17 inflammation in WAT and obesity[44,45]. All these results confi m the obesogenic effect of perinatal exposure to BPA in off pring mice, with close characteristics to human obese phenotype, hence validate our *in vivo* model to study the chronological development of immune and gut microbiota imbalance associated with this phenotype.

In adult off pring (PND45), we showed that perinatal exposure to BPA provokes important local and systemic immune homeostasis disturbances associated with metabolic disorders, which precede the obese phenotype herein described in ageing off pring. In fact, adult BPA-exposed off pring mice displayed a lean phenotype without M1 infiltration in gWAT. However, this phenotype is associated with glucose intolerance and a systemic inflammation characterized by an increase of splenic Th1 and Th17 responses. These results are concordant with Luo *et al*. study that showed similar Th1/Th1 immune deviation in spleen of male and female mouse off pring perinatally exposed to BPA[46]. Moreover, we showed that BPA perinatal exposure leads to a loss of Th1/Th

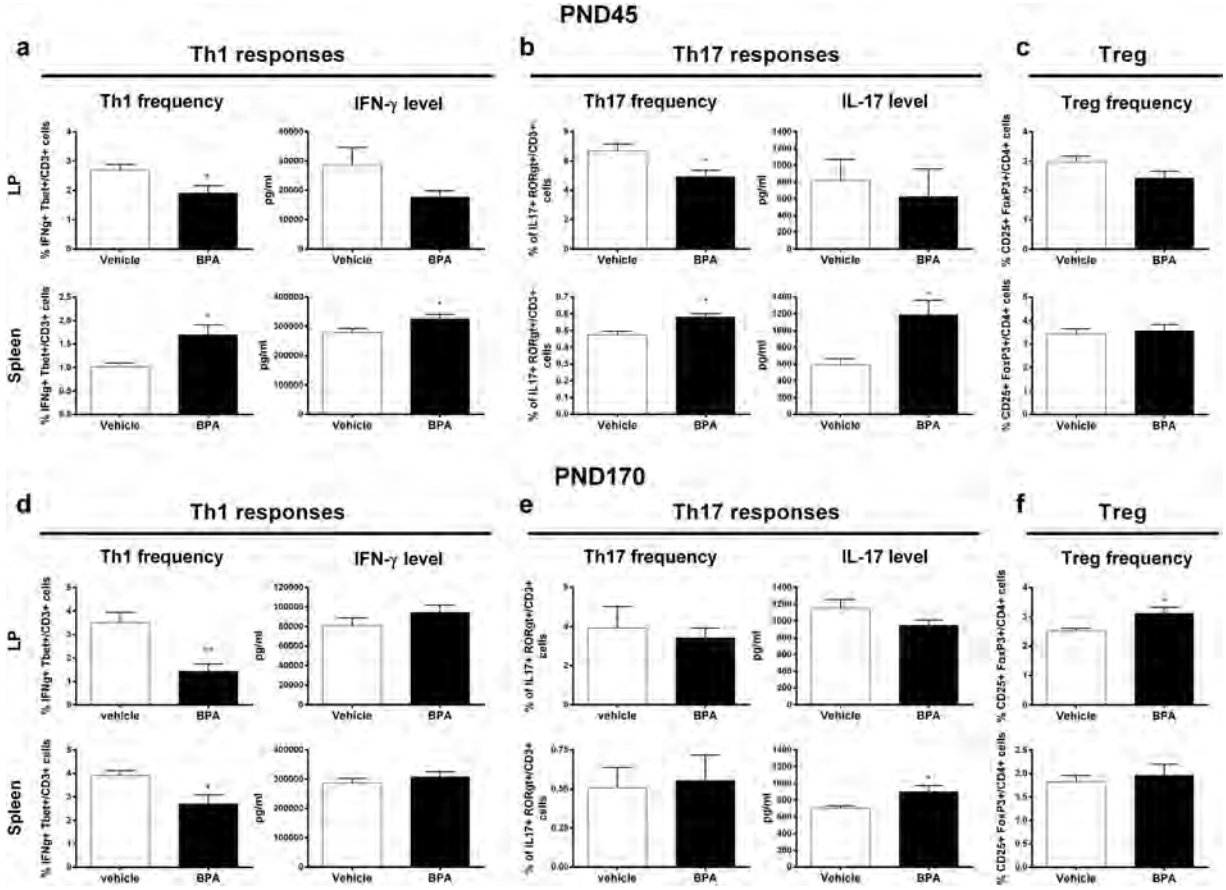


Figure 4. Perinatal BPA exposure disturbs the immune homeostasis in LP and spleen. Proportion of $CD3^+$ $Tbet^+$ IFN-γ^+ Th1 cells, $CD3^+$ RORγt^+ IL-17^+ Th17 cells and $CD4^+$ $CD25^+$ $FoxP3^+$ Treg cells in LP and spleen of BPA and vehicle exposed off pring at PND45 (**a**–**c**) and PND170 (**d**–**f**). IFN-γ and IL-17 levels measured at PND45 and PND170 in supernatant of isolated LP cells and splenocytes after 3 days of *in vitro* anti-CD3/CD28 stimulation. Data represent the mean ± s.e.m. (n = 8–16). Data were representative from two batches of experiments. $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, vs. non-exposed group using a Mann-Whitney's post-hoc analysis.

cell subsets from LP. Surprisingly, less pronounced immune homeostasis disturbances in intestinal and systemic compartments were observed in ageing BPA off pring. However, ageing BPA off pring conserved their increased production of IL-17 in spleen. Interestingly, recent publications showed similar features in mice fed with high-fat diet (HFD)[47,48]. Of note, Garidou *et al.* reported the HFD-derived ileum microbiota responsible for a decrease in Th17 cells of the LP. These authors concluded that the microbiota of the ileum can regulate Th17 cell homeostasis in the small intestine, hence determining the outcome of metabolic disease[47].

In our study, the BPA-evoked decrease of Th17 and Th1 responses in the small intestine is associated with intestinal dysbiosis at adulthood. Indeed, we demonstrated that perinatal exposure to BPA altered the gut microbiota development in off pring mice, characterized notably by a decrease of bifid bacteria. A causal link between gut dysbiosis and metabolic diseases has been well established in rodents as well as in humans through microbiota transfer experiments[22,23]. Of importance, some strains of the genus *Bifidobacterium* has been previously described to display anti-inflammatory properties[49]. Th s suggests that the BPA-induced decrease of this strain in off pring could contribute to the systemic inflammation observed from PND45. Consistent with this idea, specific strains of *bifid bacteria species* are used as promising anti-obesogenic probiotics and are reported to be decreased in mice that exhibited an obese phenotype after four weeks of HFD[50–52]. Furthermore, we observed an "obese like" gut dysbiosis characterized by a loss of *C. butyricum* and *C. Cluster XIVa* among Clostridia in addition to a decrease of *Bifidobacterium spp*., in ageing BPA off pring (i.e., PND170). Our results are concordant with Lai *et al.* study using direct BPA exposure protocol, and with the fact that T2D patients are also known to display low amounts of *Clostridia* compared to healthy individuals[24]. Moreover, in their study, Lai *et al.* described a similar gut dysbiosis between mice directly exposed to BPA and high-fat or high-sucrose diet mice[24]. Considering the results of our present study, we can hypothesize that microbial changes mainly characterized by the fall of bifid bacteria or/and the disturbance of intestinal immune homeostasis in young adult (i.e., PND45) is/are responsible of altered microbial pattern observed in ageing mice (i.e., PND170). The altered gut microbiota following perinatal BPA treatment could also result in a loss of intestinal defences. Indeed, we found a decrease of IgA production and of anti-microbial activity, especially of lysozyme activity, in faeces of adult mice. These animals also present less pIgR (i.e. the receptor that performs the transfer of IgA to the lumen from gut mucosa), which could explain the

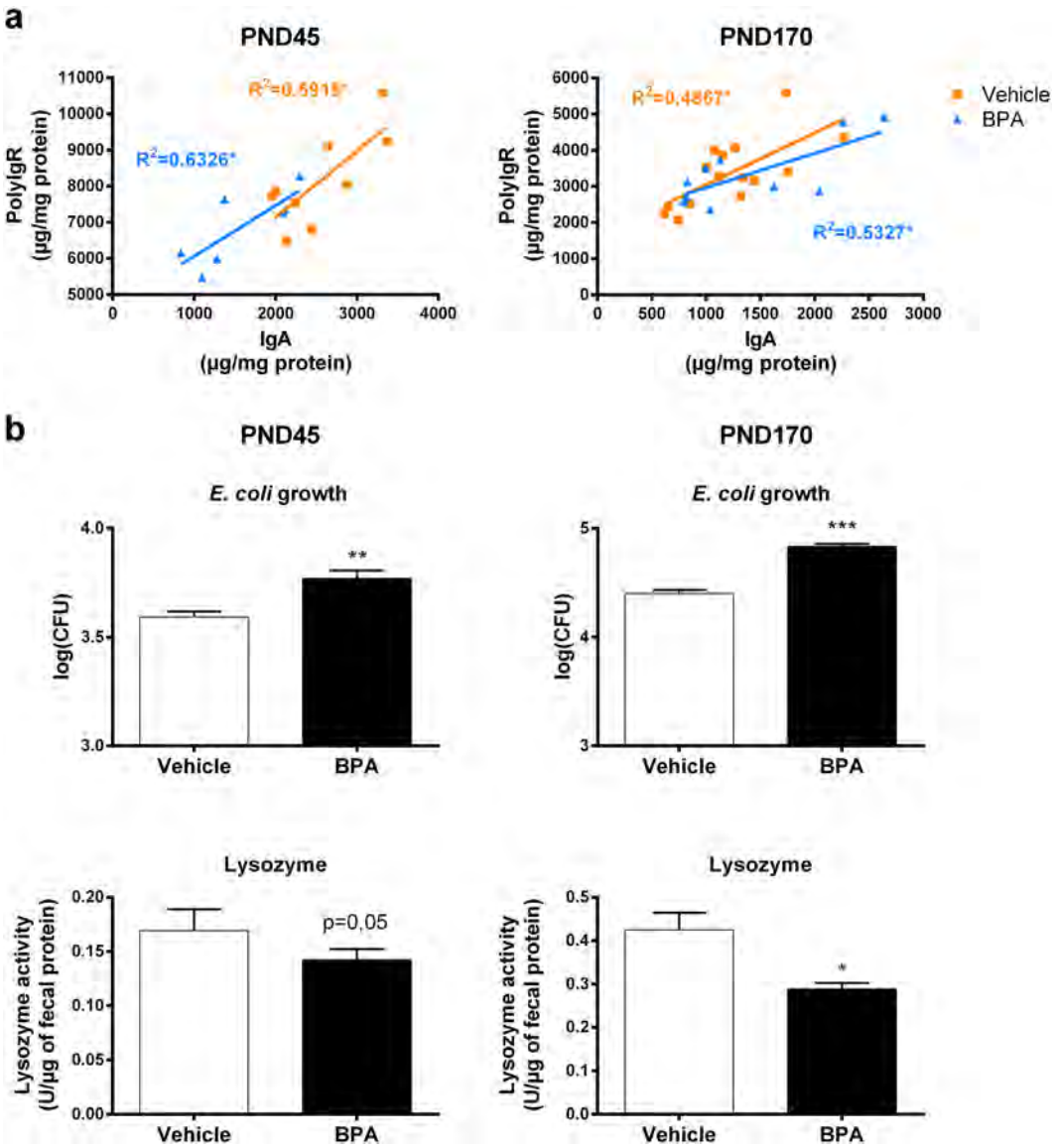


Figure 5. Perinatal exposure to BPA impairs local IgA production and antimicrobial activity leading to dysbiosis in faeces. (**a**) Faecal IgA and polyIgR levels were assessed and a linear regression has been made to correlate these two parameters in BPA and vehicle exposed off pring at PND45 and PND170. (**b**) Impact of 1 mg of faecal supernatant protein on commensal *E. coli* growth and lysozyme activity in faecal supernatant from BPA and vehicle exposed off pring at PND45 and PND170. Data represent the mean ± s.e.m. (n = 8–16). Data were representative from two batches of experiments. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 vs. non-exposed group using a Mann-Whitney's post-hoc analysis.

decrease of IgA levels in faeces. Therefore, the loss of IgA could lead to the dysbiosis observed in these individuals. Further investigations will be necessary to determine how BPA affects pIgR expression and gut defences.

In young adult (PND45) off pring perinatally exposed to BPA, a systemic inflammation is found associated with an increase of IL-17 and TNF-α level in the liver. Th s effect is not observed with ageing at PND170 in contrast to IL-22 liver content that signifi antly rose in aged mice only after BPA exposure. Interestingly, a similar cytokine profile has been reported in Non-Alcoholic-Steato Hepatitis (NASH) (i.e., a disease associated with obesity) with IL-17-driven liver inflammation[53]. In NASH, an increase of Th17 cells during the fi st step of disease (i.e., when the liver begins to be damaged) precedes infiltration of "hepatoprotective" IL-22 secreting cells, and a second expansion of Th17 cells[54–56]. In our study, one may hypothesized that IL-17 inflammation in the liver of BPA mice at PND45 may induce early tissue damages that lead to secondary IL-22 inflammation with ageing. Further investigations are needed to confi m this sequence of events.

To conclude, this study showed that mice exposed to BPA during the perinatal life displayed immune homeostasis disturbances in association with gut dysbiosis in early adulthood and altered glucose tolerance, and that these disturbances occurred before the development of obese phenotype with ageing. These fi dings permit a better understanding of the chronological events associated with the development of obese phenotype due to

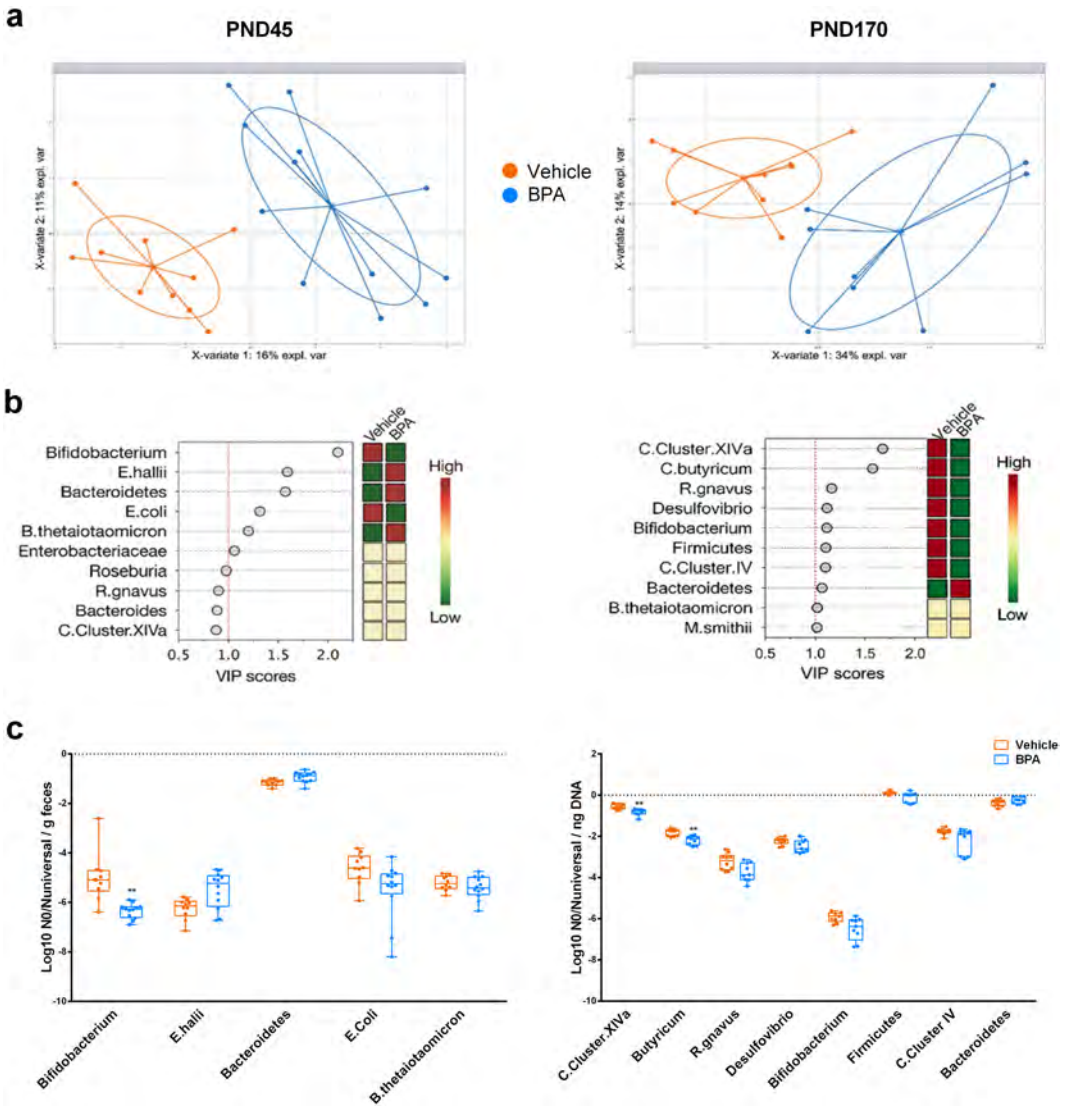


Figure 6. Faecal microbial alterations in response to perinatal exposure of BPA in mice off pring at PND45 and PND170. (**a**) PLS-DA score plots of the relative quantitative abundances (Log10 No) of twenty-two microbial taxa in faeces of BPA and vehicle off pring. (**b**) VIP plot representing the ten most discriminating features (microbial taxa) identifi d by PLS-DA build models at PND45 and PND170 (n = 9–10). (**c**) Relative abundances per ng DNA of microbial taxa with a VIP > 1 by real-time PCR. **P < 0.01, vs. non-exposed group using a Mann-Whitney's post-hoc analysis and adjustment using Benjamini-Hochberg's method.

BPA perinatal exposure. These data open new fi lds of studies to test whether early disturbances in immune system and gut microbiota related to perinatal exposure to BPA may be regarded as prognostic factors of metabolic disorder development.

Methods

Animals and treatments. All animals were kept at a constant temperature of 20 ± 1 °C, maintained on a 12-h light-dark cycle (lights on at 7:00 AM) and humidity-controlled facility, and housed in BPA-free polypropylene cages on corn pop bedding to avoid any cross-contamination by BPA[18]. Food (Harlan Global Rodent Diet 2018; Harlan Bioproducts, Gannat, France) and tap water (contained in polypropylene bottles) were available *ad libitum*.

Eight-week-old female and males C3H/HeN mice were purchased from Janvier (Saint Berthevin, France). After a week of acclimation, females were time-mated to eight-week-old males.

Gravid Mothers (n = 8–12 per group) from two independent series of experiments were daily treated orally from gestation day 15 to weaning of pups (PND21) with 50 µg/kg BW/d of BPA (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) or the vehicle alone (0,1% ethanol in corn oil) as control group. In this study, this period of exposure has been defi ed as perinatal period. After weaning, males from different mothers but with the same treatment were cohoused 5–6 per cage to limit litter effects and body weight and food intake were weekly

monitored for the duration of the study (i.e., until PND170). We will refer to these groups as BPA and vehicle off pring, respectively.

Ethics approval. All experiments were approved by the relevant Animal Care and Use Committee (CEEA-86, Ministry of Research and Higher Education, France); notifi ation TOXCOM/0114/LG EH, and conducted in accordance with the European directive 2010/63/UE.

Glucose and insulin tolerance tests. Oral glucose tolerance test (OGTT) and intra-peritoneal insulin test (IpITT) were performed for the vehicle and BPA group (n = 10–16 males) at PND35 and PND125 as previously described[57]. The Quantitative Insulin Sensitivity Check Index (QUICKI) was calculated at PND160 as previously described[42]. Briefly, fasting plasma insulin (I(0)) and glucose (G(0)) were measured for the two groups of mice. The QUICKI was then calculated using the equation QUICKI = 1/[log(I(0) + log (G(0))].

Anti-microbial activity against commensal *Escherichia coli* (*E. coli*). The anti-microbial activity was measured as previously described[58,59]. Briefly, PND45 and 170 faeces were weighed and ground in a volume of 20% ethanol equal to 10 fold the faeces weight for a better solvability of antimicrobial peptides. The mixture was centrifuged 10 min at 1600 × g at 4 °C and the supernatant was assessed for anti-microbial activity. Live *E. coli* were isolated from faeces of naïve healthy C3H/HeN mice by culture on selective ChromID coli plates (Biomérieux, Marcy L'étoile, France). Grown colonies belonged to B1 phylogenetic group. Further characterization of one representative isolate revealed to belong to the O18 serogroup and none of checked virulence genes was harbored (*lt, sTa, sTb, stx1, stx2, eae, hly, cnf, Afa, cdt, pks*). 10^5 colony forming units (CFU) of this commensal *E. coli* grown to mid-logarithmic phase were co-incubated with 1 mg of faecal material. The number of viable bacteria remaining after 2 h of incubation at 37 °C was analysed by plating serial dilutions on LB agar plates (BD, Le Pont De Claix, France). Results were representative from the antimicrobial activity only against the commensal *E. coli*, since any bacterial growth was observed on LB agar when prepared faecal supernatants were plated alone (i.e. without commensal *E. coli*).

Lysozyme activity. Faecal proteins were mechanically extracted after rehydration of frozen faeces in 500 µl of PBS (10 mM; pH 7.2). After 10 minutes of centrifugation at 1600 g, supernatants were sterilized with a 0.22 µm filter and frozen (−80 °C). Faecal protein concentration was measured using BCA protein Assay kit, Uptima (Interchim, Montluçon, France). Activity of lysozyme against the peptidoglycan was determined using the EnzChek® Lysozyme Assay Kit (Molecular probes, life technology, St Aubin, France).

Faecal microbial communities assessment. Faeces of BPA and vehicle groups were collected and weighted at PND45 and 170 for microbial characterization.

In order to obtain a microbial pattern associated to BPA exposure, an adapted protocol of the GUt low-density array (GULDA) approach developed by Bergström *et al*. has been performed[60]. PCR conditions, primer sequences and concentrations were used as previously described[61]. The normalized No-values were reported per ng of DNA, log10-transformed and processed by MixOmics package (6.1.1 version) with RStudio software (1.0.44 version) to build a partial least-squares discriminant analysis (PLS-DA)[62]. Missing normalized No-values were reconstituted using the NIPALS algorithm and M-fold cross-validation was used to select the optimal number of latent variables for PLS-DA models with minimal error rate. Variable Importance in Projection (VIP, weighted sum of squares of the PLS loadings) scores were estimated and allowed to classify the microbial amplicon groups according to their explanatory power of class label (Y = mice treatments)[63].

Necropsy. Animals were weighed and sacrific d at PND45 or PND170. Spleen, *lamina propria* (LP) and gonadal WAT (gWAT) were stored at 4 °C in 0.9% saline until the end of sampling and quickly used for fl w cytometry or cytokine analysis. Pancreas and liver were frozen in liquid nitrogen and stored at −80 °C until cytokine assays.

Flow cytometry. Splenic cells were isolated through a 70 µm nylon mesh in PBS and 1% KnockOut Serum Replacement (Gibco, Lifetechnologies, Paisley, UK). Cells were pelleted by centrifugation at 500 × g for 10 min at 4 °C. Gonadal WATs were digested by type II collagenase (Sigma-Aldrich) in 1% BSA HBSS at 37 °C for 30 min. The mixture was filtered through a 100 µm mesh and cells were pelleted by centrifugation at 500 × g for 10 min at 4 °C. Small intestines were washed in cold PBS, cut into 0.5 cm pieces, incubated four times in 30 ml of PBS 3 mM EDTA (Sigma-Aldrich) for 10 min at 37 °C and digested in 20 ml of RPMI 1640 added with 20% FCS and 100 U/mL of collagenase (Sigma-Aldrich) for 40 min at 37 °C. LP cells were purifi d on a 40–80% Percoll gradient run for 15 min at 1800 × g at RT. All cells have been checked for viability by trypan blue staining. For Th17 and Th1 intracellular staining, cells were stimulated with a cocktail of phorbol 12-myristate 13-acetate (15 nM, Sigma) and ionomycin (1 µg/ml, Sigma) for 5 h at 37 °C. Brefeldin A (10 µg/ml; Sigma) was added for 2 h after PMA-ionomycin stimulation. Cells were then stained with antibodies to the following markers from BD (BD Biosciences, San Jose, CA, USA): anti-CD4 (GK1.5), anti-CD25 (PC61), anti-CD3 (145-2C11), anti-IFN-γ (XMG1.2), anti-Tbet (O4-46), anti-CD3 (145-2C11), anti-IL-17 (TC11-18H10), anti-RORγt (Q31-378), anti-CD11b (M1/70), anti-CD45.2 (104) and anti-CD11c (HL3); and from Ebioscience (Ebioscience, Lutterworth, UK): anti-CD301 (11A10-B7), anti-F4/80 (BM8), anti-FoxP3 (FJK-16s). Specific ty of each labelling was checked using specific isotype controls listed in Supplementary Table 1. The intracellular staining was realized by using a Cytofix/Cytoperm Kit Plus (BD) according to the manufacturer's instructions. Flow cytometry data were collected on MACSQuant Analyzer 10 (Miltenyi Biotec, San Diego, CA, USA). Data were analysed using VenturiOne (AppliedCytometry, Sacramento, CA, USA) software. Lymphocytes or macrophages were selected by side scatter (SSC) and forward scatter (FSC) gating to avoid debris and dead cells. Forward scatter area (FSC-A) and height (FSC-H) gating was

then used to avoid cell aggregates. After this selection, percentage of specific cells were analysed for their specific markers.

Cytokine, and IgA assays. Cytokines were measured in supernatant of primary cell cultures of spleen and LP after 3 days of CD3/CD28 *in vitro* re-stimulation. IFN-γ and IL-17 concentrations in supernatant were assessed by a commercial ELISA kit (Duoset R&D Systems, Lille, France) following the manufacturer's instructions. Frozen pancreas and liver were suspended in RIPA buffer (0.5% deoxycholate, 0.1% SDS, and 1% Igepal in TBS) containing complete antiprotease cocktail (Roche, Boulogne-Billancourt, France), ground and protein concentrations in the supernatant were measured by using BCA optima kit (Interchim, Montluçon, France). TNFα, IFN-γ, IL-22 and IL-17 concentrations in pancreas and liver were assessed with a commercial ELISA kit (Duoset R&D Systems) following the manufacturer's instructions and expressed in picograms per milligram of protein, knowing that 1 mg was loaded per well.

For faecal IgA and polymeric immunoglobulin receptor (pIgR) assays, faecal proteins were extracted mechanically in complete antiprotease cocktail (Roche) and frozen at −80 °C. IgA and pIgR concentrations were measured as described previously with sheep anti-mouse IgA (Sigma) or for coating and horseradish-peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-mouse IgA (Sigma) for revelation[64].

Gene expression in gWAT. The real-time PCR was performed in a fi al volume of 20 µl containing 5 µl of diluted RT reaction medium, 15 µl of reaction buffer from the MESA Blue qPCR, MasterMix Plus SYBR Assay (Eurogentec, Seraing, Belgium), and the specific forward and reverse primers listed in Supplementary Table 2. For assessment of PCR effici cy, a serial dilutions curve was generated. The PCR effici cy with all primer pairs was >90%. Each assay was performed in duplicate, and the specific ty of PCR reaction was assessed by evaluation of the melting curve of the PCR products. The relative expression level of the target genes was calculated by the ΔCt method ($2^{-\Delta Ct}$) and were normalized to the expression of Hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT).

Statistical analysis. Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism 4 software (GraphPad, San Diego, CA, USA). The results were expressed as means ± s.e.m. Comparison of means was performed using nonparametric Mann-Whitney tests. The P-values of faecal microbiota results were adjusted using the Benjamini-Hochberg's method. Values of $P < 0.05$ were considered signifi ant.

References

1. WHO's media centre, Obesity and overweight. *WHO's fact sheet 2016*. http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/ (2016).
2. Darbre, P. D. Endocrine Disruptors andObesity. *Curr. Obes. Rep*., https://doi.org/10.1007/s13679-017-0240-4 (2017).
3. Newbold, R. R. Impact of environmental endocrine disrupting chemicals on the development of obesity. *Horm. Athens Greece* **9**, 206–217 (2010).
4. Bagchi, D. & Preuss, H. G. *Obesity epidemiology, pathophysiology, and prevention*. (CRC Press, 2013).
5. Trasande, L., Attina, T. M. & Blustein, J. Association Between Urinary Bisphenol A Concentration and Obesity Prevalence in Children and Adolescents. *JAMA* **308**, 1113 (2012).
6. Vandenberg, L. N. *et al*. Urinary, Circulating, and Tissue Biomonitoring Studies Indicate Widespread Exposure to Bisphenol A. *Environ. Health Perspect.* **118**, 1055–1070 (2010).
7. Calafat, A. M. *et al*. Urinary Concentrations of Bisphenol A and 4-Nonylphenol in a Human Reference Population. *Environ. Health Perspect.* **113**, 391–395 (2004).
8. Angle, B. M. *et al*. Metabolic disruption in male mice due to fetal exposure to low but not high doses of bisphenol A (BPA): Evidence for effects on body weight, food intake, adipocytes, leptin, adiponectin, insulin and glucose regulation. *Reprod. Toxicol.* **42**, 256–268 (2013).
9. van Esterik, J. C. J. *et al*. Programming of metabolic effects in C57BL/6JxFVB mice by exposure to bisphenol A during gestation and lactation. *Toxicology* **321**, 40–52 (2014).
10. Vom Saal, F. S., Nagel, S. C., Coe, B. L., Angle, B. M. & Taylor, J. A. The estrogenic endocrine disrupting chemical bisphenol A (BPA) and obesity. *Mol. Cell. Endocrinol.* **354**, 74–84 (2012).
11. Rubin, B. S. Bisphenol A: An endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **127**, 27–34 (2011).
12. Wang, T. *et al*. Urinary bisphenol A (BPA) concentration associates with obesity and insulin resistance. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **97**, E223–227 (2012).
13. Shankar, A. & Teppala, S. Relationship between urinary bisphenol A levels and diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **96**, 3822–3826 (2011).
14. Pereira, S. S. & Alvarez-Leite, J. I. Low-Grade Inflammation, Obesity, and Diabetes. *Curr. Obes. Rep.* **3**, 422–431 (2014).
15. Lumeng, C. N., Deyoung, S. M., Bodzin, J. L. & Saltiel, A. R. Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity. *Diabetes* **56**, 16–23 (2007).
16. Lumeng, C. N. & Saltiel, A. R. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *J. Clin. Invest.* **121**, 2111–2117 (2011).
17. Winer, S. *et al*. Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. *Nat. Med.* **15**, 921–929 (2009).
18. Menard, S. *et al*. Food intolerance at adulthood after perinatal exposure to the endocrine disruptor bisphenol A. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **28**, 4893–4900 (2014).
19. Ménard, S. *et al*. Perinatal exposure to a low dose of bisphenol A impaired systemic cellular immune response and predisposes young rats to intestinal parasitic infection. *PloS One* **9**, e112752 (2014).
20. Braniste, V. *et al*. Impact of oral bisphenol A at reference doses on intestinal barrier function and sex differences after perinatal exposure in rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 448–453 (2010).
21. Bäckhed, F. *et al*. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 15718–15723 (2004).
22. Turnbaugh, P. J. *et al*. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* **444**, 1027–1031 (2006).
23. Alang, N. & Kelly, C. R. Weight Gain After Fecal Microbiota Transplantation. *Open Forum Infect. Dis.* **2**, ofv004–ofv004 (2015).
24. Lai, K.-P., Chung, Y.-T., Li, R., Wan, H.-T. & Wong, C. K.-C. Bisphenol A alters gut microbiome: Comparative metagenomics analysis. *Environ. Pollut. Barking Essex 1987* **218**, 923–930 (2016).
25. Javurek, A. B. *et al*. Effects of exposure to bisphenol A and ethinyl estradiol on the gut microbiota of parents and their off pring in a rodent model. *Gut Microbes* **7**, 471–485 (2016).

26. Round, J. L. & Mazmanian, S. K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 313–323 (2009).
27. Kaetzel, C. S. & Mostov, K. Chapter 12 - Immunoglobulin Transport and the Polymeric Immunoglobulin Receptor A2 - Mestecky, Jiri. in *Mucosal Immunology (Third Edition)* (eds Lamm, M. E., McGhee, J. R., Bienenstock, J., Mayer, L. & Strober, W.) 211–VI, https://doi.org/10.1016/B978-012491543-5/50016-4 (Academic Press, 2005).
28. Mathis, D. & Shoelson, S. E. Immunometabolism: an emerging frontier. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 81 (2011).
29. Hotamisligil, G. S., Shargill, N. S. & Spiegelman, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* **259**, 87–91 (1993).
30. Hotamisligil, G. S. *et al*. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. *Science* **271**, 665–668 (1996).
31. Pickup, J. C. & Crook, M. A. Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system? *Diabetologia* **41**, 1241–1248 (1998).
32. Pradhan, A. D., Manson, J. E., Rifai, N., Buring, J. E. & Ridker, P. M. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA* **286**, 327–334 (2001).
33. Duncan, B. B. *et al*. Low-grade systemic inflammation and the development of type 2 diabetes: the atherosclerosis risk in communities study. *Diabetes* **52**, 1799–1805 (2003).
34. Weisberg, S. P. *et al*. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* **112**, 1796–1808 (2003).
35. Shale, M., Schiering, C. & Powrie, F. CD4(+) T-cell subsets in intestinal inflammation. *Immunol. Rev.* **252**, 164–182 (2013).
36. Bollrath, J. & Powrie, F. M. Controlling the frontier: regulatory T-cells and intestinal homeostasis. *Semin. Immunol.* **25**, 352–357 (2013).
37. Littman, D. R. & Rudensky, A. Y. Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation. *Cell* **140**, 845–858 (2010).
38. Hong, J., Stubbins, R. E., Smith, R. R., Harvey, A. E. & Núñez, N. P. Differential susceptibility to obesity between male, female and ovariectomized female mice. *Nutr. J.* **8**, 11 (2009).
39. Pettersson, U. S., Waldén, T. B., Carlsson, P.-O., Jansson, L. & Phillipson, M. Female Mice are Protected against High-Fat Diet Induced Metabolic Syndrome and Increase the Regulatory T Cell Population in Adipose Tissue. *PLoS ONE* **7**, e46057 (2012).
40. García-Arévalo, M. *et al*. Maternal Exposure to Bisphenol-A During Pregnancy Increases Pancreatic β-Cell Growth During Early Life in Male Mice Off pring. *Endocrinology* **157**, 4158–4171 (2016).
41. Veiga-Lopez, A. *et al*. Gender-Specific Effects on Gestational Length and Birth Weight by Early Pregnancy BPA Exposure. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **100**, E1394–E1403 (2015).
42. Katz, A. *et al*. Quantitative Insulin Sensitivity Check Index: A Simple, Accurate Method for Assessing Insulin Sensitivity In Humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **85**, 2402–2410 (2000).
43. Patel, B. B. *et al*. Chronic Exposure to Bisphenol A Reduces Successful Cardiac Remodeling After an Experimental Myocardial Infarction in Male C57bl/6n Mice. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* **146**, 101–115 (2015).
44. Ahmed, M. & Gaffen, S. L. IL-17 in obesity and adipogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* **21**, 449–453 (2010).
45. Qu, Y. *et al*. Interleukin-17A Differentially Induces Inflammatory and Metabolic Gene Expression in the Adipose Tissues of Lean and Obese Mice. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 522 (2016).
46. Luo, S. *et al*. Gestational and lactational exposure to low-dose bisphenol A increases Th17 cells in mice off pring. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **47**, 149–158 (2016).
47. Garidou, L. *et al*. The Gut Microbiota Regulates Intestinal CD4 T Cells Expressing RORγt and Controls Metabolic Disease. *Cell Metab.* **22**, 100–112 (2015).
48. Hong, C.-P. *et al*. Gut-specific Delivery of T-helper 17 Cells Reduces Obesity and Insulin Resistance in Mice. *Gastroenterology*, https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.02.016 (2017).
49. Khokhlova, E. V. *et al*. Anti-inflammatory properties of intestinal Bifi obacterium strains isolated from healthy infants: Anti-inflammatory effects of bifid bacteria. *Microbiol. Immunol.* **56**, 27–39 (2012).
50. Kobyliak, N. *et al*. Probiotics in prevention and treatment of obesity: a critical view. *Nutr. Metab*. **13** (2016).
51. Li, Z., Jin, H., Oh, S. Y. & Ji, G. E. Anti-obese effects of two Lactobacilli and two Bifid bacteria on ICR mice fed on a high fat diet. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **480**, 222–227 (2016).
52. Cani, P. D. *et al*. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* **56**, 1761–1772 (2007).
53. Tang, Y. *et al*. Interleukin-17 exacerbates hepatic steatosis and inflammation in non-alcoholic fatty liver disease. *Clin. Exp. Immunol.* **166**, 281–290 (2011).
54. Pan, C. *et al*. Role of Interleukin-22 in liver diseases. *Inflamm. Res.* **63**, 519–525 (2014).
55. Kong, X., Feng, D., Mathews, S. & Gao, B. Hepatoprotective and anti-fibrotic functions of interleukin-22: Therapeutic potential for the treatment of alcoholic liver disease: Therapeutic potential of interleukin-22. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **28**, 56–60 (2013).
56. Rolla, S. *et al*. The balance between IL-17 and IL-22 produced by liver-infiltrating T-helper cells critically controls NASH development in mice. *Clin. Sci. Lond. Engl. 1979* **130**, 193–203 (2016).
57. Benhamed, F. *et al*. The lipogenic transcription factor ChREBP dissociates hepatic steatosis from insulin resistance in mice and humans. *J. Clin. Invest.* **122**, 2176–2194 (2012).
58. Ménard, S. *et al*. Developmental switch of intestinal antimicrobial peptide expression. *J. Exp. Med.* **205**, 183–193 (2008).
59. Malaisé, Y. *et al*. Consequences of bisphenol a perinatal exposure on immune responses and gut barrier function in mice. *Arch. Toxicol*., https://doi.org/10.1007/s00204-017-2038-2 (2017).
60. Bergström, A. *et al*. Introducing GUt low-density array (GULDA): a validated approach for qPCR-based intestinal microbial community analysis. *FEMS Microbiol. Lett.* **337**, 38–47 (2012).
61. Yvon, S. *et al*. Donkey milk consumption exerts anti-inflammatory properties by normalizing antimicrobial peptides levels in Paneth's cells in a model of ileitis in mice. *Eur. J. Nutr*., https://doi.org/10.1007/s00394-016-1304-z (2016).
62. Rohart, F., Gautier, B., Singh, A. & Le Cao, K.-A. mixOmics: an R package for'omics feature selection and multiple data integration. *bioRxiv* https://doi.org/10.1101/108597.
63. Tenenhaus, M. *La régression PLS: théorie et pratique*. (Editions Technip, 1998).
64. Verdier, J. *et al*. Specific IgG response against Mycobacterium avium paratuberculosis in children and adults with Crohn's disease. *PloS One* **8**, e62780 (2013).

Acknowledgements

Th s work was supported by grant ANR-10-CESA-005 from the Agence Nationale de la recherche, (France), grant EST-2015/1/026 from Agence Nationale de Sécurité Sanitaire, de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail (ANSES), grant from AlimH from the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) and grant from the Region of Midi-Pyrénées. We thank Claire Naylies and Yannick Lippi for their contribution to Q-PCR data acquisition carried out at GeT-TRiX facility (TRanscriptomic impact of Xenobiotics, Genotoul, Toulouse). We thank Thie ry Gauthier for his contribution to fl w cytometry data acquisition carried out at M2C facility (Cytometry and Confocal Microscopy, Toulouse). Finally, we thank Dr H Guillou and Dr R Garcia-Villar for reviewing this manuscript.

Author Contributions

Y.M., S.M., L.L., I.C., M.O., E.H. and L.G.-P. designed the study. Y.M., C.C., E.G., F.L., C.L., C.H., N.G., L.L., I.C., M.O. and L.G.-P. conducted the experiments. Y.M., L.L., I.C., M.O. and L.G.-P. analysed the data. Y.M., M.O., E.H. and L.G.-P. wrote the paper.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at https://doi.org/10.1038/s41598-017-15196-w.

Competing Interests: The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

© The Author(s) 2017

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Gut dysbiosis and impairment of immune system homeostasis in perinatally-exposed mice to Bisphenol A precede obese phenotype development

Yann Malaisé[1], Sandrine Menard[2], Christel Cartier[1], Eric Gaultier[1], Frédéric Lasserre[3], Corinne Lencina[2], Cherryl Harkat[2], Nancy Geoffre[4], Laïla Lakhal[3], Isabelle Castan[4], Maïwenn Olier[2], Eric Houdeau[1*] & Laurence Guzylack-Piriou [1*]

[1] Intestinal Development, Xenobiotics and ImmunoToxicology team, Toxalim (Research Centre in Food Toxicology), Université de Toulouse, INRA, ENVT, INP-Purpan, UPS, Toulouse, France

[2] Neuro-Gastroenterology and Nutrition team, Toxalim (Research Centre in Food Toxicology), Université de Toulouse, INRA, ENVT, INP-Purpan, UPS, Toulouse, France

[3] Integrative Toxicology and Metabolism team, Toxalim (Research Centre in Food Toxicology), Université de Toulouse, INRA, ENVT, INP-Purpan, UPS, Toulouse, France

[4] Adipocyte secretions, obesities and related diseases team, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Université Paul Sabatier (UPS), Unité Mixte de Recherche (UMR) 1048, Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires (I2MC), Toulouse, France

[*] **Corresponding authors:**
Intestinal Development, Xenobiotics and ImmunoToxicology team, Toxalim (Research Centre in Food Toxicology), Université de Toulouse, INRA, ENVT, INP-Purpan, UPS, Toulouse, France. 180, chemin de Tournefeuille - 31027 Toulouse - FRANCE

Email: laurence.guzylack@inra.fr; eric.houdeau@inra.fr

Supplementary Table 1. List of isotype controls used for surface and intracellular antigen staining, including provider and references.

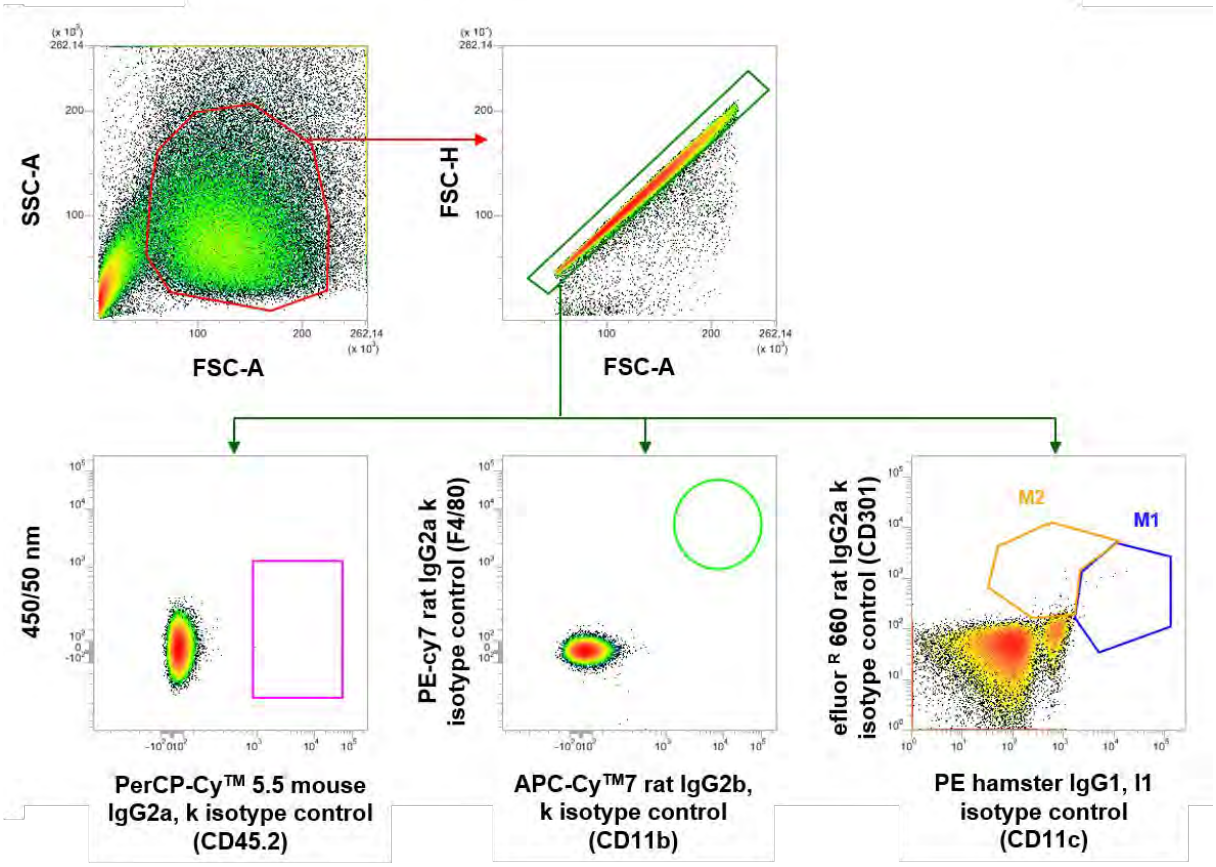
Antigen	Provider	Isotype control	References
CD4	BD Biosciences	PE rat IgG2a, κ isotype control	553989
CD25	BD Biosciences	PE-Cy7™ rat IgG1, λ isotype control	552869
CD3	BD Biosciences	FITC hamster IgG1, κ isotype control	553971
IFN-g	BD Biosciences	Alexa fluor 647 rat IgG1, κ isotype control	557731
T-bet	BD Biosciences	PE mouse IgG1, κ isotype control	556320
IL-17	BD Biosciences	Alexa fluor 647 rat IgG1, κ isotype control	557731
ROR-gt	BD Biosciences	Alexa fluor 647 rat IgG2a, κ isotype control	557715
CD11b	BD Biosciences	APC-Cy™7 rat IgG2b, κ isotype control	552773
CD45.2	BD Biosciences	PerCP-Cy™5.5 mouse IgG2a, κ isotype control	550927
CD11c	BD Biosciences	PE hamster IgG1, λ1 isotype control	553954
CD301	eBioscience	efluor ® 660 rat IgG2a κ isotype control	50-4321
F4/80	eBioscience	PE-cy7 rat IgG2a κ isotype control	25-432
FoxP3	eBioscience	efluor ® 660 rat IgG2a κ isotype control	50-4321

Supplementary Table 2. Forward and reverse primer sequences used for real time quantitative RT-PCR analysis.

Gene		Sequence
IFN-γ	Forward	GGAGGAACTGGCAAAAGGATGG
	Reverse	TGTTGCTGATGGCCTGATTGTC
IL-17	Forward	CAGCAGCGATCATCCCTCAA
	Reverse	TTTCCCTCCGCATTGACACA
IL-1β	Forward	CAACCAACAAGTGATATTCTCGATG
	Reverse	GATCCACACTCTCCAGCTGCA
IL-6	Forward	GCCCACCAAGAACGATAGTCA
	Reverse	CAAGAAGGCAACTGGATGGAA
Inos	Forward	CACCTTGGACTTCACCCAGT
	Reverse	ACCACTCGTACTTGGGATGT
TNF-α	Forward	TGGGACAGTGACCTGGACTGT
	Reverse	TTCGGAAAGCCCATTTGAGT
HPRT	Forward	TGGCCATCTGCCTAGTAAAGC
	Reverse	GGACGCAGCAACTGACATTTC

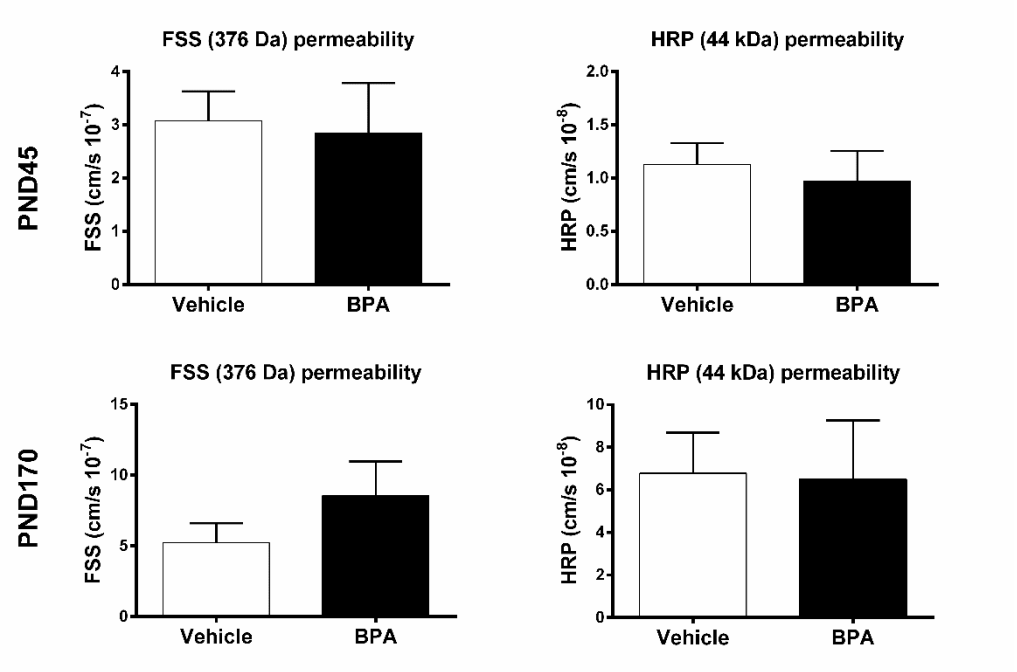
IFN-γ, Interferon-gamma; IL-17, Interleukin-17 ; IL-1β, Interleukin-1β ; IL-6, Interleukin-6 ; Inos, inducible Nitric oxide synthases ; TNF-α, Tumor necrosis factor-α ; HPRT, Hypoxanthine phosphoribosyltransferase

Supplementary Figure S1. Isotype controls for M1/M2 characterization by flow cytometry.



Isotype controls of Figure 3a and b.

Supplementary Figure S2. FSS and HRP permeability of jejunum from PND45 and PND170 male offspring mice.



Jejunal fragments from male offspring at PND45 and PND170 were mounted in Ussing chambers (Easy Mount, Physiologic Instruments) exposing a surface area measuring 0.1 cm^2. They were bathed on each side with 1 ml of oxygenated thermostated Kreb's solution (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Electrical parameters, including potential difference, short-circuit current (Isc) and total electrical resistance (R), were recorded at regular intervals during the 2-hour period of experimentation. Horseradish peroxidase (HRP 44kDa) (Sigma) transport was measured as an index of macromolecular permeability, and FSS (376Da) (Sigma) epithelial passage was measured as a marker of paracellular permeability to small molecules. After equilibration of electrical parameters, HRP was added to the mucosal compartment at a final concentration of 0.4 mg/ml, and FSS at a final concentration of 40g/ml. The two markers were applied simultaneously in the mucosal compartment. Epithelial permeability to total HRP was determined by an ELISA. Briefly, 96-wells flat-bottomed black plates (Greiner, Thermo Scientific, Dutcher, Brumath, France) were coated overnight at room temperature with 50µl of 10µg/ml mouse polyclonal to HRP (Abcam, Paris, France) in PBS. Plates were blocked with PBS-5% fetal bovine serum (FBS) before incubation with serosal compartments of Ussing chamber. Rabbit polyclonal anti HRP biotin (Abcam) was added at a concentration of 1.6 µg/ml before revelation with SPRD (SpectralRed conjugate) conjugated streptavidin (Southern Biotech) was added for 20 minutes and fluorescence intensity measured 565nm/666nm using an automatic Infinite M200 microplate reader (Tecan, Lyon, France). Epithelial permeability to FSS was determined by measuring the fluorescence intensity 485nm/525nm using an automatic Infinite M200 microplate reader (Tecan). Permeability was calculated as the ratio of flux/concentration, and expressed as cm/second.

Discussion générale

DISCUSSION GÉNÉRALE

Chez la souris, une exposition périnatale au BPA s'accompagne d'une variété d'impacts sur les réponses immunitaires intestinales et systémiques chez la descendance mâle et femelle. La caractérisation de ces effets chez la descendance femelle a été publiée dans Archives of Toxicology, alors que les impacts associés au développement de désordres métaboliques chez la descendance mâle a été l'objet d'une publication acceptée dans Scientific Reports.

Dans une première partie, les conséquences d'une telle exposition au BPA sur le système immunitaire intestinal et systémique de la descendance souris femelle seront abordés, avec la présentation d'éléments non publiés, apportant des précisions supplémentaires.

Dans une deuxième partie, j'aborderai les effets d'une exposition au BPA en période périnatale chez la descendance souris mâle, en présentant les impacts immunomodulateurs et révélateurs d'une dysbiose intestinale précédant puis accompagnant le développement de l'obésité et du T2D.

Dans une troisième partie, j'aborderai la problématique de l'effet sexe- et âge-dépendant ainsi que des périodes d'exposition périnatales (gestation et lactation) au BPA aboutissant à la dérégulation du système immunitaire et à l'apparition de désordres métaboliques.

Enfin, je présenterai des résultats préliminaires abordant les conséquences d'une exposition périnatale au BPS et BPF, analogues structuraux du BPA et potentiels substituts pour ses applications industrielles. Un regard critique sera apporté quant à leurs effets sur le système immunitaire intestinal et systémique de la descendance femelle souris, en comparaison avec le produit mère. De plus, les premiers résultats d'une étude *in vitro* des effets du BPS et BPF, en comparaison au BPA, sur la différenciation des LT $CD4^+$ ainsi que sur l'activité d'AhR seront abordés.

1. Effets d'une exposition périnatale au BPA sur la réponse immunitaire intestinale et systémique chez la descendance femelle

1.1 Effets sur l'intégrité de la barrière intestinale

La barrière intestinale représente l'une des principales surfaces d'échange entre le milieu extérieur et l'organisme de l'hôte. Cette fonction de barrière biologique joue un rôle primordial pour la croissance et la santé de l'individu, en permettant l'absorption des nutriments tout en faisant barrière aux intrants potentiellement pathogènes ; en cela, la barrière intestinale participe à l'éducation du système immunitaire associé à l'intestin. En effet, l'épithélium intestinal produit différentes protéines servant à la régulation de l'homéostasie du microbiote intestinal et à la protection et au maintien de l'intégrité de la barrière intestinale. Parmi elles, on compte des protéines antimicrobiennes comme le lysozyme et les IgA. Nos résultats ont montré que l'exposition périnatale au BPA induit un défaut de la production et l'activité du lysozyme par les cellules de Paneth, menant à une diminution générale de l'activité antimicrobienne contre une *E.coli* commensale. Seule une publication relate un tel effet sur le taux de lysozyme sanguin après une forte exposition au BPA chez la carpe (Qiu et al., 2016). Le BPA peut donc avoir plusieurs actions potentielles menant à une diminution de la production de lysozyme : défaut d'expression génique du lysozyme, défaut de synthèse protéique et/ou augmentation de l'activité du protéasome. Nos résultats ont montré que l'exposition périnatale au BPA diminue la fluorescence spécifique du lysozyme en immunohistochimie de la descendance femelle, démontrant une diminution de la production protéique du lysozyme. Il aurait donc été intéressant d'observer l'expression génique en Q-PCR du lysozyme chez ces individus, afin de savoir si la diminution protéique a pour origine une modulation post-transcriptionnelle ou plus précoce. Le BPA peut également agir sur la différenciation des cellules de Paneth produisant le lysozyme. En effet, il a été démontré que l'exposition périnatale au BPA diminue la prolifération des cellules souches intestinales nécessaires au renouvellement de l'épithélium de l'intestin (Braniste et al., 2010). Enfin, le lysozyme n'est pas le seul peptide anti-microbien produit par les cellules de Paneth et il serait également judicieux d'observer l'expression génique et protéique des défensines, de RegIIIγ et de la phospholipase A2 qui ciblent préférentiellement les bactéries gram-positives (défensines, RegIIIγ et phospholipase A2) et gram-négatives (défensines) (Abreu, 2010).

Au niveau des propriétés de protection de la barrière, nous avons également montré que le BPA après exposition périnatale diminue la sécrétion d'IgA dans la lumière intestinale. Cette

perte de sécrétion d'IgA peut être expliquée par la diminution de la fréquence des cellules productrices d'IgA dans la LP et dans le côlon. Malgré cela, la quantité d'IgA apparaît légèrement supérieure dans le côlon, laissant supposer un défaut de translocation des IgA vers la lumière intestinale par le pIgR. Cependant, nous avons montré dans des résultats non publiés que la quantité de pIgR fécale n'était pas altérée significativement par une exposition périnatale au BPA, preuve que la translocation des IgA de l'intestin vers la lumière intestinale n'est pas impliquée dans la diminution des IgA fécales observée (Figure 30).

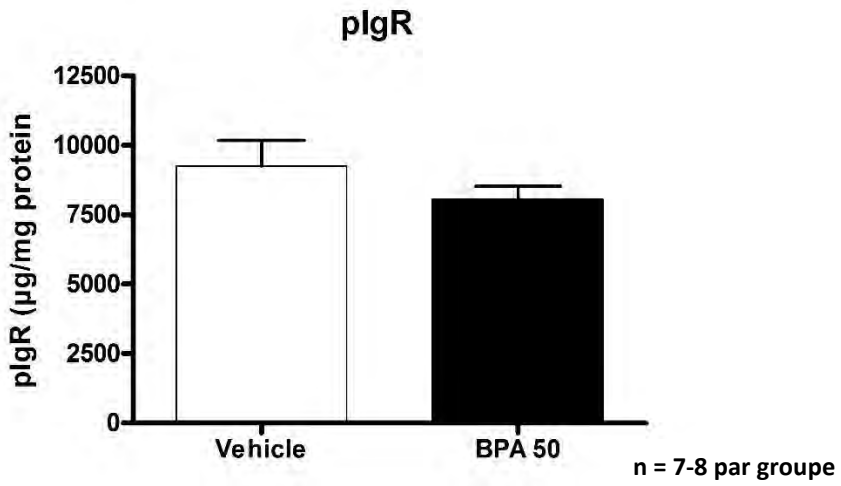


Figure 30 : Dosage ELISA du pIgR dans les fèces des souris exposées au BPA à 50 µg/kg de poids corporel/jour (barre noire) ou au solvant (barre blanche).

Ce défaut de sécrétion d'IgA et de cellules productrices d'IgA peut être la cause ou la conséquence d'une dysbiose intestinale (De Palma et al., 2010). Or, Javurek et al. ont montré une dysbiose intestinale chez la souris femelle âgée de 30 jours exposée de manière périnatale au BPA, caractérisée notamment par une augmentation des *Bacteroides*, des *Mollicutes*, des *Prevotellaceae*, des *Erysipelotichaceae*, des *Akkermansia*, des *Methanobrevibacte*, des *Sutterela* et des *Bifidobacteria*, sans différences sur la charge bactérienne totale (Javurek et al., 2016). Bien que les auteurs n'aient pas mesuré le taux d'IgA dans leur publication, nous avons observé, dans des analyses microbiologiques préliminaires non publiées, qu'une exposition périnatale au BPA tend à diminuer la quantité de bactéries coliformes et les entérobactéries ne métabolisant pas le lactose (lac^-) chez la descendance femelle dès le jour 21 post-natal, preuve d'un début de dysbiose intestinale chez ces individus (Figure 31).

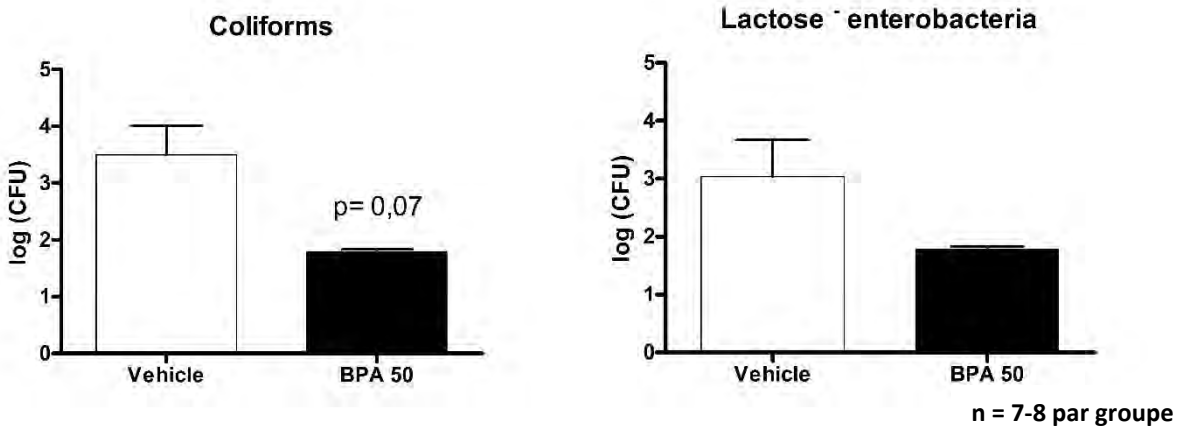


Figure 31 : Dénombrements bactériens sur ChromID (coliformes) et sur McConckey (entérobactéries lactose-) des fèces au jour 21 post-natal de la descendance femelle exposée au BPA à 50 µg/kg de poids corporel/jour (barres noires) ou au solvant (barres blanches).

Nous avons également observé une augmentation du niveau d'IFN-γ dans le côlon de la descendance BPA. Une augmentation d'IFN-γ dans le côlon est connu pour avoir des effets néfastes sur l'intégrité de la barrière intestinale et notamment sur la perméabilité intestinale (Ferrier et al., 2003). Un tel effet, bien que moins prononcé, est retrouvé dans nos résultats où l'exposition périnatale au BPA augmente la perméabilité intestinale para- et transcellulaire. L'IFN-γ est produit majoritairement par les Th1, les cellules NK et les macrophages. Il serait donc intéressant de déterminer la fréquence de chacune de ces populations immunitaires par cytométrie en flux afin de comprendre l'origine de la surproduction basale d'IFN-γ dans le côlon. Ces résultats réunis montrent que l'exposition périnatale au BPA diminue l'intégrité générale de la barrière intestinale chez la souris, comprenant les défenses et la protection de l'épithélium intestinal ainsi que la relation hôte-microbiote de l'intestin. De tels impacts, peuvent mener à une augmentation de la sensibilité aux infections bactériennes. De plus, la perméabilité intestinale diminuée permet à ces bactéries pathogènes ainsi que leurs endotoxines (toxines situées dans la membrane externe des bactéries gram-négatives) de pénétrer plus facilement dans la muqueuse intestinale par translocation bactérienne et rejoindre la circulation systémique, menant à une infection généralisée et à l'endotoxémie (Vaishnavi, 2013). Pour confirmer cette hypothèse, il serait intéressant de mesurer l'endotoxémie des souris femelles exposées de manière périnatale au BPA par rapport aux souris contrôles.

L'ensemble de ces résultats permet de mieux comprendre les mécanismes de la susceptibilité augmentée aux infections parasitaires et virales décrits dans notre équipe et dans la littérature (Menard et al., 2014a; Roy et al., 2012). En effet, une diminution des IgA, nécessaires à l'intégrité de la barrière, couplée à une perte d'activité de peptides anti-microbiens liées à une exposition périnatale au BPA, peuvent favoriser la prolifération de souches pathogènes, virales et parasitaires dans l'intestin. De plus, une augmentation de la perméabilité intestinale observée chez la descendance femelle BPA peut favoriser le passage et donc l'invasion des pathogènes dans les tissus locaux et systémiques.

1.2 Effets sur le système immunitaire intestinal et systémique

Les ILC3 jouent un rôle important dans la mise en place de la réponse innée contre le microbiote commensal et pour la formation de structures lymphoïdes secondaires comme les cryptopatches et les follicules lymphoïdes isolés (Eberl and Littman, 2003). Nous avons montré que l'exposition périnatale au BPA diminue la fréquence de cette sous-population cellulaire dans la LP des souris femelles et ce, de manière concomitante avec la diminution de la capacité migratoire et de présentation antigénique des DC et de leur fréquence dans les MLN. Ces évènements sont associés à des perturbations importantes de l'homéostasie du système immunitaire. En effet, nous avons observé une augmentation de la réponse pro-inflammatoire Th1 et Th17 au niveau intestinal et systémique chez la descendance BPA. De façon intéressante, il a été démontré que les ILC3 peuvent inhiber la différentiation des LT naïfs en Th17 selon un mécanisme AhR et microbiote-dépendant, impliquant les bactéries segmentées filamenteuses promotrices de la différentiation des LT en Th17 (Qiu et al., 2013). Il serait intéressant d'étudier l'implication de la chute des ILC3 chez la descendance femelle BPA aboutissant à ce défaut de différenciation.

Nous avons également observé que l'exposition périnatale au BPA diminue la fréquence des Treg au niveau local et systémique de façon comparable aux résultats de Ménard et al. (2014a, 2014b). Plusieurs explications sont possibles. Il est bien décrit que les DC qui migrent dans les MLN en provenance de la LP sont importants pour le développement des Treg cibles de l'intestin. Il a également été montré qu'une diminution des ILC3 peut limiter la différentiation des LT naïfs en Treg. Dans notre étude, nous observons ces deux perturbations, une diminution à la fois des DC migratoires dans les MLN et des ILC3 dans la LP. Une accumulation de ces deux mécanismes est très probable (Figure 32) mais il serait nécessaire

d'authentifier quelle voie est majoritaire pour mener aux effets observés. Les souris KO inductible pour CCR7 (*CCR7*$^{-/-}$) sont reconnues pour posséder une faible quantité de DC CD103^{+} dans les MLN, cellules responsables de la domiciliation des LT dans l'intestin. L'étude de cette lignée et celle de souris KO inductible pour les ILC3 (*Rorc(γt)*$^{-/-}$, *NKp46*$^{-/-}$) permettrait de mesurer le pourcentage d'implication des deux voies menant à la diminution des Treg intestinaux lors d'une exposition périnatale au BPA. Nous pourrions également effectuer des transferts d'ILC3 ou de DC migratoires purifiés de souris contrôles vers des souris BPA afin de voir s'il y a restauration des Treg intestinaux chez ces derniers. De plus, il serait intéressant d'observer par histologie si la diminution des ILC3 chez la descendance BPA se répercute par des défauts dans la formation et le nombre de cryptopatches et de follicules lymphoïdes isolés dans l'intestin à la période pré-sevrage (entre le jour 0 et 21).

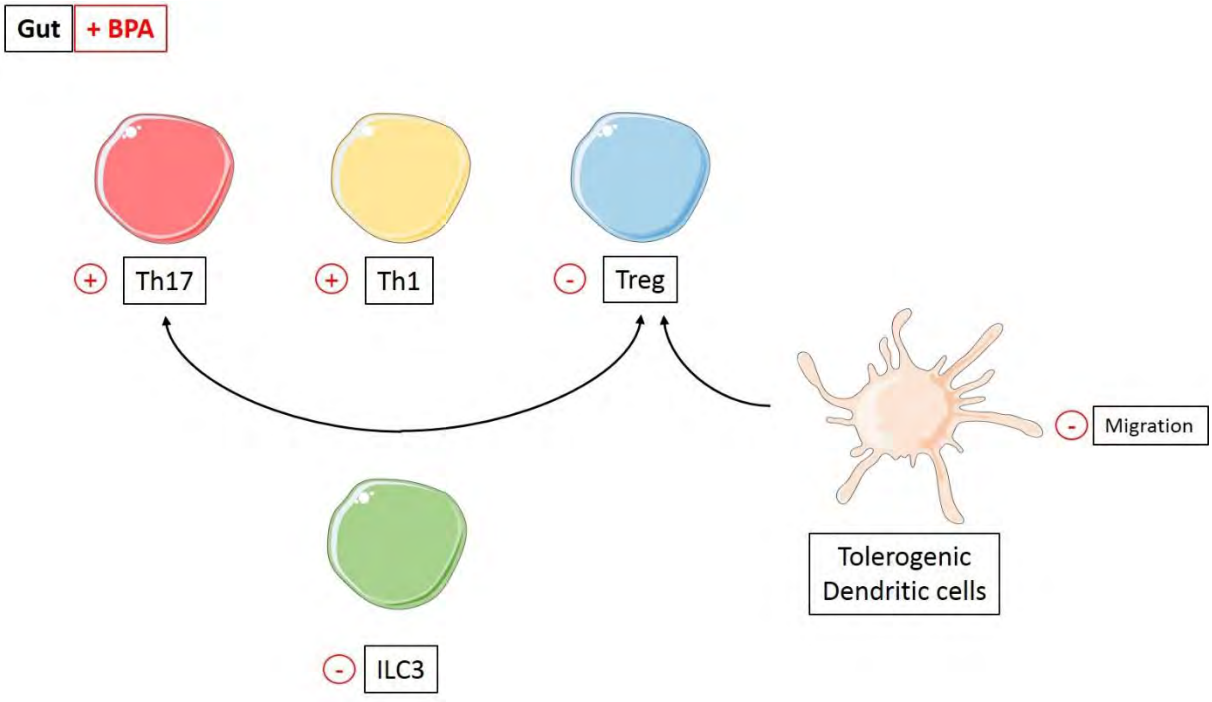


Figure 32 : Schéma représentant les impacts de l'exposition périnatale au BPA sur le système immunitaire chez la descendance femelle.

Nous avons également observé une diminution des IgG dirigés contre les *E.coli* commensaux dans le sang de la descendance exposée de manière périnatale au BPA. Il a été démontré qu'une diminution d'ILC3 est associée avec une dérégulation de la réponse adaptative

en particulier contre les bactéries commensales (Hepworth et al., 2013). En effet, ces auteurs observent que les ILC3 expriment le MHCII, leur conférant une capacité de présentation antigénique spécifique entrant en compétition avec la réponse des LT contre les bactéries commensales. Une diminution de la fréquence des ILC3, que nous avons mis en évidence dans notre étude, ou une diminution de l'expression de MHCII par les ILC3 peut donc expliquer l'augmentation des IgG spécifiques *E.coli* commensales dans le sang de la descendance BPA que nous observons et qui serait induit par l'augmentation des Th17 spécifiques des *E.coli* commensales (Figure 33, hypothèse 1).

D'autre part, le développement de la réponse immunitaire adaptative nécessite la présentation des antigènes commensaux ou étrangers par les DC. Afin de maintenir l'homéostasie, la stimulation des LT par les DC permet leur différenciation en Treg, importants pour la mise en place de la tolérance contre le microbiote commensal. Les DC de la descendance BPA présentent des défauts dans la présentation antigénique (diminution des marqueurs de maturation MHCII et CD86) ce qui peut aboutir à un défaut de présentation des *E.coli* commensales, et ainsi contribuer à un défaut de différenciation des Treg spécifiques des *E.coli* commensales. Une diminution de la réponse tolérogène entraîne la mise en place d'une réponse de défense et donc l'augmentation de la production d'IgG anti-*E.coli* dans le sang (Figure 33, hypothèse 2). Pour confirmer ces hypothèses, il serait intéressant de tester la prolifération ainsi que la réponse cytokinique produite par des LT spécifiques des *E.coli* commensales chez les souris traitées de manière périnatale au BPA comparées aux animaux contrôles.

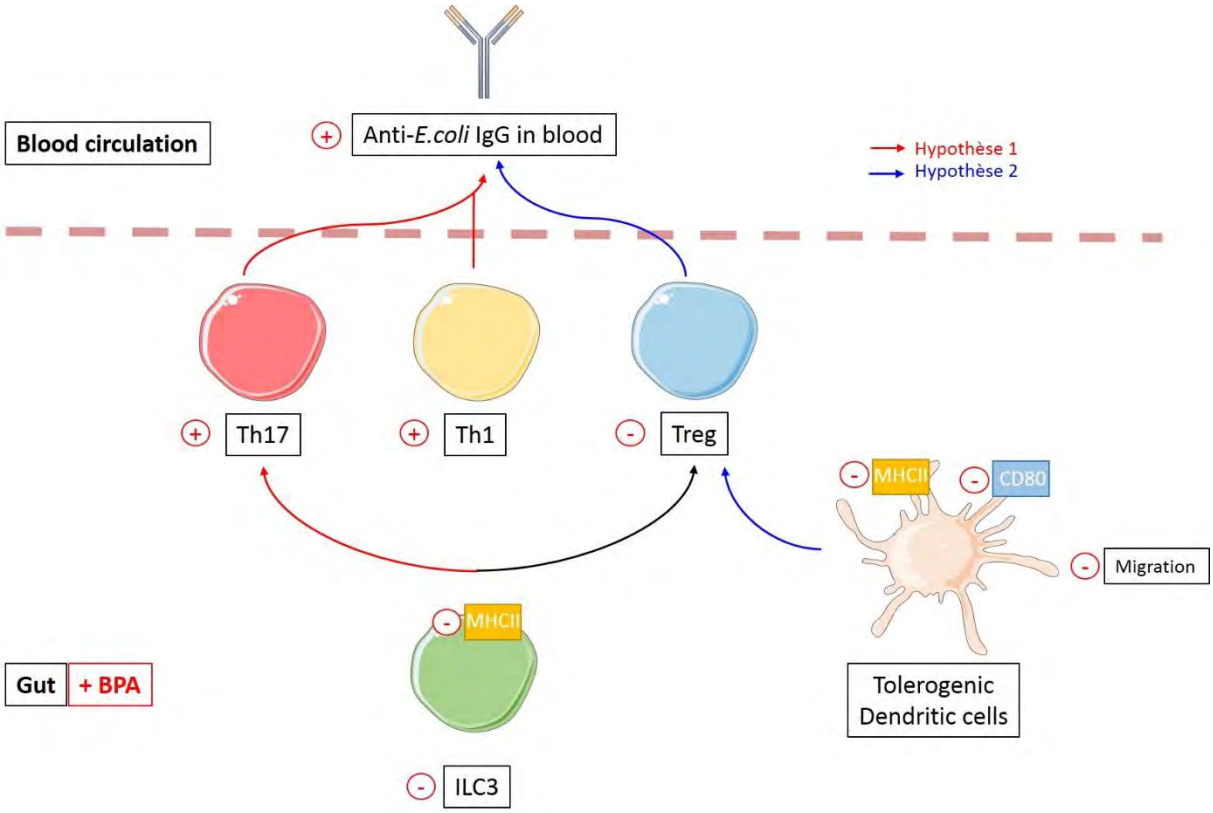


Figure 33 : Schéma représentant les différentes hypothèses pour l'augmentation du niveau d'IgG anti-E.coli sanguin chez la descendance exposée au BPA en périnatal.

Afin d'apporter des données nous permettant de comprendre la diminution de fréquence des ILC3 d'un point de vue mécanistique, nous nous sommes intéressés à l'acide rétinoïque (AR). L'AR est un dérivé de la vitamine A qui a de nombreux rôles notamment dans le développement embryonnaire, mais également dans la différenciation des sous-populations d'ILC (Kim et al., 2015). Il peut être biosynthétisé dans les IEC et les DC par l'utilisation de rétinol déshydrogénase qui métabolise le rétinol en rétinaldéhyde et de rétinaldéhyde déshydrogénases (RALDH1 à 3) qui métabolisent le rétinaldéhyde en AR (Agace and Persson, 2012) (Figure 34). Nous avons montré que l'expression protéique de RALDH1 diminue dans les IEC après exposition périnatale au BPA. Cet effet est lié à la diminution de l'expression génique de RALDH1 dans l'iléon. Une exposition périnatale au BPA peut donc aboutir à la diminution de la production d'AR et ainsi à la diminution de la fréquence des ILC3 dans la LP et de la migration des DC dans les MLN.

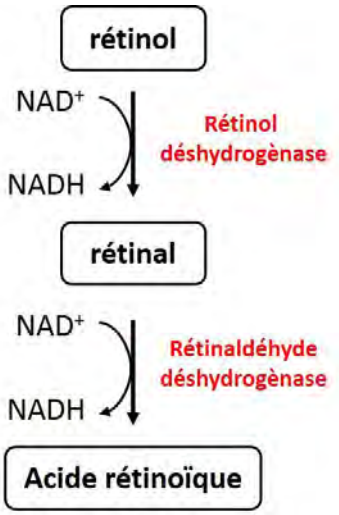


Figure 34 : Formation de l'acide rétinoïque à partir de rétinol

Un grand nombre d'effets observés chez les souris femelles exposées lors de la période périnatale au BPA peut donc être expliqué par la diminution de la fréquence des ILC3 et des DC migratoires, liée à la diminution de la production d'AR (Figure 35). Cependant, d'autres investigations sont nécessaires pour prouver la totale implication de l'AR dans les effets observés. L'effet du BPA sur l'expression de RALDH1 peut être dû à l'altération de nombreux mécanismes épigénétiques, de la condensation de la chromatine jusqu'au transport et la dégradation de l'ARNm. La méthylation de l'ADN agit comme un « patron » qui conditionne l'expression des gènes. Il est reconnu que le BPA a une action « hypo-méthylante » (i.e. diminuant la méthylation de l'ADN) (Singh and Li, 2012), ce qui pourrait expliquer la diminution de l'expression de RALDH1 observée dans notre étude. Il serait également intéressant d'étudier l'impact d'une absence de production de RALDH1 sur le système immunitaire intestinal de souris KO inductibles (*Raldh1-/-*) en comparaison avec des souris exposées de manière périnatale au BPA, et/ou l'effet d'un régime supplémenté en vitamine A chez la descendance BPA et chez les mères. Nous pourrions ainsi étudier le rétablissement de la fréquence des ILC3 chez la descendance BPA lors de la supplémentation ainsi que le nombre de cryptopatches et de follicules lymphoïdes isolés chez ces souris en comparaison aux souris non supplémentées.

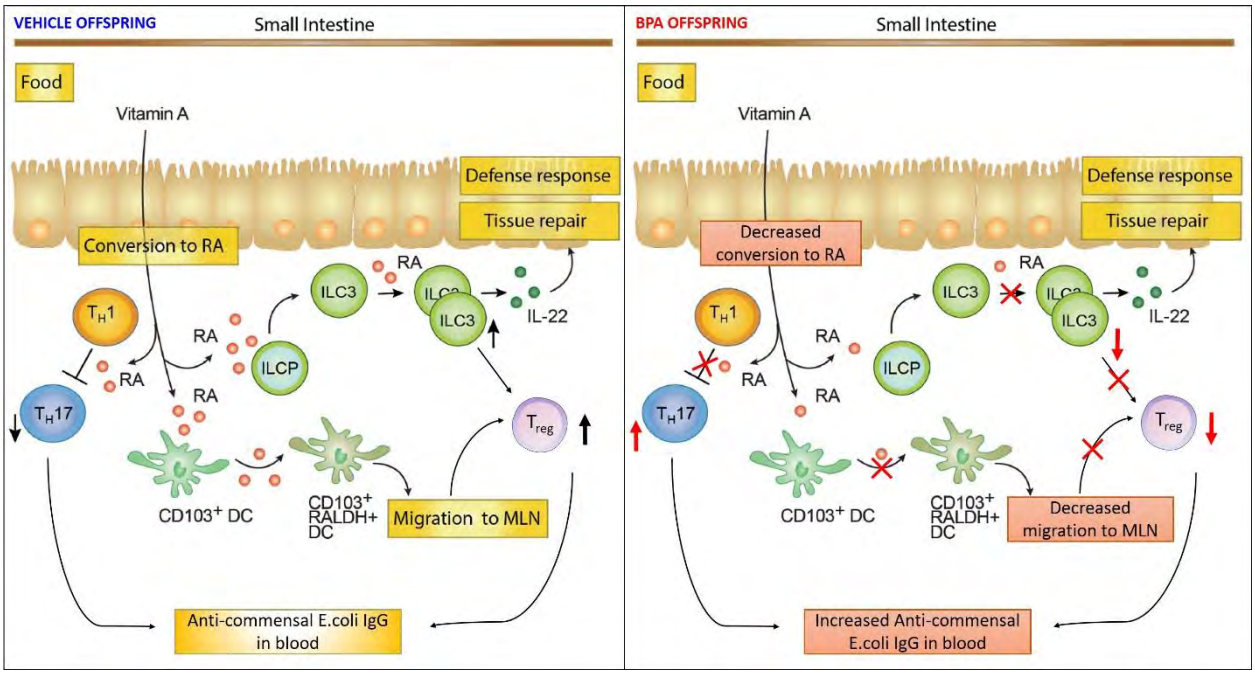


Figure 35 : Schéma récapitulatif des effets suspectés d'une exposition périnatale au BPA sur la production d'AR en lien avec l'homéostasie du système immunitaire intestinal chez la descendance femelle. Schéma inspiré de Parigi et al., 2015. RA= acide rétinoïque (AR).

Cependant, il est possible que la diminution d'AR dans l'intestin lors d'une exposition périnatale au BPA ne soit que partiellement impliquée dans les effets observés. Une autre hypothèse possible mettrait en jeu le récepteur AhR. En effet, comme expliqué en introduction (chapitre 1.2.4.6 des données bibliographiques), le BPA a la capacité d'interagir avec AhR pour l'activer ou l'inhiber selon le type cellulaire. Il a été démontré qu'une inhibition de AhR réduit la fréquence des ILC3 chez la souris (Qiu et al., 2012). De plus, il existe une relation entre la production d'AR et AhR, notamment dans les cellules dendritiques (Pot, 2012). En effet, une activation d'AhR par un ligand issu de l'alimentation comme l'indole, augmente la production de RALDH1 permettant la synthèse de AR. Cet AR peut ensuite activer son propre récepteur (RAR), permettant la transcription de FoxP3 dans les Treg. Le BPA peut, dans notre cas, agir comme un antagoniste d'AhR, provoquant la diminution de FoxP3 dans les Treg, bloquant la différenciation des LT CD4 naïves en Treg (Figure 36). Il serait donc intéressant d'étudier le possible lien entre l'exposition périnatale au BPA et l'activité du récepteur arylé AhR au niveau intestinal (*villin, Ahr*$^{-/-}$) dans le but de démontrer premièrement le lien entre la diminution des ILC3 et la production de l'AR, et deuxièmement les conséquences de ces perturbations dans la

différenciation des différents acteurs clés du maintien de la tolérance tel que les Treg ou les Th17.

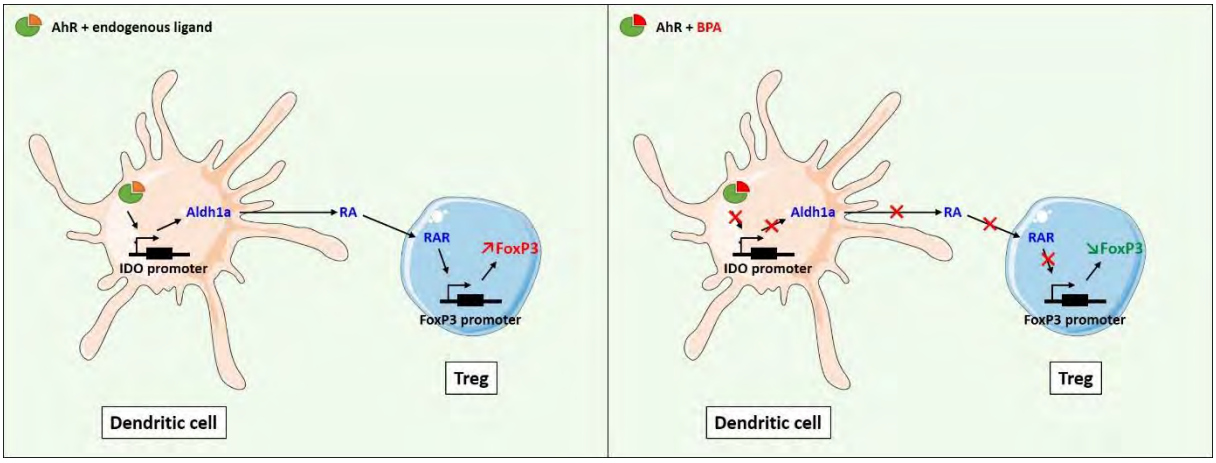


Figure 36 : Schéma récapitulatif des effets suspectés d'une exposition périnatale au BPA sur la production de l'AR en lien avec AhR et le système immunitaire intestinal chez la descendance femelle. Schéma inspiré de Pot, 2012. RA : acide rétinoïque (AR).

Une nouvelle population de cellules immunitaires a également été récemment caractérisée chez l'Homme et la souris : les ILCreg (Wang et al., 2017). Cette population a été identifiée comme étant inhibiteur de l'inflammation par les ILC1 et 3, notamment par la sécrétion d'IL-10. Il serait donc intéressant de voir si la fréquence de cette population est augmentée chez la descendance BPA, pouvant expliquer la diminution de la fréquence des ILC3 observée dans notre étude.

Enfin, une modulation du microbiote intestinal, lors d'une exposition périnatale au BPA, peut expliquer les effets observés sur le système immunitaire de ce tissu. En effet, il a été montré que certaines populations du microbiote intestinal ainsi que certains métabolites produits par les bactéries favorisent la différenciation des lymphocytes. Par exemple, les bactéries SFB (*Segmented Filamentous Bacteria*) sont connus pour induire la différenciation des LT naïfs en Th17 (Goto et al., 2014). Au contraire, la production d'indole par diverses bactéries comme les *E.coli* active AhR ce qui augmente la différenciation des LT en Treg au détriment des Th17 et augmente la production d'IL-22 par les ILC3 (DeMoss and Moser, 1969; Singh et al., 2016; Zelante et al., 2013). Il a également été démontré que des souris SPF (*Specific Pathogen-Free*) présentaient une augmentation du taux de butyrate corrélé a une diminution de la fréquence des

ILC3 dans les plaques de Peyer de l'iléon, comparé à des souris traitées aux antibiotiques (Kim et al., 2017). Il serait donc important de caractériser plus spécifiquement le microbiote intestinal de la descendance femelle exposée en périnatal au BPA. L'observation des impacts sur le système immunitaire du transfert du microbiote de ces individus vers des souris axéniques (dépourvu de microbiote intestinal) permettrait de comprendre l'influence du microbiote dans les effets observés dans notre modèle. De plus, la caractérisation des métabolites présents dans l'intestin de la descendance femelle exposée en périnatal au BPA permettrait de connaitre les métabolites impactés, possiblement l'indole et le butyrate, qui pourraient contribuer aux effets observés sur le système immunitaire intestinal.

L'ensemble de ces hypothèses et études apporteraient des précisions supplémentaires sur les mécanismes aboutissant à l'altération de l'homéostasie du système immunitaire en réponse à l'exposition périnatale au BPA ainsi que de mieux comprendre comment ces altérations augmentent la susceptibilité à l'intolérance alimentaire et aux infections parasitaires et virales chez la descendance à l'âge adulte (Menard et al., 2014b, 2014a; Roy et al., 2012).

2. Effets d'une exposition périnatale au BPA sur le système immunitaire intestinal et systémique chez la souris mâle en lien avec le développement de désordres métaboliques

2.1 Effets sur le métabolisme

Dans notre deuxième étude chez la souris, nous avons confirmé tout d'abord l'effet obésogène et diabétogène du BPA chez la descendance mâle exposée à cet agent pendant le développement (50 µg/kg de poids corporel/jour). Dans cette étude longitudinale, nous avons effectivement observé que la descendance BPA mâle présente tout d'abord une diminution du poids corporel au jour 25 post-natal, menant à une augmentation du poids corporel à partir du jour 70 comparé à la descendance contrôle. La diminution du poids au jour 25 est également accompagnée d'une diminution de la sensibilité au glucose au jour 35 et une diminution de la sensibilité à l'insuline est également retrouvée à partir du jour 120. Une diminution précoce du poids de la descendance BPA suggère un syndrome de retard de croissance intra-utérin (RCIU). Le RCIU apparaît lorsque la mère ne se nourrit pas correctement ou présente des insuffisances placentaires, ou lorsque le fœtus est privé d'une oxygénation normale ou en présence de tératogènes (Ross and Beall, 2008). Il a été démontré que le RCIU mène au développement de nombreuses complications à l'âge adulte, phénomène aussi appelé « programmation fœtale ».

Le développement de l'obésité fait partie intégrante de ces complications. En effet, il a été montré que des fœtus humains victimes de RCIU présentent une diminution du niveau de leptine (hormone responsable de la satiété) dans le cordon ombilical (Geary et al., 1999). Cette diminution de leptine est également retrouvée chez les nouveau-nés ayant un faible poids de naissance ou nés prématurés, chez l'Homme, le rat et le veau (Blum et al., 2005; Kotani et al., 2004; McMillen et al., 2004). De plus, le RCIU affecte également le développement des adipocytes. En effet, il a été montré chez le rat que les nouveau-nés ayant un RCIU présentent une augmentation de l'expression de PPARγ, promoteur de la différenciation des adipocytes et du stockage de lipides (Ross and Beall, 2008). Il est donc possible, bien qu'il n'y ait pas de différence de prise alimentaire à partir du jour 45 dans notre étude, que la descendance BPA présente un RCIU susceptible d'être à l'origine d'une obésité et/ou du T2D lors du vieillissement. Bien qu'il ait été démontré que la descendance de souris exposées au BPA pendant le développement présente une résistance de la satiété induite par la leptine, et que seule la descendance femelle rat présente une augmentation de l'expression de PPARγ dans les adipocytes, il serait intéressant de mesurer le niveau de leptine dans le sang ainsi que l'expression de PPARγ dans les adipocytes de la descendance BPA à différents âges peu après la naissance dans notre modèle (MacKay et al., 2017; Somm et al., 2009). De plus, la programmation fœtale du développement de l'obésité et du T2D lors d'une exposition périnatale au BPA pourrait venir de troubles présents chez la mère, comme le diabète gestationnel. En effet, il a été montré que le diabète gestationnel augmente le risque de développement d'obésité et de T2D chez la descendance (Burlina et al., 2017). L'étude du métabolisme du glucose de souris gestantes exposées au BPA serait donc judicieuse pour tenter de répondre à ces questions.

Les désordres métaboliques sont souvent associés à une inflammation dans le pancréas et/ou dans le foie. Cependant, nous n'avons pas observé d'inflammation du pancréas quel que soit l'âge dans notre étude. Il a été démontré qu'une exposition au BPA est associée à une augmentation de la prolifération des cellules β du pancréas seulement à l'âge jeune (jour 0, 21 et 30) et non lors du vieillissement (jour 120). Il serait donc également intéressant de mesurer la prolifération des cellules β du pancréas de la descendance BPA chez le jeune.

Contrairement à l'état inflammatoire du pancréas, nous avons observé une inflammation transitoire de type IL-17 et TNF-α dans le foie de la descendance BPA au jour 45. Cependant, cette inflammation disparaît pour laisser place à une inflammation IL-22 lors du vieillissement (jour 170). Ces observations ont déjà été retrouvées dans un modèle de Stéatose Hépatique Non

Alcoolique (NASH – *Non-Alcoholic-Steato Hepatitis*) (Kong et al., 2013; Pan et al., 2014; Rolla et al., 2016; Tang et al., 2011). La NASH apparaît quand le foie se surcharge en graisse avec des causes non associées avec l'abus d'alcool. De plus, la NASH est très souvent liée à l'obésité. Dans ce modèle de stéatose hépatique, il est décrit une augmentation des Th17 durant les premières étapes de mise en place de la NASH, c'est-à-dire durant l'endommagement du foie. Cette augmentation de Th17 s'ensuit par une infiltration de cellules sécrétrices IL-22, décrits dans ce cas comme hépato-protectrices. On peut donc supposer que l'exposition périnatale au BPA induit un début de NASH à l'âge jeune. En effet, il a été démontré chez la souris que l'exposition au BPA à 0,5 µg/kg de poids corporel/jour pendant la lactation et tout au long du développement de la descendance mâle induit une accumulation de triglycéride et de cholestérol dans le foie (Ke et al., 2016). Cet effet est également retrouvé chez la souris mâle exposée au BPA en direct (50 µg/kg de poids corporel/jour) pendant 28 jours, où ces mêmes souris présentent une augmentation de l'expression des gènes de la lipogénèse dans le foie, contribuant au développement de la stéatose hépatique (Marmugi et al., 2012). Il serait donc intéressant de faire une analyse histologique ainsi que du contenu lipidique des foies provenant de la descendance BPA afin de vérifier s'ils présentent des lésions et une augmentation de l'adiposité, signes de NASH.

2.2 Développement du système immunitaire et du microbiote intestinal : possibles associations avec l'apparition de désordres métaboliques après exposition périnatale au BPA

Comme décrit précédemment (*cf*. Résultats expérimentaux), l'apparition de l'obésité et des troubles du métabolisme du glucose après exposition périnatale au BPA peut être multifactorielle et la cause reste encore à définir. Le développement de l'obésité et du T2D est associé à la fois à une inflammation de bas-grade et une dysbiose intestinale. Nous avons également établi que ces deux paramètres sont manifestement inter-dépendants. Dans notre deuxième étude, nous avons cherché à établir la séquence des évènements qui peuvent contribuer au développement de désordres métaboliques dans nos conditions d'exposition au BPA, en prenant en compte les paramètres immunitaires et le microbiote intestinal. Nous avons observé d'importantes modulations du système immunitaire à la fois locales (intestin) et systémiques chez la descendance BPA au jour 45, et qui précèdent l'apparition du phénotype obèse et des désordres métaboliques. En effet, nous avons observé une diminution de la

fréquence des Th1 et Th17 intestinaux, qui sont parallèlement augmentés au sein du compartiment systémique chez ces individus. Ces résultats sont concordants avec ceux obtenus par Garidou et al. qui observent une diminution des Th17 dans l'iléon des souris nourris au HFD, et ceux obtenus par Luo et al. qui ont observés une augmentation de la différenciation des LT vers les Th1 et Th17 dans la rate de souris exposées de manière périnatale au BPA (Garidou et al., 2015; Luo et al., 2016).

Garidou et al. ont conclu dans leur papier que l'altération du microbiote iléal chez les individus HFD est responsable de la diminution des Th17 dans l'intestin, lui-même déterminant pour l'apparition des désordres métaboliques (Garidou et al., 2015). Cette altération du microbiote iléal peut être la conséquence d'un défaut de défense intestinal. Dans notre étude, nous avons observé que l'exposition périnatale au BPA diminue la sécrétion d'IgA dans les fèces de la descendance à l'âge jeune. Cette diminution est corrélée à une perte de la sécrétion du récepteur aux IgA responsable de leur translocation : le pIgR. Ces effets peuvent être inter-dépendants -le pIgR étant sécrété en même temps que les IgA- et il serait intéressant de tester par ELISA si la diminution de la sécrétion d'IgA couplée au pIgR est due à une perte de l'expression des pIgR dans l'épithélium intestinal. Il est également possible que l'exposition périnatale au BPA, de façon comparable aux effets observés chez la femelle, produit chez le mâle une diminution de la fréquence d'ILC3 couplée à une diminution de la fréquence des cellules productrices d'IgA. L'analyse de la fréquence de ses populations permettrait d'apporter une réponse à cette hypothèse. De plus, de façon comparable à l'étude sur les femelles, nous avons également observé une diminution de l'activité anti-microbienne contre une *E.coli* commensale couplée à une diminution de l'activité du lysozyme dans les fèces de la descendance BPA. Il serait cependant intéressant de déterminer l'expression du lysozyme dans les cellules de Paneth de la descendance BPA par immunohistochimie afin de comprendre si la diminution de l'activité du lysozyme provient d'un défaut de production (comme retrouvé dans l'étude sur les femelles).

De par leur lien étroit, les perturbations dans les défenses de la barrière intestinale et l'homéostasie du système immunitaire, peuvent être à la fois la cause et/ou la conséquence des désordres métaboliques et de la dysbiose intestinale observées chez la descendance BPA. En effet, ces mêmes individus à l'âge adulte (jour 45) présentent une dysbiose intestinale caractérisée par une importante diminution des *Bifidobacteria*. Cette population de bactérie est reconnue pour leurs propriétés anti-inflammatoires, ce qui pourrait expliquer l'inflammation systémique observée chez la descendance BPA (Khokhlova et al., 2012). De plus certaines

souches de *Bifidobacterium* sont utilisées comme probiotiques contre l'obésité et sont diminués dans des souris nourris pendant 4 semaines au HFD, pointant encore une fois le lien complexe entre inflammation, microbiote intestinal et désordres métaboliques (Cani et al., 2007; Kobyliak et al., 2016; Li et al., 2016)

Dans notre étude, lors du vieillissement (jour 170), la descendance BPA développe un phénotype obèse avec augmentation du tissu adipeux blanc péri-gonadique (gWAT – *gonadal White Adipose Tissue*) ainsi que des troubles du métabolisme du glucose et de l'insuline. Les perturbations de l'homéostasie du système immunitaire intestinal et systémique observées au jour 45 sont moins prononcées au jour 170 où seule l'inflammation systémique IL-17 est retrouvée. De plus, cette inflammation est également retrouvée au niveau du gWAT. En effet, lors du vieillissement et le développement de l'obésité, la descendance BPA présente une augmentation du poids du gWAT associée à une infiltration des macrophages pro-inflammatoires M1 et une augmentation de l'expression d'IL-17 dans ce tissu. Chez les individus obèses, l'augmentation de la masse du WAT crée une surmortalité des adipocytes due à la lipotoxicité de l'environnement. Les macrophages M1 s'infiltrent au niveau de ces adipocytes morts pour former des structures en couronne autour de ceux-ci (Cinti et al., 2005; Strissel et al., 2007). L'augmentation du poids du gWAT chez la descendance BPA peut donc expliquer l'augmentation de la fréquence des macrophages pro-inflammatoires M1 dans ce tissu. Cependant, une analyse histologique du gWAT de la descendance BPA permettrait de confirmer l'augmentation de la présence de ces structures en couronne chez la descendance BPA, comparée à la descendance contrôle dans notre modèle.

Au jour 170, lors de l'installation du phénotype obèse, la descendance BPA présentent également une dysbiose intestinale plus complexe par rapport au jour 45. En effet, ces individus présentent une diminution des *Clostridium butyricum* et *Cluster XIVa* en plus de la diminution des *Bifidobacteria*. Ce type de dysbiose a été précédemment rapporté par Lai et al (Lai et al., 2016) où les auteurs ont observé une même dysbiose chez des souris exposées de manière directe au BPA et chez des souris nourries au HFD, démontrant un impact similaire sur le microbiote entre l'exposition au BPA et un régime riche en graisse. De plus, il a été rapporté une diminution des *Clostridia* chez des patients atteints de T2D comparés aux individus sains (Han and Lin, 2014), pouvant également expliqué les effets que nous observons sur le métabolisme du glucose et de l'insuline dans notre étude. Il serait intéressant de clarifier si la dysbiose intestinale est la cause ou la conséquence de l'altération du système immunitaire et des défenses intestinales liées à l'exposition au BPA. Pour cela, un transfert de flore intestinale

de la descendance BPA ou solvant à J50 vers des souris axéniques du même âge permettrait de vérifier si les receveuses développent les mêmes troubles du système immunitaire et du métabolisme lors du vieillissement. Cette étude pourrait également être effectuée en comparaison avec un transfert de flore intestinale de la descendance BPA ou solvant à J170 vers des souris axéniques. Dans le cas où ce n'est pas la dysbiose qui mène aux désordres du métabolisme et du système immunitaire, il faudrait effectuer une étude de la descendance de lignées KO inductibles pour les Th17 (*IL23p19*$^{-/-}$) et/ou pour les IgA (*IgA*$^{-/-}$) dont la mère aurait été exposée au BPA pour comparer les effets du BPA chez ces individus et chez des souris sauvages. Une différence dans l'apparition de la dysbiose et des troubles métaboliques associés incriminerait directement les troubles de l'homéostasie du système immunitaire.

Une autre hypothèse possible est le transfert d'un microbiote altéré de la mère à la descendance. En effet, comme décrit précédemment, l'exposition directe au BPA, comme chez les mères dans notre étude, altère le microbiote intestinal. De plus, la mère transfert son microbiote, à la fois fécale et vaginale, à la descendance lors de la naissance. Afin de tester si le BPA a un impact sur le microbiote des mères et de la descendance à l'âge jeune, nous avons effectué une étude préliminaire permettant le dénombrement des bactéries fécales chez la mère exposée à 50 µg/kg de poids corporel/jour ainsi que chez la descendance mâle et femelle (Figure 37).

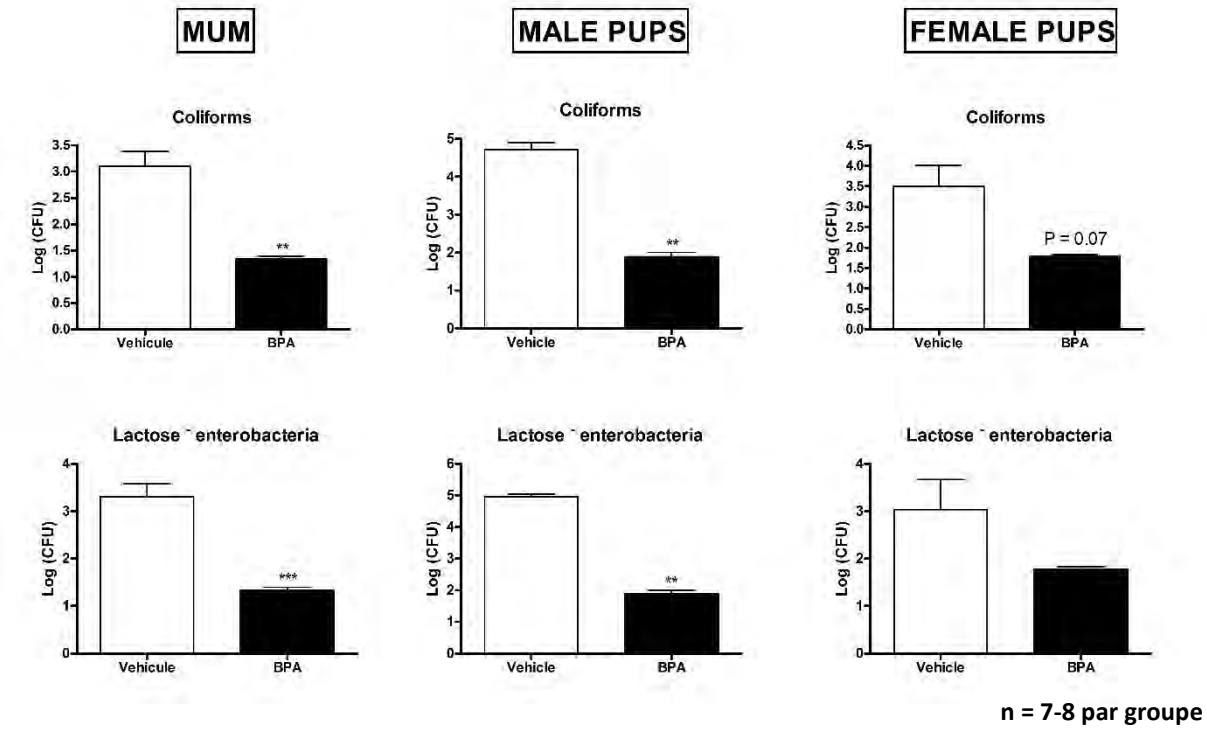


Figure 37 : Dénombrements microbiologiques sur ChromID (coliformes) et sur McConckey (entérobactéries lactose-) des fèces des mères et de la descendance exposée au BPA à 50 µg/kg de poids corporel/jour (barres noires) ou au solvant (barres blanches) au jour 21 post-natal.

Nous observons une forte diminution des bactéries coliformes et des entérobactéries lactose⁻ chez les mères exposées au BPA. De manière intéressante, la descendance mâle et, à moindre degré, la descendance femelle suit la même tendance, mettant en évidence le possible transfert de flore fécale de la mère vers la descendance. Il serait intéressant de vérifier cette hypothèse en effectuant des transferts de microbiote de mères traitées au BPA ou au solvant vers des mères axéniques traitées ou non au BPA et en observant les impacts sur le système immunitaire et le microbiote intestinal de la descendance. Nous pourrions ainsi comprendre si la dysbiose intestinale observée chez la descendance est due à un effet du BPA sur le microbiote de la mère, entraînant un défaut de maturation du système immunitaire dans sa descendance, ou si inversement cette modification du microbiote se développe plus tardivement des suites d'une altération du développement du système immunitaire.

3. Exposition périnatale au BPA : Importance du sexe, de l'âge et de la période d'exposition

3.1 Dimorphisme sexuel

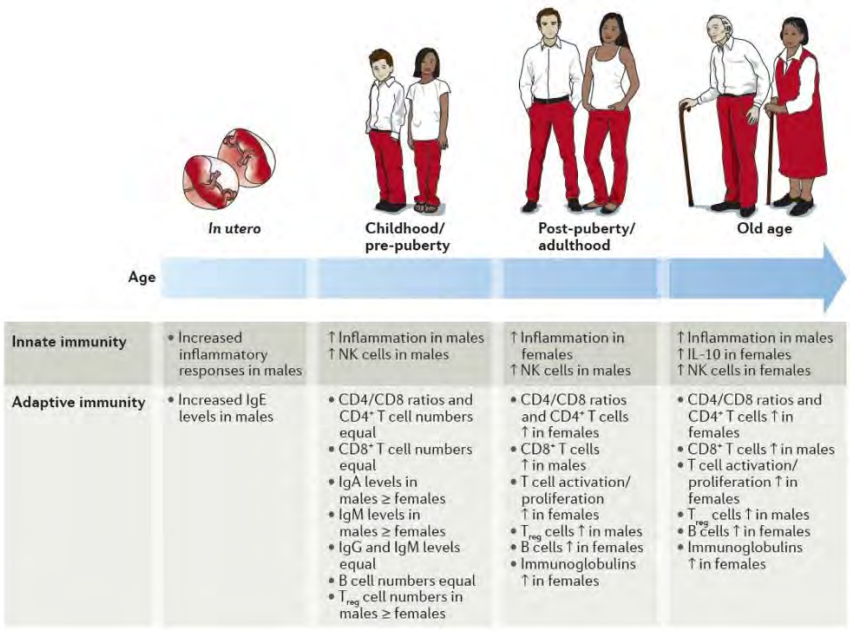
Le dimorphisme sexuel représente toutes les caractéristiques génotypiques et/ou phénotypiques qui diffèrent entre le sexe mâle et femelle. Ces différences peuvent influer sur la réponse des organismes par rapport à un traitement, une maladie ou d'autres stimuli.

Nous avons observé, dans nos deux études, des impacts différents dépendants du sexe de l'individu sur la réponse immunitaire lors d'une exposition périnatale au BPA à l'âge adulte (jour 45) (Figure 38).

		REPONSE TH1		REPONSE TH17		TREG
		Fréquence des Th1	Concentration d'IFN-γ	Fréquence des Th17	Concentration d'IL-17	Fréquence des Treg
LP	Mâles	↘	→	↘	→	→
	Femelles	→	↗	↗	↗	↘
RATE	Mâles	↗	↗	↗	↗	→
	Femelles	↗	→	↗	↗	↘

Figure 38 : Impact du sexe de l'individu sur le système immunitaire lors d'une exposition périnatale au BPA.

Il est intéressant d'observer que les différences d'effet du BPA entre les deux sexes sont plus marquées au niveau local comparé au compartiment systémique. En effet, dans l'intestin, la fréquence des Th1 est diminuée chez les mâles alors qu'elle n'est pas altérée chez la femelle, après exposition périnatale au BPA. Par opposition, la fréquence des Treg est diminuée chez la femelle alors qu'elle n'est pas modifiée chez le mâle. La sécrétion d'IFN-γ et d'IL-17 est augmentée chez la femelle alors qu'elle n'est pas altérée chez le mâle. La différence la plus notable est la fréquence des Th17 qui est diminuée chez le mâle, alors qu'elle est augmentée chez la femelle. En systémique, seules la sécrétion d'IFN-γ et la fréquence des Treg présentent un dimorphisme sexuel après exposition périnatale au BPA. Il est reconnu que le développement du système immunitaire, chez l'Homme, présente des dimorphismes liés au sexe tout au long de la vie, tandis que certaines différences n'apparaissent qu'après la puberté et avant la sénescence reproductive, suggérant l'implication à la fois de paramètres génétiques, environnementaux et hormonaux (Figure 39) (Klein and Flanagan, 2016).



Innate immunity	• Increased inflammatory responses in males	↑ Inflammation in males ↑ NK cells in males	↑ Inflammation in females ↑ NK cells in males	↑ Inflammation in males ↑ IL-10 in females ↑ NK cells in females
Adaptive immunity	• Increased IgE levels in males	• CD4/CD8 ratios and $CD4^+$ T cell numbers equal • $CD8^+$ T cell numbers equal • IgA levels in males ≥ females • IgM levels in males ≥ females • IgG and IgM levels equal • B cell numbers equal • T_{reg} cell numbers in males ≥ females	• CD4/CD8 ratios and $CD4^+$ T cells ↑ in females • $CD8^+$ T cells ↑ in males • T cell activation/ proliferation ↑ in females • T_{reg} cells ↑ in males • B cells ↑ in females • Immunoglobulins ↑ in females	• CD4/CD8 ratios and $CD4^+$ T cells ↑ in females • $CD8^+$ T cells ↑ in males • T cell activation/ proliferation ↑ in females • T_{reg} cells ↑ in males • B_{reg} cells ↑ in females • Immunoglobulins ↑ in females

Figure 39 : Différences entre l'homme et la femme pour les réponses immunitaires tout au long de la vie (Klein and Flanagan, 2016).

Le niveau d'estradiol circulant est un facteur déterminant dans la modulation de la réponse du système immunitaire. En effet, les ER sont exprimés dans de nombreuses cellules immunitaires dont les lymphocytes, les macrophages et les DC. Une faible concentration en estradiol a été rapportée comme promotrice de réponses de type Th1 ainsi que de la production d'IFN-γ par les LT (Dai et al., 2008; Karpuzoglu et al., 2007; Straub, 2007). Un ajout d'estrogènes exogènes a également été montré comme capable de promouvoir la prolifération des Treg *in vivo* et *in vitro* (Dinesh et al., 2010; Polanczyk et al., 2004). De plus, de fortes concentrations en estrogènes augmentent la production d'IL-17 par les Th17, tandis que l'ovariectomie chez la souris augmente le nombre de cellules Th17 (Tyagi et al., 2012; Wang et al., 2009). Du fait de l'effet estrogéno-mimétique du BPA, même faible, et de la présence de BPA dans le lait maternel de mères exposées, on peut supposer qu'un dimorphisme sexuel peut être imputer majoritairement à un cumul d'effets du BPA avec les estrogènes circulants, créant des altérations dans la réponse des ER. Dans cette hypothèse, l'effet du BPA serait cumulé sinon compétitif avec l'estradiol pour l'accès aux récepteurs selon le type cellulaire, l'organe et le sexe de l'individu. Cette hypothèse est appuyée par la différence d'expression des ER selon les tissus et le type cellulaire (Barros and Gustafsson, 2011; Houdeau, 2016), et par la différence de réponse aux estrogènes entre les deux sexes (Park et al., 2016).

Une autre hypothèse évoquée précédemment est la programmation fœtale. En effet, des altérations sexe-dépendants *in utero* mènent à des différences sexuelles dans le développement du système immunitaire (Gluckman et al., 2005). En effet, le placenta de fœtus mâles nés prématurément tend à être plus inflammé comparé aux femelles, permettant une meilleure survie des femelles nées prématurément en raison d'une plus faible concentration en cytokines circulantes (Goldenberg et al., 2006), ce qui démontre un état inflammatoire basal différent chez les fœtus mâles par rapport aux femelles. De plus, les testicules des fœtus humains produisent des androgènes à partir de la 10ème semaine de gestation, menant au développement précoce de différences sexuelles androgène-dépendant sur le système immunitaire (Carr et al., 1983). Pour rappel, le BPA agit également sur les RA en agissant comme un compétiteur des androgènes, avec des effets *in vivo* recensés sur le développement des organes sexuels masculins et féminins (Walters et al., 2010). Il a également été démontré chez la souris qu'une exposition périnatale au 2,3,7,8-TétraChloroDibenzo-*p*-dioxine (TCDD) -un agoniste de AhR- a des impacts différents sur l'homéostasie du système immunitaire selon le sexe (diminution de la production d'IL-4 dans les splénocytes de la descendance mâle / augmentation de la production d'IFN-γ dans les splénocytes de la descendance femelle) (van Esterik et al., 2015). Une exposition *in utero* au BPA peut donc aboutir à des effets différents entre mâles et femelles selon la présence ou non de récepteurs clés comme les ER, les RA ou AhR. Le BPA peut donc altérer cette programmation fœtale, menant aux différences des impacts observés de ce composé sur la descendance selon le sexe.

Nous avons également observé dans nos deux études des effets différents sur la perméabilité intestinale chez la descendance femelle par rapport aux mâles (Figure 40). En effet, la descendance femelle BPA présente une augmentation de la perméabilité à la fois para- et transcellulaire (respectivement perméabilité augmentée pour le FSS et pour la HRP) dans le côlon, sans modification de celle du jéjunum, par rapport aux individus contrôles. Par contre, la descendance mâle ne présente pas de changement dans la perméabilité para- ou transcellulaire quelle que soit la région de l'intestin, par rapport aux contrôles. Bien qu'il soit reconnu que les estrogènes diminuent la perméabilité paracellulaire colique à la fois chez le mâle et la femelle, l'augmentation de la perméabilité du côlon chez la descendance BPA femelle peut être le résultat de l'augmentation de la concentration locale d'IFN-γ, comme précédemment décrit dans la 1ère étude (Braniste et al., 2009; Ferrier et al., 2003). Ainsi, le dimorphisme sexuel dans les effets du BPA sur la perméabilité intestinale de la descendance peut être essentiellement le résultat des impacts de ce composé sur le système immunitaire.

Pour confirmer ou infirmer la corrélation entre le niveau d'IFN-γ dans le colon et la perméabilité intestinale augmentée chez la souris, il serait intéressant de comparer le niveau d'IFN-γ basal dans le colon de la descendance BPA mâle. Cependant, un effet synergique en lien avec les effets de l'estradiol sur la perméabilité intestinale n'est pas non plus à exclure. En effet, il a été montré que la supplémentation en estradiol, chez des rates ovariectomisées, diminue la perméabilité dans le colon *via* l'augmentation de l'expression des protéines de jonctions serrées comme l'occludine et JAM-A (Braniste et al., 2009). Dans notre cas, il est envisageable que le BPA puisse, par ses propriétés de PE, diminuer le niveau d'estrogènes chez la femelle (chez qui c'est l'hormone circulante dominante), ce qui aurait pour conséquence une augmentation constitutive de la perméabilité intestinale basale. Dans cette hypothèse, il serait intéressant de mesurer le taux circulant d'estrogènes dans les deux sexes de la descendance BPA afin de confirmer ou infirmer cette corrélation.

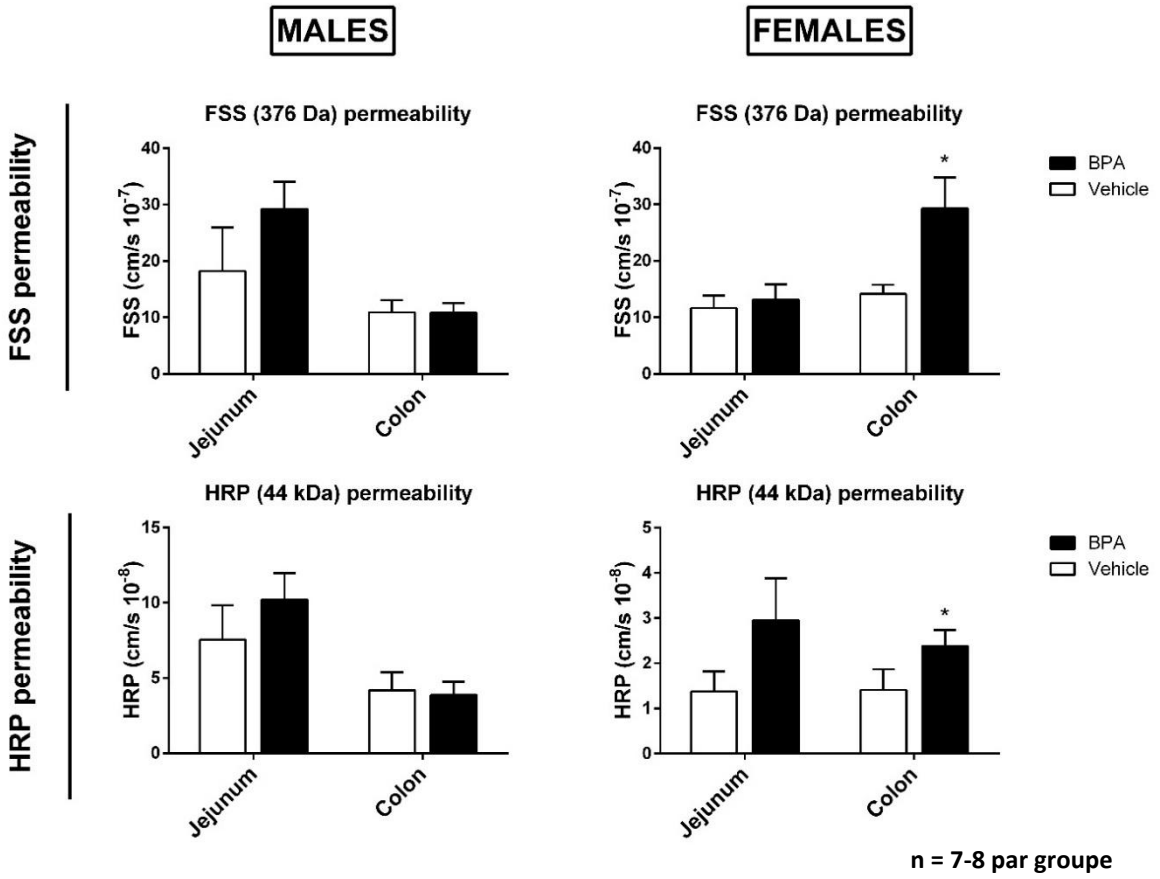


Figure 40 : Perméabilité du jéjunum et du colon de la descendance mâle et femelle (jour 45) lors d'une exposition périnatale au BPA à 50 µg/kg de poids corporel/jour pour une molécule à

faible et haut poids moléculaire (FSS et HRP représentants la perméabilité para et trans-cellulaire, respectivement).

Il existe par ailleurs un dimorphisme sexuel dans les effets du BPA sur la tolérance au glucose. En effet, la descendance mâle après exposition périnatale au BPA présente une diminution de la tolérance au glucose dès le jour 35 par rapport aux contrôles, alors que la descendance femelle BPA ne montre aucune altération de ce paramètre au même âge (Figure 41). Une précédente étude a conclu que les souris femelles, contrairement aux mâles, étaient protégées contre les désordres métaboliques lors d'un régime HFD (Pettersson et al., 2012). Cette étude a également montré qu'une telle protection des femelles était associée au maintien de l'environnement anti-inflammatoire au sein du tissu adipeux, notamment à la présence plus importante des Treg, à l'inverse des mâles qui développent une inflammation dans ce tissu par infiltration de macrophages et diminution des Treg. Il serait intéressant, dans notre cas, de comparer les populations pro et anti-inflammatoires du tissu adipeux de la descendance mâle et femelle exposée de manière périnatale au BPA, afin de comprendre si les différences observées au niveau de l'apparition de troubles dans la tolérance au glucose proviennent d'une perturbation de la réponse immunitaire dépendant du sexe.

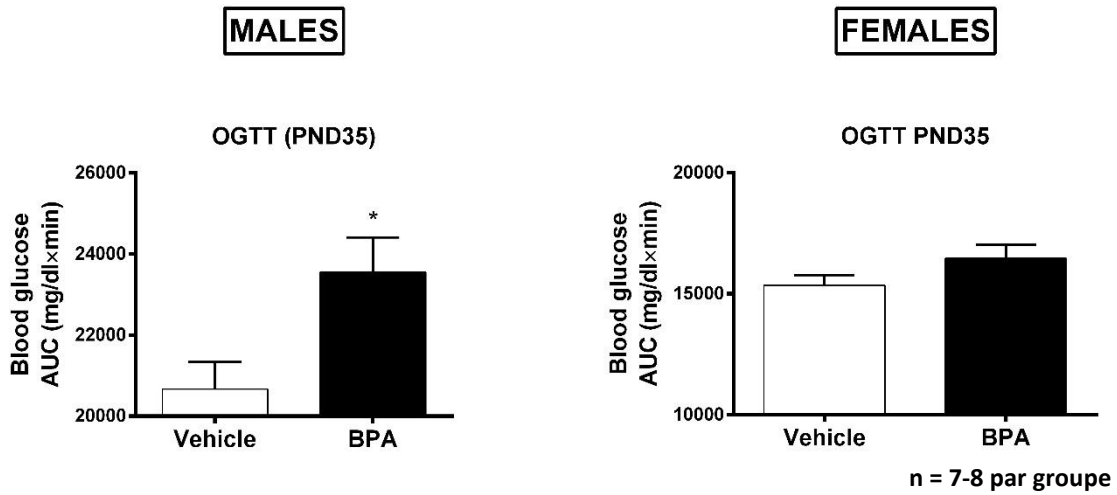


Figure 41 : Aire sous la courbe (AUC) représentatif d'un test de tolérance au glucose (OGTT) effectué sur la descendance mâle et femelle exposée au BPA à 50 µg/kg de poids corporel/jour (barre noire) ou au solvant (barre blanche) au jour 35.

3.2 Importance de l'âge

L'homéostasie du système immunitaire ainsi que celle du microbiote intestinal évoluent en fonction de l'âge des individus. L'éducation du système immunitaire peu après la naissance et pendant la transition alimentaire mène à une évolution dans la fréquence des différentes populations de cellules immunitaires. En effet, le nombre de Treg décline peu à peu pendant l'enfance pour laisser place aux Th1, Th17 et Th2 qui augmentent graduellement jusqu'à atteindre la même proportion que leurs précurseurs, les LT naïfs (Shearer et al., 2003). Lors du vieillissement, le nombre de LT et LB naïfs diminue par rapport aux LT et LB matures tout comme la production de cytokines par les LT $CD4^+$ et $CD8^+$ (Weiskopf et al., 2009). Le nombre de LT et LB mémoires restent importants, voire s'accumulent lors du vieillissement de par la diminution de la proportion de LT et LB naïfs. De plus, leurs capacités cytotoxiques et sécrétrices de cytokines diminuent avec l'âge. Les populations du système immunitaire inné restent stables lors du vieillissement mais leurs capacités phagocytaires, de co-activation et de sécrétion cytokinique diminue. En bref, le système immunitaire décline, phénomène aussi appelé immuno-senescence, favorisant la susceptibilité aux infections.

Le microbiote intestinal suit lui aussi une dynamique bien particulière, menant à de nombreux changements dans la composition et la diversité des différentes populations bactériennes tout au long de la vie (*cf.* chapitre 2.3 des données bibliographiques).

Dans notre étude, nous avons observé qu'une exposition périnatale au BPA menait à des altérations du système immunitaire spécifiques chez la descendance mâle et femelle au jour 50. Chez la descendance mâle, l'exposition périnatale au BPA crée une dysbiose ainsi qu'une altération de l'homéostasie du système immunitaire au jour 45 évoluant lors du vieillissement (jour 170). La caractérisation des effets d'une exposition périnatale au BPA sur l'évolution du système immunitaire et du microbiote intestinal au jour 21 (sevrage) permettrait donc une meilleure compréhension des effets observés plus tardivement à l'âge adulte (jour 45) et lors du vieillissement (jour 170).

Dans cette optique, nous avons effectué une étude préliminaire (non publiée) sur les effets d'une exposition périnatale au BPA à 50 µg/kg de poids corporel/jour sur le système immunitaire et le microbiote intestinal de la descendance mâle et femelle âgée de 21 jours.

Nous avons tout d'abord noté que la descendance BPA présente le même défaut de présence de bactéries coliformes et d'entérobactéries lactose $^-$ que chez l'adulte et quel que soit le sexe (Figure 37). L'exposition périnatale au BPA affecte donc le microbiote intestinal

de manière précoce, une dysbiose qui est également retrouvée chez les deux sexes au jour 45. Bien que la descendance BPA mâle et femelle présentent les mêmes caractéristiques de dysbiose au jour 21, le niveau des IgA fécales et des IgG anti-*E.coli* sanguins diffère selon les sexes, soulignant une fois de plus un dimorphisme sexuel important dans les effets du BPA (Figure 42). En effet, la descendance BPA mâle présente une tendance à la diminution des IgA fécaux ($p = 0,1$) alors qu'aucun changement n'est observé chez la femelle. Inversement, les IgG anti-*E.coli* sanguins sont fortement augmentées chez la descendance BPA femelle au jour 21 alors qu'aucun changement n'apparaît chez le mâle. Il semble donc que l'exposition périnatale au BPA affecte le niveau fécal d'IgA de manière précoce chez le mâle, effet qui se maintient lors du vieillissement. Par ailleurs, l'exposition périnatale au BPA affecte le niveau d'IgG anti-*E.coli* sanguin de manière précoce chez la femelle, lequel reste à un fort niveau chez la souris femelle adulte (jour 45).

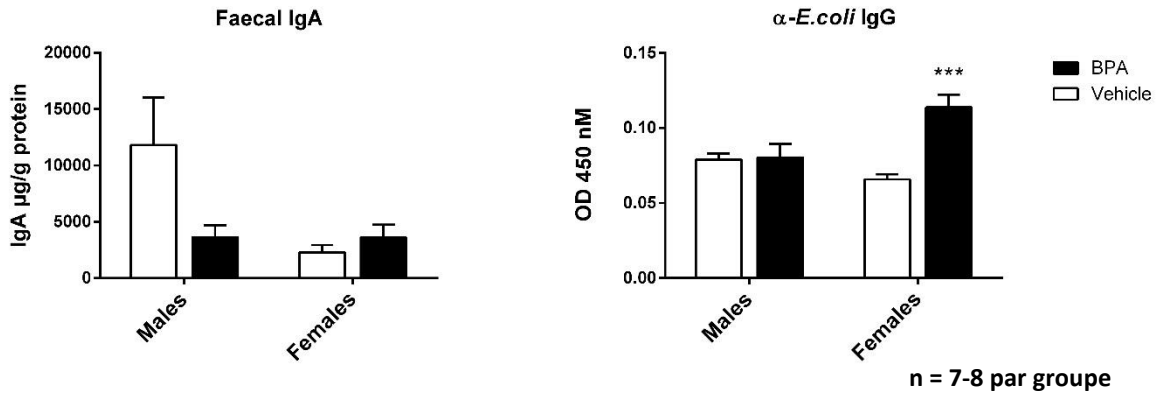


Figure 42 : Niveau d'IgA fécal et d'IgG anti-*E.coli* sanguin chez la descendance mâle et femelle après exposition périnatale au BPA ou au solvant.

Nous avons également étudié la fréquence de différentes populations de lymphocytes pro- et anti-inflammatoires isolés chez la descendance mâle et femelle au jour 21 (Figure 43). La fréquence des Th17 est diminuée seulement dans la LP des mâles. De plus, la fréquence des Treg présente une forte tendance à la diminution seulement dans la LP de la descendance femelle. Il apparaît ainsi que l'exposition périnatale au BPA affecte, de manière sexe-dépendant, la fréquence des Th17 et des Treg au niveau intestinal, ce qui perdure et s'aggrave lors du vieillissement, contribuant aux effets systémiques observés à l'âge adulte.

De plus, la production d'IL-17 après re-stimulation CD3/CD28 dans la rate tend à augmenter chez la descendance BPA quel que soit le sexe. L'exposition périnatale au BPA oriente donc de manière précoce la réponse immunitaire systémique vers une inflammation de type IL-17, ce qui pourrait mener à l'augmentation de la réponse Th1 et Th17 observée lors du passage à l'âge adulte. La fréquence des ILC3 semble peu impactée chez la descendance, même si une légère tendance à la diminution peut être notée.

Il serait intéressant de tester l'hypothèse formulée dans notre première étude reposant sur un défaut de production de RA provoqué par l'exposition périnatale au BPA et qui pourrait être la cause de la diminution de la fréquence des ILC3. Cette hypothèse pourrait être vérifiée en testant l'expression et l'activité de RALDH1 dans la LP de la descendance à J21. Si l'expression et l'activité de RALDH1 ne sont pas modifiées à cet âge, la transition hormonale due au passage à l'âge adulte pourrait être, dans ces cas-là, un évènement déclencheur.

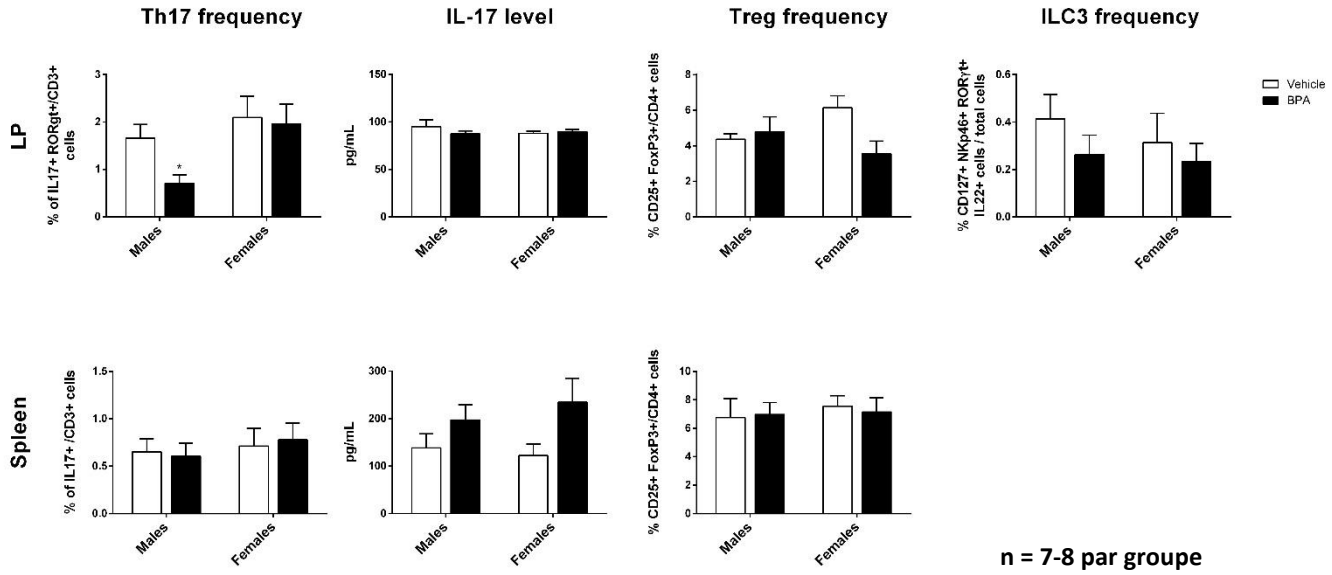


Figure 43 : Fréquence des cellules Th17 associée à la production d'IL-17 après re-stimulation CD3/CD28, des Treg et des ILC3 dans la LP et la rate provenant de la descendance après exposition périnatale au BPA ou au solvant.

De plus, chez la descendance âgée de 35 jours, nous avons observé une diminution de la tolérance au glucose seulement chez les mâles (Figure 41), un effet qui perdure jusqu'au jour 160 post-natal (cf. Etude 2). Ce défaut de tolérance au glucose peut être lié, en association avec les troubles de l'homéostasie du système immunitaire et du microbiote intestinal, au

développement du phénotype obèse et de la diminution de la sensibilité à l'insuline observés chez ces mêmes individus. En effet, il a été démontré qu'une réponse au glucose augmentée (diminution de la sensibilité au glucose) est corrélé avec une prise de poids plus importante chez des sujets non diabétiques (Pannacciulli et al., 2007). Il aurait été intéressant de suivre différents paramètres métaboliques, comme le poids et la tolérance au glucose et à l'insuline, chez la descendance femelle BPA en cours de vieillissement afin de vérifier si ces individus sont bel et bien protégés, de manière sexe-dépendant, contre les effets obésogènes et diabétogènes du BPA.

Nous avons donc observé que certaines modulations du système immunitaire, du microbiote intestinal et du métabolisme du glucose étaient présentes chez le jeune, apportant des précisions chronologiques quant à l'impact de l'exposition périnatale au BPA sur la dynamique développementale de ces trois paramètres (Figure 44).

	MALES	FEMALES
Weaning (PND21) 	↘ Glucose tolerance ↘ Faecal IgA ↘ Intestinal Th17 ↘ Coliforms bacteria ↘ Lactose⁻ Enterobacteria	↗ α-E.coli IgG ↘ Intestinal Treg ↘ Coliforms bacteria ↘ Lactose⁻ Enterobacteria
Young Adult (PND45-50) 	↘ Body and pgWAT weight ↘ Glucose tolerance ↘ Faecal IgA and pIgR ↘ Intestinal Th17 and Th1 frequencies ↗ Splenic Th17 and Th1 responses ↗ Liver IL-17 and TNF-α inflammation ↘ Anti-bacterial activity against commensal *E.coli* ↘ Lysozyme activity ↘ Bifidobacteria	↗ α-E.coli IgG ↘ Faecal IgA ↘ IgA+ plasma cells ↘ RALDH1 expression and activity in the gut ↘ Intestinal ILC3 ↘ DC in MLN ↘ MHCII, CCR7, CD80 expression in intestinal and splenic DC ↗ Intestinal and splenic Th17 response ↘ Intestinal and splenic Treg ↘ Intestinal activated T cells ↗ IFN-γ production in LP and MLN ↗ IL-17 production in MLN ↘ T helper in MLN ↘ Anti-bacterial activity against commensal *E.coli* ↘ Lysozyme activity ↘ Intestinal permeability
Ageing (PND170) 	↗ Body and pgWAT weight ↘ Glucose tolerance ↘ Insulin tolerance ↘ Intestinal Th1 frequency ↗ Intestinal Treg ↘ Splenic Th1 frequency ↗ Splenic IL-17 production ↗ Liver IL-22 inflammation ↗ Adipose M1 infiltration and IL-17 inflammation ↘ Anti-bacterial activity against commensal *E.coli* ↘ Lysozyme activity ↘ Bifidobacteria ↘ Clostridia	

Figure 44 : Schéma récapitulatif des impacts d'une exposition périnatale au BPA sur le système immunitaire intestinal et systémique, ainsi que sur la barrière intestinale, l'apparition de désordre métabolique et le microbiote intestinal, chez la descendance mâle et femelle selon le temps.

3.3 Importance de la période d'exposition au BPA : différences potentielles entre exposition gestationnelle et lactationnelle

Nos deux études ont été effectuées lors d'une exposition périnatale au BPA sans distinction entre la période d'exposition gestationnelle et lactationnelle. Or, le système immunitaire et la fonction « barrière » de l'intestin se mettent en place à la fois avant et après

la naissance chez l'Homme tout comme chez la souris (Renz et al., 2011) (Figure 45). En effet, l'intestin du fœtus exprime le peptide antimicrobien CRAMP (*Cathelicidin-Related Antimicrobial Peptide*), expression qui est également retrouvée après la naissance et jusqu'au sevrage, où une transition vers l'expression de peptides antimicrobiens comme RegIIIγ par les cellules de Paneth s'effectue. Les plaques de Peyer et les MLN sont présents durant l'embryogénèse et deviennent matures dès la naissance. Par contre, la formation d'autres organes lymphoïdes secondaires comme les cryptopatchs et les ILF survient plus tardivement après la naissance. De plus, la domiciliation des lymphocytes comme les lymphocytes innés LTi, les cellules NK, les IEL et les Th2 provenant du foie vers l'intestin intervient après la naissance, alors que le recrutement des Treg apparaît avec la mise en place du microbiote intestinal (post-natal). Enfin, le nouveau-né est « protégé » par les IgA provenant du lait de la mère et malgré le fait que les LB soient présents dans l'intestin très tôt lors du développement, ce n'est qu'après le sevrage que sont générés les plasmocytes à IgA. Une altération de ces paramètres immunitaires développementaux aussi bien post- que pré-natale peut avoir des effets délétères sur le bon développement du système immunitaire intestinal et, par voie de conséquences, celui du compartiment systémique.

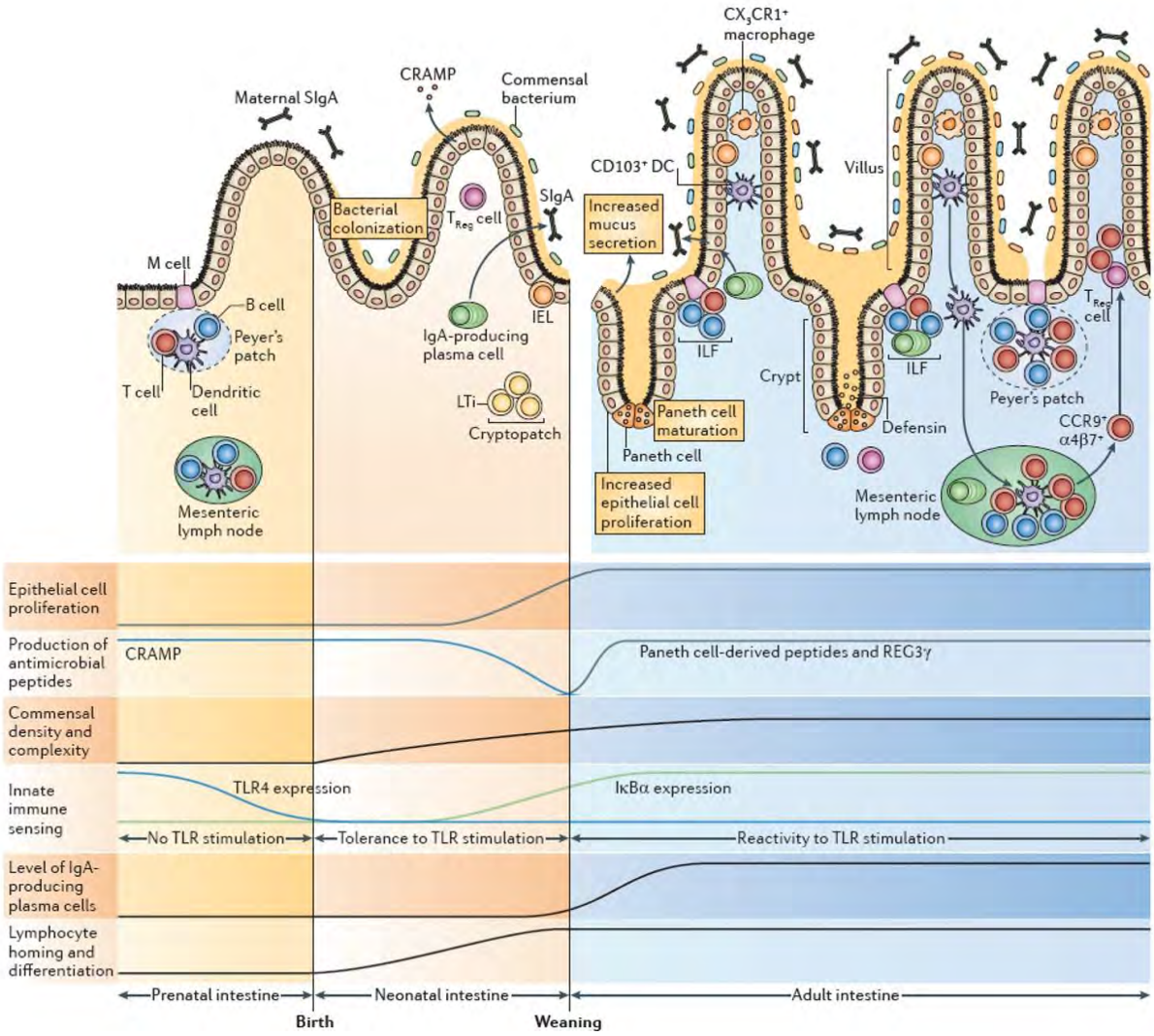


Figure 45 : Développement et maturation de la barrière ainsi que du système immunitaire intestinal lors de la période pré- et post-natal (Renz et al., 2011).

Or, nous savons que le BPA libre peut se retrouver dans le fœtus lors d'un passage et d'une déconjugaison transplacentaire de BPA-glucuronidé (une conjugaison qui pour rappel bloque l'activité hormonale de ce composé) de la mère vers le fœtus (Balakrishnan et al., 2010; Houdeau, 2011). Le fœtus est donc en présence de BPA libre (i.e. actif) en concentration non négligeable. Qui plus est, la concentration dans le liquide amniotique étant identique à celle circulante de la mère, la conjonction de ces deux phénomènes est par consensus considérée comme un danger majeur pour le développement fœtal. En effet, le BPA est un PE de type estrogéno-mimétique et l'exposition intra-utérine à de tels PE affecte le développement normal du fœtus, menant entre autres à des différences morphologiques et sexuels (Ünüvar and Büyükgebiz, 2012). Nous savons également qu'une mère exposée au BPA pendant la lactation

présente une contamination de son lait maternel par ce composé à des concentrations certes faibles (> ng) mais potentiellement suffisantes pour induire des troubles du développement du nouveau-né (Zimmers et al., 2014). Une étude cherchant a trouvé la fenêtre d'exposition critique au BPA, lors de la périnatalité, a montré que le BPA à 100µg/kg de poids corporel/jour avait plus d'impact à long-terme sur l'homéostasie du glucose lors d'une exposition gestationnelle par rapport à une exposition lactationnelle seule chez la descendance souris mâle (Liu et al., 2013). Le BPA pourrait donc altérer le développement du système immunitaire préférentiellement pendant la période fœtale et/ou la période néonatale.

Au vu de ces données et de ces constatations, il aurait été intéressant d'effectuer une expérimentation dissociant exposition gestationnelle et lactationnelle au BPA afin d'étudier les effets sur le système immunitaire intestinal et systémique de la descendance. La comparaison des résultats avec ceux de nos deux études permettrait de comprendre l'impact de la lactation dans les dérégulations du système immunitaire par le BPA.

4. Etude préliminaire sur les effets *in vivo*, *ex vivo* et *in vitro* d'une exposition aux BPS et BPF en comparaison avec le BPA

Suite à la caractérisation dees impacts d'une exposition périnatale au BPA, nous nous sommes intéressés aux effets du BPS et du BPF. Pour rappel, ces deux analogues structuraux du BPA sont déjà utilisés comme substituts au produit mère dans l'impression thermique. Le BPS est également retrouvé comme monomère pour la fabrication de polycarbonates, dont certains sont autorisés au contact des denrées alimentaires. Le BPF trouve aussi une application dans les résines époxy pour l'habillage interne des boîtes de conserve (résine BFDGE), mais n'est autorisé pour cette application qu'en dehors de l'Union Européenne. Le BPS est retrouvé dans les urines et le lait maternel au sein des populations dans les grands pays industrialisés (Andra et al., 2015). A l'exemple du BPA, il est également connu pour avoir des propriétés estrogéno-mimétiques et entre dans la catégorie des PE (Rochester and Bolden, 2015). Le BPF est lui aussi détecté dans les urines, notamment aux Etats-Unis et il possède également, à l'exemple des autres bisphénols, des propriétés estrogéno-mimétiques (Rochester and Bolden, 2015). Peu de littérature renseigne les effets « santé » de ces composés, notamment leurs impacts sur le développement du système immunitaire. Ainsi, nous avons effectué une étude préliminaire in vivo, ex vivo et in vitro afin de caractériser les impacts d'une exposition au BPS et BPF en comparaison avec le BPA sur le système immunitaire.

4.1 Impacts d'une exposition périnatale au BPS et BPF en comparaison avec le BPA sur le système immunitaire de la descendance souris femelle

Nous avons exposé des souris C3H/HeN gestantes au BPS, BPF et BPA aux doses 5 et 50 µg/kg de poids corporel/jour ou au solvant selon le même protocole décrit précédemment dans nos deux études précédentes. La descendance femelle adulte a ensuite été étudiée au jour 70 et la fréquence des Th1, Th17 et des Treg ainsi que la production d'IFN-γ et d'IL-17 après restimulation CD3/CD28 ont été déterminées dans la LP du jéjunum et la rate de ces individus. L'ensemble des résultats est représentatif d'une seule expérience qui nécessite d'être reproduite pour pouvoir tirer des conclusions définitives (Figure 46).

Concernant le BPA, utilisé ici comme produit de référence, les observations sont venues conforter les résultats obtenus lors de la première étude (Malaisé et al., 2017). Ainsi, l'exposition périnatale au BPA à 50 µg/kg de poids corporel/jour induit une augmentation de la fréquence des Th17 et de la production d'IL-17 associée dans la LP et la rate, accompagnée d'une augmentation de la fréquence des Th1 et de la production d'IFN-γ dans la rate et d'une diminution de la fréquence des Treg dans la LP et la rate de la descendance femelle. L'exposition périnatale au BPA à la plus faible dose (5µg/kg de poids corporel/jour), proche de la DJT actuelle en Europe, a un effet limité sur ces différentes cibles. En effet, seule la fréquence des Th1 et des Th17 dans la rate de la descendance est impactée de façon identique en comparaison de la dose de référence à 50 µg/kg de poids corporel/jour. Cependant, les autres paramètres étudiés (production d'IFN-γ et d'IL17, fréquence des Treg) suivent malgré tout la même tendance que la plus forte dose.

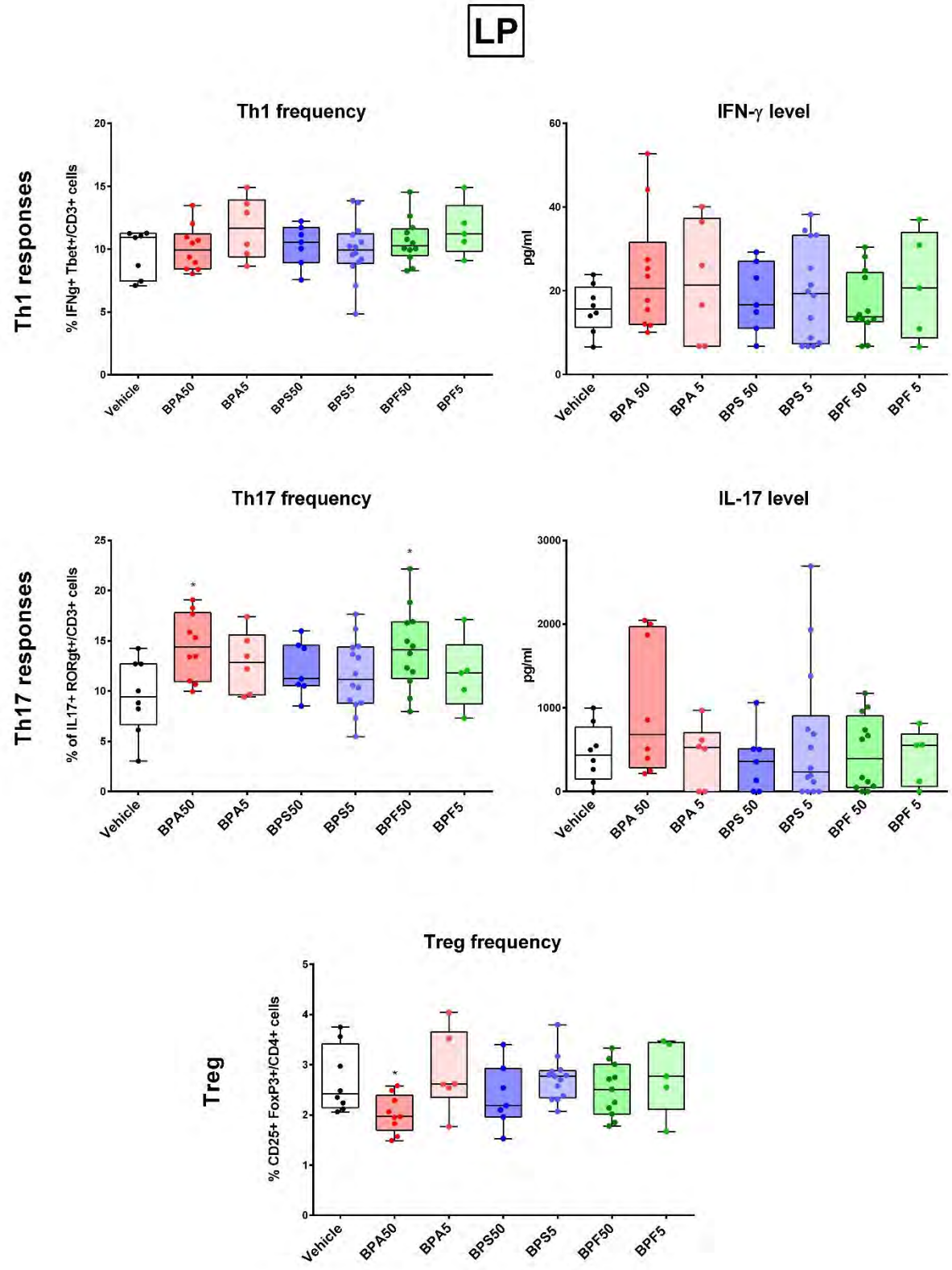
Concernant les deux autres composés, l'exposition périnatale au BPS aux deux doses étudiées a montré peu d'effet sur la fréquence des populations de cellules immunitaires, de même que sur la production des cytokines dans la LP de la descendance femelle. Dans la rate, la fréquence des Th1 et la production d'IFN-γ est augmentée par le BPS (significativement seulement pour la fréquence des Th1 et à la plus faible dose de 5 µg/kg de poids corporel/jour), avec une diminution de la fréquence des Treg aux deux doses. De manière intéressante, seule la faible dose de 5µg/kg de poids corporel/jour a les mêmes effets délétères que le BPA sur la fréquence des Th17 et la production d'IL-17 dans la rate de la descendance. En effet, cette dose de BPS augmente la fréquence des Th17 et, de manière significative, la production d'IL-17.

Nous avons observé que l'exposition périnatale au BPF suit un profil similaire à celui du BPA chez la descendance femelle au sein de la LP sur la sous-population Th17. En effet, à

la dose 50 µg/kg de poids corporel/jour, le BPF augmente la fréquence des Th17 mais sans altérer la production d'IL-17 dans la LP de la descendance. Il n'a cependant que peu d'effets sur les autres paramètres étudiés dans la LP de ces individus. Dans la rate, le BPF montre, comme le BPA, plus d'impact à la dose 50 µg/kg de poids corporel/jour : il augmente la fréquence des Th1 et des Th17 ainsi que la production d'IFN-γ et d'IL-17, sans qu'aucun changement de la fréquence des Treg ne soit observé. A 5 µg/kg de poids corporel/jour de BPF, seules la fréquence des Th1 et la production d'IFN-γ sont augmentées dans la rate de la descendance.

En conclusion des expériences *in vivo*, nous avons constaté que l'exposition périnatale au BPF et au BPS présente impacts similaires sur le système immunitaire intestinal et systémique de la descendance femelle en comparaison du BPA à 50µg/kg de poids corporel/jour (BPA50), avec quelques différences qu'il convient de souligner. Tout d'abord, le BPS mime les effets du BPA50 mais seulement à la dose la plus faible et essentiellement dans le compartiment systémique. Le BPS semble donc impacter différemment le système immunitaire, ce qui laisse suggérer un mécanisme d'action différent de celui du BPA. Au contraire, le BPF est le composé qui partage le plus de similitudes avec le BPA50, avec des effets comparables à la dose la plus forte dans la LP et la rate de la descendance femelle. Il est donc suggéré que le BPF possède un mécanisme d'action proche de celui du BPA.

Les différences observées selon la dose de BPS et de BPF soulèvent des interrogations par rapport à leur toxicité. Il aurait été intéressant de déterminer la fréquence des ILC3 ainsi que l'activité de RALDH1 dans la LP de la descendance femelle après exposition périnatale au BPS ou BPF, pour vérifier si les impacts relèvent du même précurseur suspecté (i.e. les ILC3) qu'avec le BPA. Nos observations préliminaires confortent malgré tout le fait que le BPS et le BPF ne sont pas des alternatives inertes et inoffensives au BPA. Il reste cependant de nombreux paramètres à caractériser. En effet, de notre première étude nous avons démontré que les altérations de l'homéostasie du système immunitaire sont associées à une dysbiose intestinale, une altération de l'intégrité et des systèmes de défense de la barrière intestinale ainsi qu'une augmentation de la susceptibilité à l'intolérance alimentaire et aux infections chez ces individus. De plus, l'exposition périnatale au BPA a des impacts différents selon la descendance mâle ou femelle. Il serait donc intéressant d'observer l'impact d'une exposition périnatale au BPS et au BPF sur ces paramètres à la fois chez les deux sexes.


LP
Th1 responses
Th1 frequency
% IFNg+ Tbet+/CD3+ cells
IFN-γ level
pg/ml
Th17 responses
Th17 frequency
% of IL17+ RORgt+/CD3+ cells
IL-17 level
pg/ml
Treg
Treg frequency
% CD25+ FoxP3+/CD4+ cells
Vehicle
BPA50
BPA5
BPS50
BPS5
BPF50
BPF5
BPA 50
BPA 5
BPS 50
BPS 5
BPF 50
BPF 5

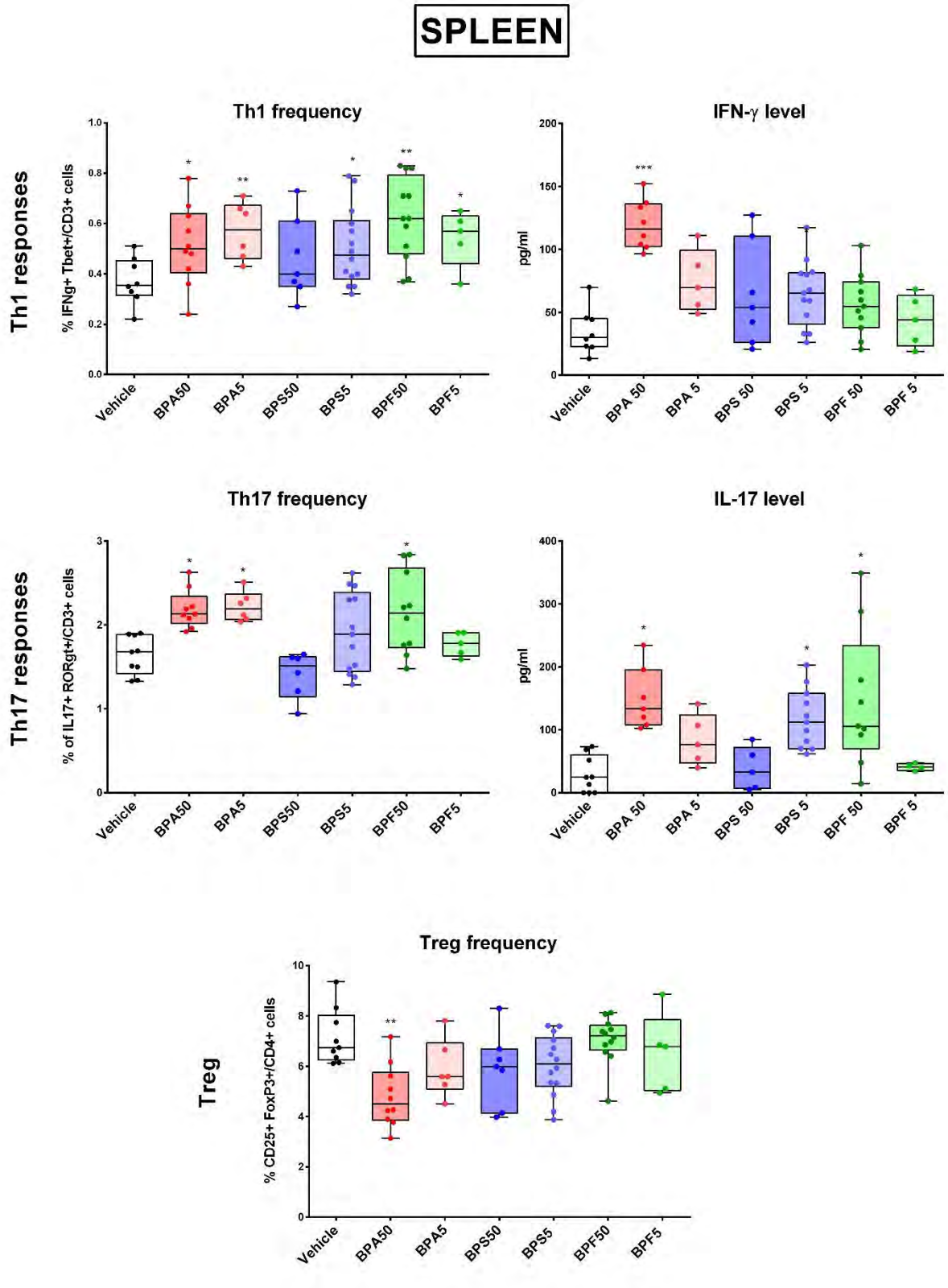


Figure 46 : Impacts d'une exposition périnatale au BPA, BPS et BPF à la dose de 5 et 50 µg/kg de poids corporel/jour sur la réponse Th1, Th17 et sur la fréquence des Treg dans la LP et la rate de la descendance souris femelle au jour 70.

4.2 Impacts du BPA, BPS et BPF sur la différenciation de LT naïfs spléniques

Au vu des impacts prononcés du BPA, BPS et BPF sur le système immunitaire systémique et du fait de la différence d'effets selon le composé et la dose, nous avons posé l'hypothèse que ces trois composés avaient comme cible commune le processus de différenciation des LT naïfs en Th17 ainsi que la production d'IL-17 associée. Nous avons étudié les effets d'une exposition directe de ces trois composés aux doses de 0 (véhicule : éthanol 0,005%), 0,05, 5, 500 et 50000 nM sur des LT naïfs isolés de rate de souris femelles C3H/HeN lors d'une différenciation en Th17 (protocole en annexe) (Figure 47).

Nous avons tout d'abord remarqué que le BPA aux faibles doses (0,05 et 5 nM) augmente la différenciation des LT naïfs en Th17 (tendance à 0,05 nM, devenant significatif à 5 nM), sans altération de la production d'IL-17 par ces cellules. De plus, à plus forte dose (500 et 50000 nM), le BPA tend au contraire à diminuer la différenciation des LT naïf en Th17 avec une baisse significative de la production d'IL-17 par ces cellules seulement à partir de 50000 nM.

De manière surprenante, nous avons constaté que le BPS a un tout autre impact. Quelle que soit sa concentration, le BPS inhibe la différenciation des LT naïfs en Th17 alors qu'il augmente la production d'IL-17 aux doses de 0,05, 5 et 500 nM (significativement seulement à la dose 5 nM) et sans aucun effet à la dose la plus forte.

Enfin, nous n'avons observé aucun changement dans la différenciation des LT naïfs en Th17 quelle que soit la dose de BPF. Cependant, le BPF aux faibles doses (0,05 et 5 nM) augmente la production d'IL-17 de ces cellules, sans aucune altération aux plus fortes doses (500 et 50000 nM).

En reprenant l'ensemble de ces données, on peut se rendre compte d'une certaine spécificité d'action de ces trois bisphénols sur la différenciation des LT naïfs en Th17. Cependant, si le BPA augmente cette différenciation à faible dose avec des impacts délétères à forte dose, le BPS au contraire la diminue alors que le BPF a des effets sur la production d'IL-17 seule et à faible dose. De manière surprenante, les altérations de la différenciation des LT naïfs en Th17 par ces trois composés ne sont pas corrélées avec la production d'IL-17, hormis pour la plus forte dose de BPA. La fréquence des Th17 est déterminée par un marquage phénotypique IL-17 et RORγt, sans prendre en compte l'intensité de fluorescence de ces marqueurs. Il est donc possible que le BPS ou le BPF induisent la production d'IL-17 en augmentant l'expression et/ou l'activité de RORγt dans ces mêmes cellules, tout en diminuant

la différenciation et/ou la survie des Th17. Il serait donc intéressant de tester la survie cellulaire de cette sous-population de cellules T et de mesurer l'expression génique et protéique ainsi que l'activité de RORγt des Th17 en présence de BPS ou de BPF.

Bien que ces résultats *ex vivo* ne permettent pas d'extrapoler sur les observations *in vivo*, nous pouvons tirer la conclusion que les bisphénols, malgré leur similarité structurelle, présentent des mécanismes d'action moléculaire distincts sur une cible spécifique comme le système immunitaire.

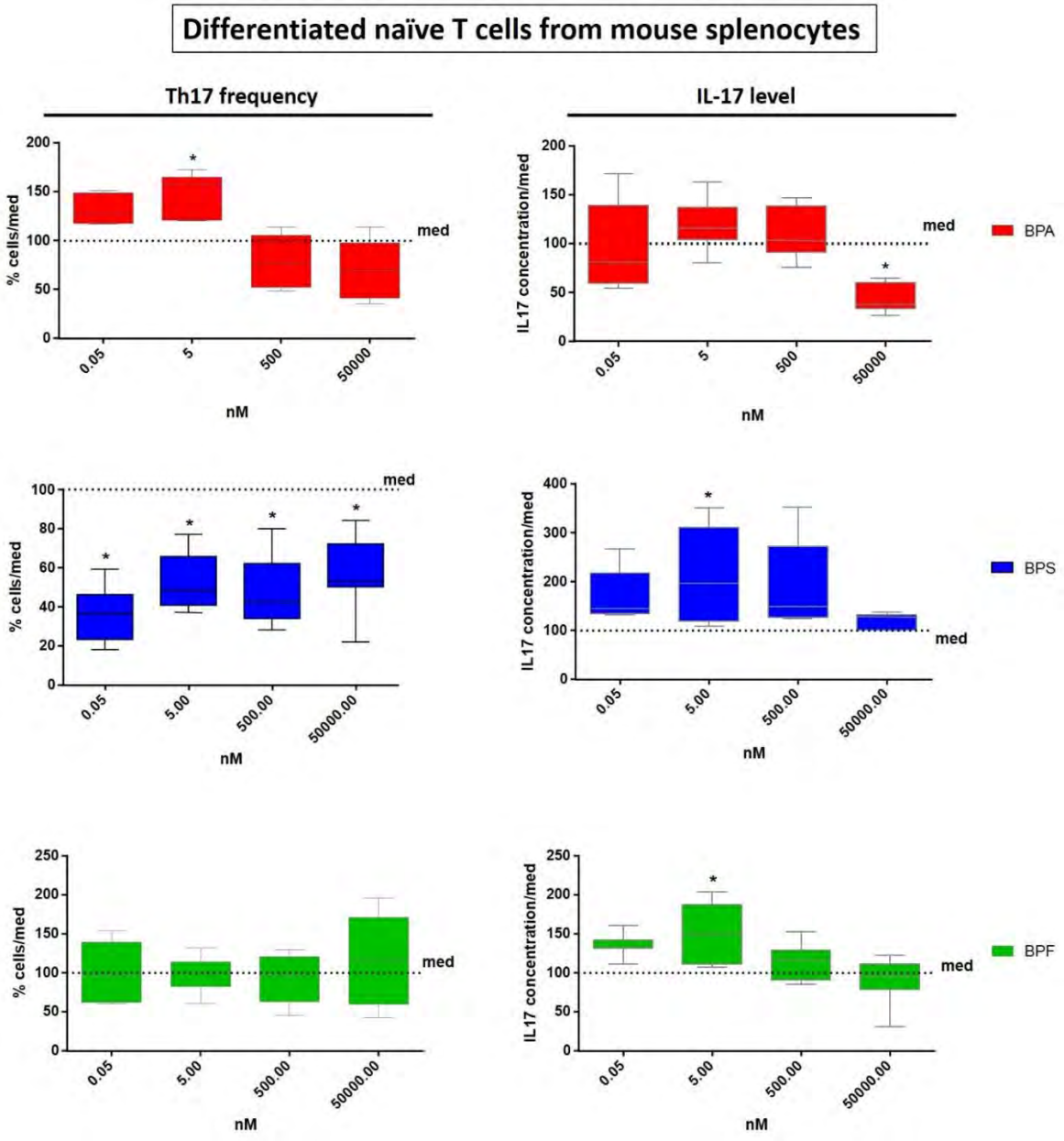


Figure 47 : Impacts du BPA, du BPS et du BPF à 0,05, 5, 500 et 50000 nM sur la différenciation des LT naïfs en Th17 et sur la production d'IL-17 après re-stimulation CD3/CD28.

4.3 Impacts du BPA, BPS et BPF sur l'activité de AhR

Pour tenter d'apporter une explication quant aux différences d'impacts des trois bisphénols sur la différenciation des LT naïfs en Th17 et la production d'IL-17 associée, nous nous sommes intéressés à la possible interaction du BPA, BPS et BPF avec AhR et de la modulation d'activité de ce récepteur par ces composés. Pour rappel, AhR régule les réponses biologiques contre les hydrocarbures aromatiques et métabolise les xénobiotiques *via* l'expression des enzymes du cytochrome P450 notamment CYP1A1. Il est également impliqué dans le processus de différenciation des Th17 et des Treg, en agissant de manière synergique avec les facteurs de différenciation des Th17 et en augmentant l'expression de FoxP3, respectivement (Quintana et al., 2008; Zhou, 2016). Au vu des résultats observés *in vivo* et *ex vivo*, nous avons émis l'hypothèse que les différences observées, concernant les effets du BPA, BPS et BPF, pouvaient être imputés à des divergences d'impact sur l'activité d'AhR.

Nous avons testé notre hypothèse sur deux modèles cellulaires : un premier modèle mesurant l'expression de CYP1A1 par Q-PCR dans des cellules Caco-2 (exposées aux BPA, BPS ou BPF à diverses concentrations et/ou au TCDD (agoniste d'AhR)). Le deuxième modèle repose sur l'utilisation de la lignée hépatocytaire murine H1L1.1c2 - lignée transformée exprimant la luciférase sous promoteur DRE (site de fixation d'AhR) - où l'activité d'AhR en présence de ces trois composés et/ou du TCDD est mesurée par un test d'activité à la luciférase (protocole en annexe).

4.3.1 Modèle Caco-2

Dans le premier modèle (i.e. cellules Caco-2), nous avons observé que le BPA n'est capable d'activer AhR qu'à compter de 100 µM, augmentant de plus de huit fois l'expression de CYP1A1 par rapport au contrôle, avant d'être cytotoxique à 1 mM (Figure 48a). Le BPS et le BPF agissent différemment sur l'activation d'AhR par rapport au BPA. En effet, à 100 µM, le BPS et le BPF ne multiplient que d'un facteur de deux l'expression de CYP1A1, avant d'être également cytotoxique à 1 mM. Les différences structurelles entre le BPS et le BPF par rapport au BPA pourraient expliquer des divergences dans leur potentiel d'activation d'AhR. Cependant, il est important de souligner que la forte activation d'AhR en présence de BPA ne se produit qu'à de très fortes doses, très au-delà des niveaux circulants chez l'homme, donc non

représentative de l'exposition humaine à ce PE. Cependant, ces résultats démontrent que les bisphénols ont la capacité d'activer AhR.

Nous avons ensuite voulu tester si le BPA à une dose faible (donc inactif sur l'activité d'AhR) pouvait présenter un effet synergique sur la réponse de ce récepteur en présence d'une très faible concentration de TCDD, qui est un puissant agoniste d'AhR. Nous avons utilisé la dose à faible effet de 1 nM pour le BPA et la dose 0,1 nM de TCDD, cette dernière augmentant de 16 fois l'expression de CYP1A1. En mélange, nous avons observé un effet synergique du BPA sur la réponse au TCDD, augmentant de plus de 23 fois l'expression de CYP1A1 dans ces cellules (Figure 48b). Ces résultats concluent au potentiel synergique du BPA à faible dose sur l'activation d'AhR en présence d'un agoniste « fort ». Cependant, le TCDD étant un agoniste non naturel d'AhR, il serait intéressant de tester l'effet synergique du BPA avec un agoniste naturel comme le 6-formylindolo[3,2-b]caracole (FICZ). Le FICZ est un dérivé de tryptophane capable d'induire des réponses différentes de celles observées avec une activation par le TCDD. En effet, à faible dose, le FICZ n'induit pas la différenciation des Treg mais augmente la production d'IL-17, ce qui peut être une piste de compréhension pour les effets du BPA observés *ex vivo* (Ehrlich et al., 2017).

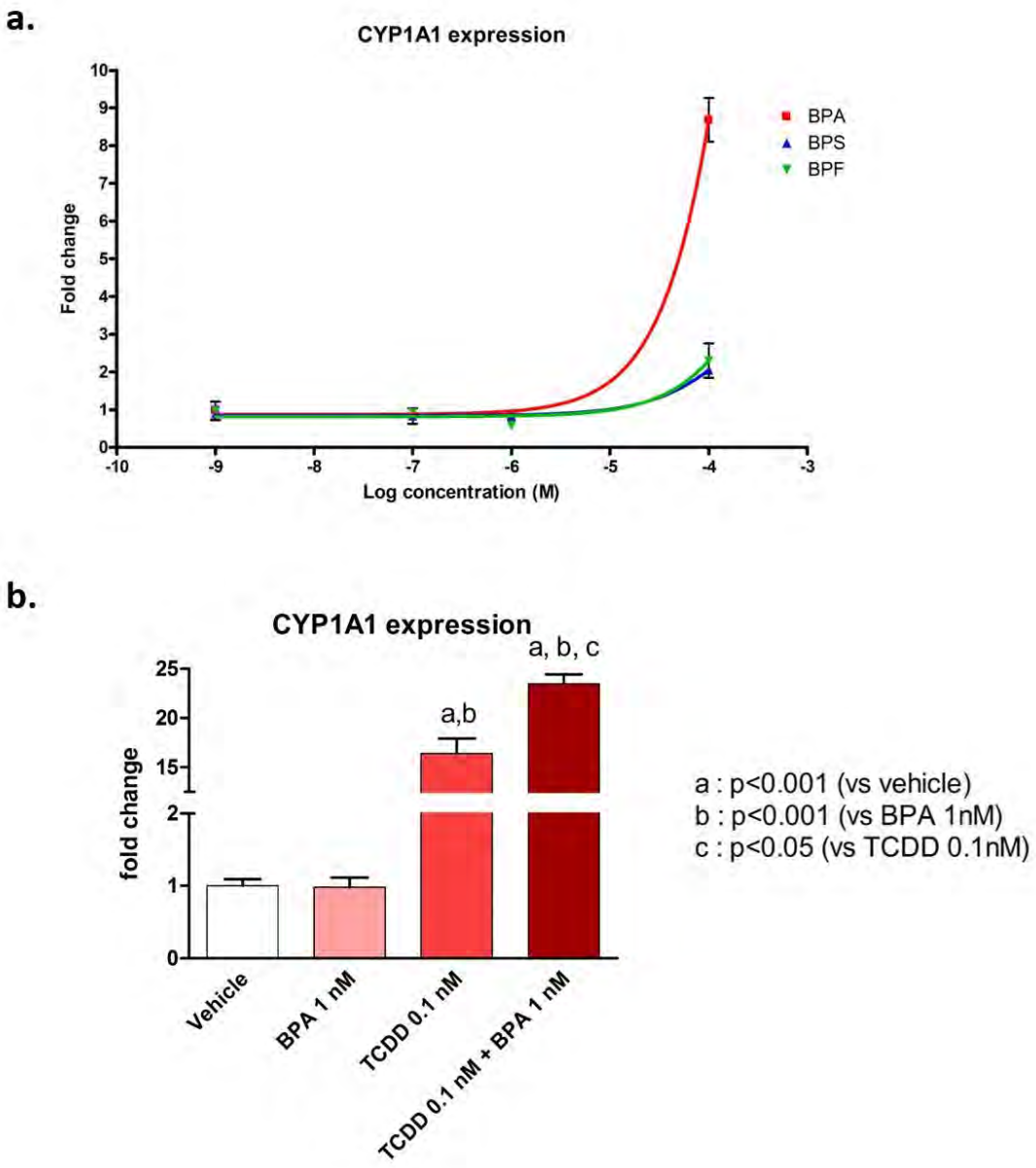


Figure 48 : Expression génique de CYP1A1 dans les cellules Caco-2 après traitement BPA, BPS ou BPF à 1 nM, 100 nM, 1µM et 100µM (a.) et après traitement BPA 1nM et/ou TCDD 0,1 nM (b.).

4.3.2 Modèle H1L1.1c2

En utilisant le second modèle cellulaire (i.e. hépatocytes H1L1.1c2), nous avons souhaité tout d'abord caractériser l'effet « dose-réponse » des bisphénols sur l'activité d'AhR selon une gamme de concentrations (0,1 nM jusqu'à 100 µM) similaire à celle utilisée avec le modèle Caco-2.

De manière surprenante, nous avons observé un profil de réponse différent à celui obtenu avec les cellules Caco-2 (Figure 49a). Ainsi, le BPA présente une courbe non-monotone, caractérisée par une faible activation d'AhR à partir de 0,1 nM, absente au-delà de 1 nM et réapparaissant à forte concentration dès 100 µM. Contrairement au premier modèle, le BPA augmente l'activité d'AhR de seulement 50% (pour rappel, modèle Caco-2 : activité 8 fois plus importante). Le BPS, de 0,1 nM à 10 µM, inhibe légèrement (15%) l'activité d'AhR puis l'augmente de 45% à partir de 100 µM, de façon comparable au BPA. Le BPS quant à lui suit une courbe dose-réponse monotone, diminuant l'activité d'AhR de 20% à 0,1 nM et 1 nM, revenant au niveau basal à 10 nM et 1 µM puis augmentant à 10 et 100 µM (10 et 20% respectivement).

Les distinctions observées par rapport au premier modèle peuvent être expliquées par une différence d'expression d'AhR, des ER nucléaires et/ou des ER membranaires. En effet, pour rappel, il existe un cross-talk entre les ER et AhR, pouvant complexifier l'interprétation des résultats. De plus, les cellules Caco-2 proviennent d'un adénocarcinome colorectal humain, alors que les cellules H1L1.1c2 sont une lignée hépatocytaire murine transformée, et ces deux lignées expriment très certainement différemment l'ensemble de ces récepteurs. Il serait intéressant, tout d'abord, de caractériser l'expression protéique de ces récepteurs, puis de tester l'effet des inhibiteurs des ER nucléaires (ICI-182,780) et des GPR30 (G-15) sur l'activité d'AhR en présence des bisphénols dans les deux modèles afin de connaitre la réelle implication d'AhR dans les effets observés.

En utilisant ce modèle AhR-luciférase, nous avons également testé l'effet synergique des bisphénols en présence de TCDD. Pour cela, nous avons comparé l'effet dose-réponse du TCDD (0,1 pM à 100nM) avec ou sans ajout d'une dose de 1 nM de BPA, BPS ou BPF (Figure 49b). Nous avons ainsi calculé la concentration efficace médiane (EC_{50} - concentration d'un composé où 50 % de l'effet maximal est observé) et l'efficacité (E_{max}) de chacune des conditions. Nous avons observé que le BPA à très faible dose diminue l'EC_{50} du TCDD (de 152 à 83 pM) et augmente l'E_{max} (de 8239 à 8654%), démontrant un effet synergique du BPA. Le BPS modifie peu l'EC_{50} du TCDD mais il diminue son E_{max} (de 8239 à 7783%), démontrant que le BPS contrairement au BPA a peu d'effet sur l'activation d'AhR par le TCDD. De façon comparable, le BPF n'a pas d'effet sur l'EC_{50} du TCDD, mais il diminue énormément son E_{max} (de 8239 à 5994%), démontrant que le BPF inhibe le maximum d'activation d'AhR. L'ensemble de ces résultats conforte le fait que le BPA, le BPS et le BPF agissent de manière

divergente sur cette cible moléculaire. Il serait également intéressant de reproduire ces expériences avec un ligand endogène comme le FICZ.

En prenant en compte l'ensemble des résultats *ex vivo* et *in vitro*, nous ne pouvons pas extrapoler de mécanisme(s) clair(s) susceptible(s) d'expliquer les effets des bisphénols sur l'activité d'AhR, ou encore de conclure que leurs effets distincts sur la différenciation des T naïf en Th17 reposent exclusivement sur une modulation de l'activité de ce récepteur. Il serait également intéressant d'étudier les effets de ces bisphénols avec et sans la présence d'estradiol sur l'activité des ER en utilisant des cellules transformées exprimant la luciférase sous promoteur ERE, afin de savoir si les effets observés *ex vivo* proviennent principalement d'une altération de la réponse à l'estradiol.

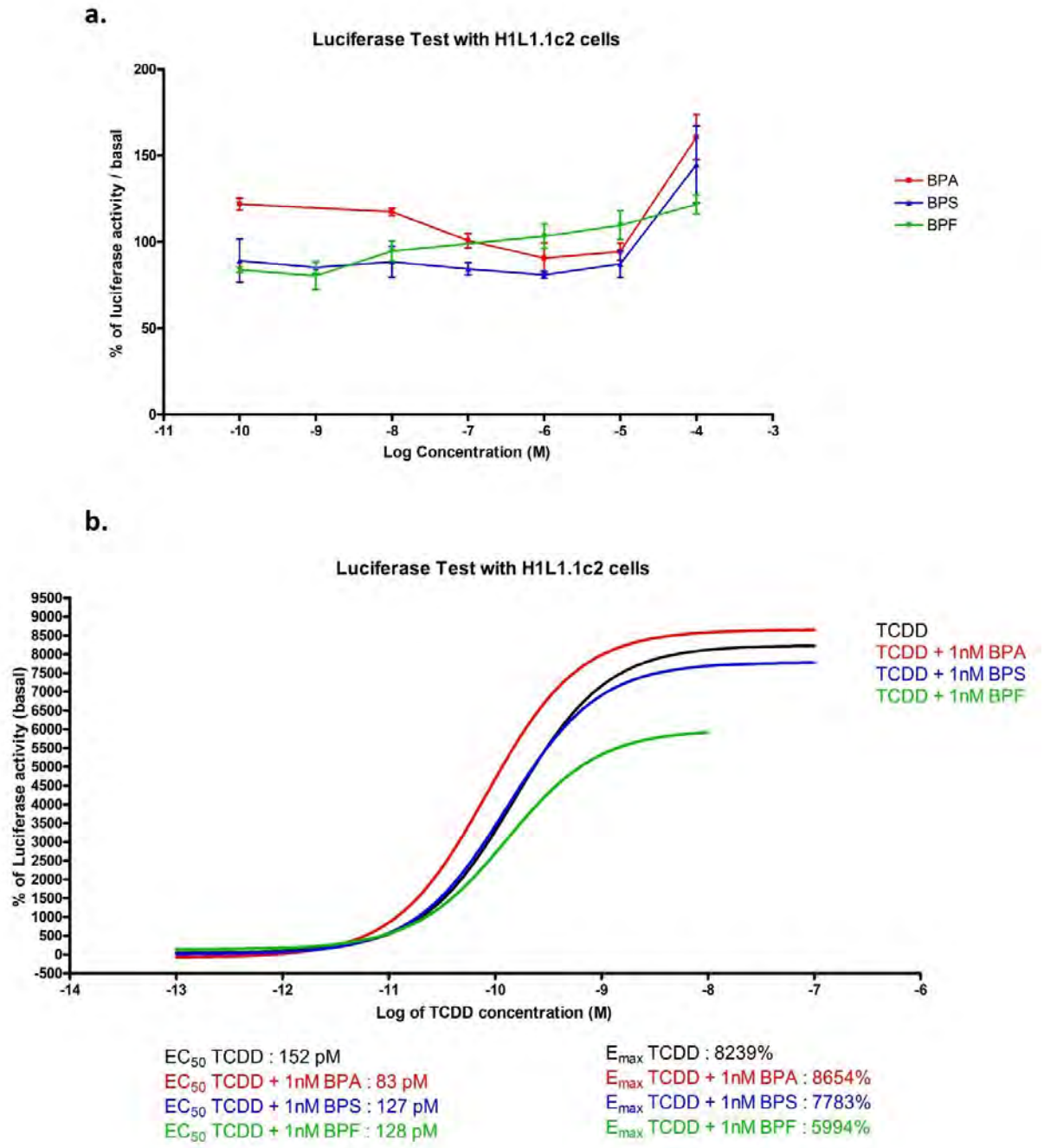


Figure 49 : Activation d'AhR selon un système de reporter luciférase dans les cellules H1L1.1c2 après traitement BPA, BPS ou BPF de 0,1 nM à 100 µM (augmentation d'un facteur 10) et après traitement TCDD de 0,1 pM à 100 nM (augmentation d'un facteur 10) avec ou sans BPA, BPS ou BPF à 1nM.

Conclusions et perspectives

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Au cours de ce travail de thèse, j'ai mis en évidence que l'exposition périnatale au BPA à 50 µg/kg de poids corporel/jour altère, chez la descendance souris femelle, l'homéostasie de la fonction barrière de l'intestin ainsi que le développement du système immunitaire innée et adaptatif tant dans l'intestin et que dans le compartiment systémique. Ces altérations peuvent expliquer la prédisposition de la descendance à l'intolérance alimentaire et aux infections intestinales à l'âge adulte. Il est cependant important de noter que ces altérations dans le développement du système immunitaire et de la barrière intestinale peuvent être à la fois la cause et la conséquence d'une dysbiose intestinale. D'autres investigations sont nécessaires pour établir le mécanisme initiateur de tels effets en période périnatale.

Le travail de thèse a également révélé que l'exposition périnatale au BPA à 50 µg/kg de poids corporel/jour a un impact différent chez la descendance souris mâle. Cette exposition entraîne des altérations de l'homéostasie du système immunitaire associées à une dysbiose intestinale et une tolérance au glucose diminuée à l'âge adulte. Chez la souris, ces évènements précèdent le développement du phénotype obèse et des troubles de la sensibilité à l'insuline. De telles données apportent un niveau de compréhension supplémentaire sur la cinétique de développement de syndromes métaboliques en réponse à une exposition périnatale au BPA. Des études complémentaires restent nécessaires pour déterminer si cette variété d'effets touchant le système immunitaire, le métabolisme et le microbiote intestinal est transmis de la mère au fœtus puis au nouveau-né, où s'ils résultent d'une voie d'action directe du BPA sur le fœtus en développement.

Dans une étude préliminaire d'exposition périnatale chez la souris, nous avons apporté un premier regard sur les impacts du BPS et du BPF, analogues substitutifs du BPA, sur la modulation du système immunitaire intestinal et systémique chez la descendance femelle. De par les modulations importantes du BPS et du BPF sur le système immunitaire systémique et sur le mécanisme de différenciation de la sous-population Th17, essentielle pour l'équilibre du système immunitaire, cette étude conforte la littérature récente qui démontre que le BPS et le BPF à faible et moyenne dose (5 et 50 µg/kg de poids corporel/jour) ne sont pas des alternatives inoffensives au BPA. Cette étude nécessite cependant d'être confirmée. Il est également important de démontrer les effets de ces bisphénols sur le développement de pathologies tel que l'intolérance alimentaire ou la surinfection par un pathogène. De plus, il est nécessaire

d'apporter des précisions supplémentaires sur leurs impacts sur le développement d'autres sous-populations du système immunitaire régulant l'homéostasie, ainsi que sur le microbiote intestinal. Le BPA ayant des effets différents chez le mâle par rapport à la femelle, il est tout aussi important de caractériser les effets d'une exposition périnatale au BPS et au BPF chez la descendance mâle.

Enfin, il est désormais primordial de déterminer une DJT définitive pour ces trois bisphénols en prenant en compte leurs capacités immunomodulatrices, afin de règlementer et de limiter au maximum l'exposition humaine à ces composés potentiellement nocifs.

Annexe

Annexe

Protocole de différenciation des LT naïfs de rate de souris en Th17

Les splénocytes sont isolés à partir de rates de souris C3H/HeN femelles selon le protocole décrit dans les deux études publiées. Les cellules $CD4^+$ naïves sont triée grâce au kit Naïve $CD4^+$ T Cell Isolation (Miltenyi biotec) selon le protocole du fabricant. En bref, le culot cellulaire est repris avec 400µL de tampon MACS pour 10^8 cellules totales. 100µL de Biotin-Antibody Cocktail sont ensuite ajoutées et le tout est mélangé et incubé 5 minutes au frigo (2-8°C). 200µL de tampon MACS sont ajoutés ainsi que 200µL d'Anti-Biotin MicroBeads et 100µL de CD44 MicroBeads. Le tout est mélangé puis incubé 10 minutes au frigo (2-8°C). Les cellules sont ensuite reprises dans 500µL de tampon puis déposées sur une colonne LS préalablement lavée, avec un Pre-Separation Filter 30µm par-dessus, prêt d'un aimant. Les cellules $CD4^+$ naïves ainsi récupérées sont comptées et leur viabilité est testée par une coloration au bleu trypan. Les $CD4^+$ naïves sont ensuite déposées dans des plaques préalablement coatées CD3/CD28 et sont polarisées grâce au kit cytobox TH17 (Miltenyi biotec). Après 24h, le BPA, le BPS ou le BPF (repris dans l'éthanol) sont rajoutés à 0,05, 5, 500 ou 50000 nM (véhicule : éthanol 0,005%). Après 72h, les surnageants sont récupérés pour dosage ELISA de l'IL-17. Les cellules sont stimulées avec de la PMA, de la ionomycine puis bloquées avec de la brefeldin A. Elles sont ensuite identifiées par phénotypage Th17, selon le protocole décrit précédemment.

Protocole de test d'activité d'AhR

Les cellules Caco-2 sont déposées à 1.10^6 cellules par puits dans des plaques 6 puits. 24h après les cellules sont traitées avec du BPA, du BPS ou du BPF (repris dans l'éthanol) à 1 nM, 100 nM, 1µM et 100µM et avec du BPA à 1nM et/ou du TCDD (repris dans le DMSO) à 0,1 nM, pendant 24h (véhicule : 0,01% DMSO). Les ARNm sont ensuite extraits, reverse-transcrits et testés en QPCR pour l'expression de CYP1A1 et avec comme gène de ménage le L13A et la GAPDH (glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase). L'expression relative de CYP1A1 est calculée selon la méthode des ΔΔCt ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) et est normalisée par rapport à l'expression du L13A et de la GAPDH.

CYP1A1 : f-CAGTACCTCAGCCACCTCCAAG, r-AGCATGTGCCCAATCAGAGG ; L13A : f-AAGTACCAGGCAGTGACAG, r-CCTGTTTCCGTAGCCTCATG ; GAPDH : f-TGCACCACCAACTGCTTAGC, r- GGCATGGACTGTGGTCATGAG.

Les cellules H1L1.1c2 sont déposées à 1.105 cellules par puits dans des plaques 96 puits blanches à fond transparent. Après 24h, les cellules sont traitées avec du BPA, BPS ou BPF de 0,1 nM à 100 µM (augmentation d'un facteur 10) ou avec du TCDD de 0,1 pM à 100 nM (augmentation d'un facteur 10) avec ou sans BPA, BPS ou BPF à 1nM pendant 24h. Les cellules sont ensuite lysées et l'activité de la luciférase est dosée grâce au kit Luciferase Assay System (Promega) selon le protocole du fabricant.

Références

RÉFÉRENCES

Abdallah, M.A.-E., Harrad, S., and Covaci, A. (2008). Hexabromocyclododecanes and tetrabromobisphenol-A in indoor air and dust in Birmingham, U.K: implications for human exposure. Environ. Sci. Technol. *42*, 6855–6861.

Abdul Rasheed Md, Ravi Kumar Kola, and Prameela Devi Yalvarthy (2013). Assessment of Antibacterial Activity of Bisphenol A (4,4'-Isopropylidenebisphenol). IJIRSET *2*, 6003–6008.

Abi Abdallah, D.S., Egan, C.E., Butcher, B.A., and Denkers, E.Y. (2011). Mouse neutrophils are professional antigen-presenting cells programmed to instruct Th1 and Th17 T-cell differentiation. International Immunology *23*, 317–326.

Abrams, G.D., Bauer, H., and Sprinz, H. (1963). Influence of the normal flora on mucosal morphology and cellular renewal in the ileum. A comparison of germ-free and conventional mice. Lab. Invest. *12*, 355–364.

Abreu, M.T. (2010). Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. Nature Reviews Immunology *10*, 131–144.

Acconcia, F., Ascenzi, P., Bocedi, A., Spisni, E., Tomasi, V., Trentalance, A., Visca, P., and Marino, M. (2005). Palmitoylation-dependent estrogen receptor alpha membrane localization: regulation by 17beta-estradiol. Mol. Biol. Cell *16*, 231–237.

Agace, W.W., and Persson, E.K. (2012). How vitamin A metabolizing dendritic cells are generated in the gut mucosa. Trends Immunol *33*, 42–48.

Ahmed, S., and Atlas, E. (2016). Bisphenol S- and bisphenol A-induced adipogenesis of murine preadipocytes occurs through direct peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation. Int J Obes (Lond) *40*, 1566–1573.

Ahrens, W., Pigeot, I., Pohlabeln, H., De Henauw, S., Lissner, L., Molnár, D., Moreno, L.A., Tornaritis, M., Veidebaum, T., and Siani, A. (2014). Prevalence of overweight and obesity in European children below the age of 10. International Journal of Obesity *38*, S99–S107.

Akdis, C.A., Joss, A., Akdis, M., Faith, A., and Blaser, K. (2000). A molecular basis for T cell suppression by IL-10: CD28-associated IL-10 receptor inhibits CD28 tyrosine phosphorylation and phosphatidylinositol 3-kinase binding. FASEB J. *14*, 1666–1668.

Alang, N., and Kelly, C.R. (2015). Weight Gain After Fecal Microbiota Transplantation. Open Forum Infectious Diseases *2*, ofv004-ofv004.

Alonso-Magdalena, P., Laribi, O., Ropero, A.B., Fuentes, E., Ripoll, C., Soria, B., and Nadal, A. (2005). Low doses of bisphenol A and diethylstilbestrol impair Ca2+ signals in pancreatic alpha-cells through a nonclassical membrane estrogen receptor within intact islets of Langerhans. Environ. Health Perspect. *113*, 969–977.

Alonso-Magdalena, P., Morimoto, S., Ripoll, C., Fuentes, E., and Nadal, A. (2006). The estrogenic effect of bisphenol A disrupts pancreatic beta-cell function in vivo and induces insulin resistance. Environ. Health Perspect. *114*, 106–112.

Alonso-Magdalena, P., Vieira, E., Soriano, S., Menes, L., Burks, D., Quesada, I., and Nadal, A. (2010). Bisphenol A Exposure during Pregnancy Disrupts Glucose Homeostasis in Mothers and Adult Male Offspring. Environmental Health Perspectives *118*, 1243–1250.

Andra, S.S., Charisiadis, P., Arora, M., van Vliet-Ostaptchouk, J.V., and Makris, K.C. (2015). Biomonitoring of human exposures to chlorinated derivatives and structural analogs of bisphenol A. Environment International *85*, 352–379.

Angle, B.M., Do, R.P., Ponzi, D., Stahlhut, R.W., Drury, B.E., Nagel, S.C., Welshons, W.V., Besch-Williford, C.L., Palanza, P., Parmigiani, S., et al. (2013). Metabolic disruption in male mice due to fetal exposure to low but not high doses of bisphenol A (BPA): Evidence for effects on body weight, food intake, adipocytes, leptin, adiponectin, insulin and glucose regulation. Reproductive Toxicology *42*, 256–268.

ANSES (2013). Substances reprotoxiques et perturbateurs endocriniens Composés de la famille des bisphénols : bisphénols M, S, B, AP, AF, F et BADGE. *Rapport d'expertise collective*.

Arboleya, S., Binetti, A., Salazar, N., Fernández, N., Solís, G., Hernández-Barranco, A., Margolles, A., de Los Reyes-Gavilán, C.G., and Gueimonde, M. (2012). Establishment and development of intestinal microbiota in preterm neonates. FEMS Microbiol. Ecol. *79*, 763–772.

Arboleya, S., Sánchez, B., Solís, G., Fernández, N., Suárez, M., Hernández-Barranco, A.M., Milani, C., Margolles, A., de Los Reyes-Gavilán, C.G., Ventura, M., et al. (2016). Impact of Prematurity and Perinatal Antibiotics on the Developing Intestinal Microbiota: A Functional Inference Study. Int J Mol Sci *17*.

Asseman, C., Mauze, S., Leach, M.W., Coffman, R.L., and Powrie, F. (1999). An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. J. Exp. Med. *190*, 995–1004.

Association Santé Environnement France (2016). Enquête sur les Bisphénols en 2016.

Audebert, M., Dolo, L., Perdu, E., Cravedi, J.-P., and Zalko, D. (2011). Use of the γH2AX assay for assessing the genotoxicity of bisphenol A and bisphenol F in human cell lines. Arch. Toxicol. *85*, 1463–1473.

Ayabe, T., Satchell, D.P., Wilson, C.L., Parks, W.C., Selsted, M.E., and Ouellette, A.J. (2000). Secretion of microbicidal alpha-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. Nat. Immunol. *1*, 113–118.

Bae, B., Jeong, J.H., and Lee, S.J. (2002). The quantification and characterization of endocrine disruptor bisphenol-A leaching from epoxy resin. Water Sci. Technol. *46*, 381–387.

Bagchi, D., and Preuss, H.G. (2013). Obesity epidemiology, pathophysiology, and prevention (Boca Raton: CRC Press).

Baker, K., Lencer, W.I., and Blumberg, R.S. (2010). Beyond IgA: the mucosal immunoglobulin alphabet. Mucosal Immunology *3*, 324–325.

Balakrishnan, B., Henare, K., Thorstensen, E.B., Ponnampalam, A.P., and Mitchell, M.D. (2010). Transfer of bisphenol A across the human placenta. American Journal of Obstetrics and Gynecology *202*, 393.e1-393.e7.

Barros, R.P.A., and Gustafsson, J.-Å. (2011). Estrogen Receptors and the Metabolic Network. Cell Metabolism *14*, 289–299.

Baxter, N.T., Zackular, J.P., Chen, G.Y., and Schloss, P.D. (2014). Structure of the gut microbiome following colonization with human feces determines colonic tumor burden. Microbiome *2*, 20.

Bernier, M.R., and Vandenberg, L.N. (2017). Handling of thermal paper: Implications for dermal exposure to bisphenol A and its alternatives. PLOS ONE *12*, e0178449.

Bettelli, E., Korn, T., Oukka, M., and Kuchroo, V.K. (2008). Induction and effector functions of T(H)17 cells. Nature *453*, 1051–1057.

Bhandari, R., Xiao, J., and Shankar, A. (2013). Urinary bisphenol A and obesity in U.S. children. Am. J. Epidemiol. *177*, 1263–1270.

Biasucci, G., Rubini, M., Riboni, S., Morelli, L., Bessi, E., and Retetangos, C. (2010). Mode of delivery affects the bacterial community in the newborn gut. Early Hum. Dev. *86 Suppl 1*, 13–15.

Biedermann, S., Tschudin, P., and Grob, K. (2010). Transfer of bisphenol A from thermal printer paper to the skin. Anal Bioanal Chem *398*, 571–576.

Bloom, M.S., Kim, D., vom Saal, F.S., Taylor, J.A., Cheng, G., Lamb, J.D., and Fujimoto, V.Y. (2011). Bisphenol A exposure reduces the estradiol response to gonadotropin stimulation during in vitro fertilization. Fertility and Sterility *96*, 672–677.e2.

Bluestone, J.A., and Abbas, A.K. (2003). Natural versus adaptive regulatory T cells. Nat. Rev. Immunol. *3*, 253–257.

Blum, J.W., Zbinden, Y., Hammon, H.M., and Chilliard, Y. (2005). Plasma leptin status in young calves: effects of pre-term birth, age, glucocorticoid status, suckling, and feeding with an automatic feeder or by bucket. Domestic Animal Endocrinology *28*, 119–133.

Bodin, J., Bølling, A.K., Becher, R., Kuper, F., Løvik, M., and Nygaard, U.C. (2014). Transmaternal Bisphenol A Exposure Accelerates Diabetes Type 1 Development in NOD Mice. Toxicological Sciences *137*, 311–323.

Bolli, A., Galluzzo, P., Ascenzi, P., Del Pozzo, G., Manco, I., Vietri, M.T., Mita, L., Altucci, L., Mita, D.G., and Marino, M. (2008). Laccase treatment impairs bisphenol A-induced cancer cell proliferation affecting estrogen receptor alpha-dependent rapid signals. IUBMB Life *60*, 843–852.

Bonefeld-Jørgensen, E.C., Long, M., Hofmeister, M.V., and Vinggaard, A.M. (2007). Endocrine-disrupting potential of bisphenol A, bisphenol A dimethacrylate, 4-n-nonylphenol, and 4-n-octylphenol in vitro: new data and a brief review. Environ. Health Perspect. *115 Suppl 1*, 69–76.

Braniste, V., Leveque, M., Buisson-Brenac, C., Bueno, L., Fioramonti, J., and Houdeau, E. (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.

Braniste, V., Jouault, A., Gaultier, E., Polizzi, A., Buisson-Brenac, C., Leveque, M., Martin, P.G., Theodorou, V., Fioramonti, J., and Houdeau, E. (2010). Impact of oral bisphenol A at reference doses on intestinal barrier function and sex differences after perinatal exposure in rats. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *107*, 448–453.

Braniste, V., Audebert, M., Zalko, D., and Houdeau, E. (2011). Bisphenol A in the Gut: Another Break in the Wall? In Multi-System Endocrine Disruption, J.-P. Bourguignon, B. Jégou, B. Kerdelhué, J. Toppari, and Y. Christen, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 127–144.

Brinkmeyer-Langford, C., Rodrigues, A., Kochan, K.J., Haney, R., Rassu, F., Steelman, A.J., Young, C., Riggs, P., Storts, R., Meagher, M.W., et al. (2014). Consequences of perinatal bisphenol A exposure in a mouse model of multiple sclerosis. Autoimmunity *47*, 57–66.

Brotons, J.A., Olea-Serrano, M.F., Villalobos, M., Pedraza, V., and Olea, N. (1995). Xenoestrogens released from lacquer coatings in food cans. Environ. Health Perspect. *103*, 608–612.

Burlina, S., Dalfrà, M.G., and Lapolla, A. (2017). Short- and long-term consequences for offspring exposed to maternal diabetes: a review. The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine 1–171.

Cabaton, N., Chagnon, M.-C., Lhuguenot, J.-C., Cravedi, J.-P., and Zalko, D. (2006). Disposition and metabolic profiling of bisphenol F in pregnant and nonpregnant rats. J. Agric. Food Chem. *54*, 10307–10314.

Cabaton, N., Dumont, C., Severin, I., Perdu, E., Zalko, D., Cherkaoui-Malki, M., and Chagnon, M.-C. (2009). Genotoxic and endocrine activities of bis(hydroxyphenyl)methane (bisphenol F) and its derivatives in the HepG2 cell line. Toxicology *255*, 15–24.

Cabaton, N.J., Wadia, P.R., Rubin, B.S., Zalko, D., Schaeberle, C.M., Askenase, M.H., Gadbois, J.L., Tharp, A.P., Whitt, G.S., Sonnenschein, C., et al. (2011). Perinatal exposure to environmentally relevant levels of bisphenol A decreases fertility and fecundity in CD-1 mice. Environ. Health Perspect. *119*, 547–552.

Calafat, A.M., Weuve, J., Ye, X., Jia, L.T., Hu, H., Ringer, S., Huttner, K., and Hauser, R. (2009). Exposure to bisphenol A and other phenols in neonatal intensive care unit premature infants. Environ. Health Perspect. *117*, 639–644.

Cani, P.D., and Delzenne, N.M. (2009). The role of the gut microbiota in energy metabolism and metabolic disease. Curr. Pharm. Des. *15*, 1546–1558.

Cani, P.D., Amar, J., Iglesias, M.A., Poggi, M., Knauf, C., Bastelica, D., Neyrinck, A.M., Fava, F., Tuohy, K.M., Chabo, C., et al. (2007). Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. Diabetes *56*, 1761–1772.

Cardwell, C.R., Stene, L.C., Joner, G., Cinek, O., Svensson, J., Goldacre, M.J., Parslow, R.C., Pozzilli, P., Brigis, G., Stoyanov, D., et al. (2008). Caesarean section is associated with an increased risk of childhood-onset type 1 diabetes mellitus: a meta-analysis of observational studies. Diabetologia *51*, 726–735.

Carr, B.R., Parker, C.R., Ohashi, M., MacDonald, P.C., and Simpson, E.R. (1983). Regulation of human fetal testicular secretion of testosterone: low-density lipoprotein-cholesterol and cholesterol synthesized de novo as steroid precursor. Am. J. Obstet. Gynecol. *146*, 241–247.

Carwile, J.L., and Michels, K.B. (2011). Urinary bisphenol A and obesity: NHANES 2003–2006. Environmental Research *111*, 825–830.

Castro, B., Sánchez, P., Torres, J.M., and Ortega, E. (2015). Bisphenol A, bisphenol F and bisphenol S affect differently 5α-reductase expression and dopamine-serotonin systems in the prefrontal cortex of juvenile female rats. Environ. Res. *142*, 281–287.

Cella, M., and Colonna, M. (2015). Aryl hydrocarbon receptor: Linking environment to immunity. Semin. Immunol. *27*, 310–314.

Cerovic, V., Bain, C.C., Mowat, A.M., and Milling, S.W.F. (2014). Intestinal macrophages and dendritic cells: what's the difference? Trends in Immunology *35*, 270–277.

Chai, X., Zeng, S., and Xie, W. (2013). Nuclear receptors PXR and CAR: implications for drug metabolism regulation, pharmacogenomics and beyond. Expert Opin Drug Metab Toxicol *9*, 253–266.

Chevalier, N., Bouskine, A., and Fenichel, P. (2012). Bisphenol A promotes testicular seminoma cell proliferation through GPER/GPR30. International Journal of Cancer *130*, 241–242.

Chou, W.-C., Chen, J.-L., Lin, C.-F., Chen, Y.-C., Shih, F.-C., and Chuang, C.-Y. (2011). Biomonitoring of bisphenol A concentrations in maternal and umbilical cord blood in regard to birth outcomes and adipokine expression: a birth cohort study in Taiwan. Environmental Health *10*.

Cinti, S., Mitchell, G., Barbatelli, G., Murano, I., Ceresi, E., Faloia, E., Wang, S., Fortier, M., Greenberg, A.S., and Obin, M.S. (2005). Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. Journal of Lipid Research *46*, 2347–2355.

Claus, S.P., Guillou, H., and Ellero-Simatos, S. (2016). The gut microbiota: a major player in the toxicity of environmental pollutants? Npj Biofilms and Microbiomes *2*.

Clevers, H.C., and Bevins, C.L. (2013). Paneth Cells: Maestros of the Small Intestinal Crypts. Annual Review of Physiology *75*, 289–311.

Colborn, T. (1995). Environmental estrogens: health implications for humans and wildlife. Environ. Health Perspect. *103 Suppl 7*, 135–136.

Colborn, T., and Clement, C. (1992). Chemically-induced alterations in sexual and functional development: the wildlife/human connection (Princeton, N.J: Princeton Scientific Pub. Co).

Collado, M.C., Delgado, S., Maldonado, A., and Rodríguez, J.M. (2009). Assessment of the bacterial diversity of breast milk of healthy women by quantitative real-time PCR. Lett. Appl. Microbiol. *48*, 523–528.

Commission Européenne (2008). REGLEMENT (UE) n° 1272/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des

substances et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE et modifiant le règlement (CE) n o 1907/2006 (Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE).

Commission Européenne (2011). RÈGLEMENT (UE) n° 10/2011 DE LA COMMISSION du 14 janvier 2011 concernant les matériaux et objets en matière plastique destinés à entrer en contact avec des denrées alimentaires.

Commission Européenne (2016). RÈGLEMENT (UE) 2016/2235 DE LA COMMISSION du 12 décembre 2016 modifiant l'annexe XVII du règlement (CE) n° 1907/2006 du Parlement européen et du Conseil concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, ainsi que les restrictions applicables à ces substances (REACH), en ce qui concerne le bisphénol A.

Corbel, T., Perdu, E., Gayrard, V., Puel, S., Lacroix, M.Z., Viguie, C., Toutain, P.-L., Zalko, D., and Picard-Hagen, N. (2015). Conjugation and Deconjugation Reactions within the Fetoplacental Compartment in a Sheep Model: A Key Factor Determining Bisphenol A Fetal Exposure. Drug Metabolism and Disposition *43*, 467–476.

Ćwiek-Ludwicka, K. (2015). Bisphenol A (BPA) in food contact materials - new scientific opinion from EFSA regarding public health risk. Rocz Panstw Zakl Hig *66*, 299–307.

Dabelea, D., Mayer-Davis, E.J., Saydah, S., Imperatore, G., Linder, B., Divers, J., Bell, R., Badaru, A., Talton, J.W., Crume, T., et al. (2014). Prevalence of Type 1 and Type 2 Diabetes Among Children and Adolescents From 2001 to 2009. JAMA *311*, 1778.

Dai, R., Phillips, R.A., Zhang, Y., Khan, D., Crasta, O., and Ahmed, S.A. (2008). Suppression of LPS-induced Interferon- and nitric oxide in splenic lymphocytes by select estrogen-regulated microRNAs: a novel mechanism of immune modulation. Blood *112*, 4591–4597.

Darbre, P.D. (2017). Endocrine Disruptors and Obesity. Current Obesity Reports.

De Filippo, C., Cavalieri, D., Di Paola, M., Ramazzotti, M., Poullet, J.B., Massart, S., Collini, S., Pieraccini, G., and Lionetti, P. (2010). Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *107*, 14691–14696.

De Palma, G., Nadal, I., Medina, M., Donat, E., Ribes-Koninckx, C., Calabuig, M., and Sanz, Y. (2010). Intestinal dysbiosis and reduced immunoglobulin-coated bacteria associated with coeliac disease in children. BMC Microbiology *10*, 63.

Decker, E., Engelmann, G., Findeisen, A., Gerner, P., Laass, M., Ney, D., Posovszky, C., Hoy, L., and Hornef, M.W. (2010). Cesarean Delivery Is Associated With Celiac Disease but Not Inflammatory Bowel Disease in Children. PEDIATRICS *125*, e1433–e1440.

DeKeyser, J.G., Laurenzana, E.M., Peterson, E.C., Chen, T., and Omiecinski, C.J. (2011). Selective Phthalate Activation of Naturally Occurring Human Constitutive Androstane Receptor Splice Variants and the Pregnane X Receptor. Toxicological Sciences *120*, 381–391.

Demierre, A.-L., Peter, R., Oberli, A., and Bourqui-Pittet, M. (2012). Dermal penetration of bisphenol A in human skin contributes marginally to total exposure. Toxicology Letters *213*, 305–308.

DeMoss, R.D., and Moser, K. (1969). Tryptophanase in diverse bacterial species. J. Bacteriol. *98*, 167–171.

Dianin, P. физическое (1891). Журнал Русского физико-химического общества при Ленинградеском университете (Тип-ія Б. Демакова).

DiGiulio, D.B., Romero, R., Amogan, H.P., Kusanovic, J.P., Bik, E.M., Gotsch, F., Kim, C.J., Erez, O., Edwin, S., and Relman, D.A. (2008). Microbial prevalence, diversity and abundance in amniotic fluid during preterm labor: a molecular and culture-based investigation. PLoS ONE *3*, e3056.

Dinesh, R.K., Hahn, B.H., and Singh, R.P. (2010). Gender and sex hormones influence CD4 regulatory T cells and their expression of FoxP3 in healthy people and in SLE.

Dodds, E.C., and Lawson, W. (1936). Synthetic Œstrogenic Agents without the Phenanthrene Nucleus. Nature *137*, 996–996.

Dranoff, G. (2004). Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. Nature Reviews Cancer *4*, 11–22.

Drasar, B.S. (1974). Some factors associated with geographical variations in the intestinal microflora. Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser. *3*, 187–196.

Duan, B., Hu, X., Zhao, H., Qin, J., and Luo, J. (2013). The relationship between urinary bisphenol A levels and meningioma in Chinese adults. International Journal of Clinical Oncology *18*, 492–497.

Dubin, P.J., and Kolls, J.K. (2008). Th17 cytokines and mucosal immunity. Immunol. Rev. *226*, 160–171.

Dumont, C., Perdu, E., de Sousa, G., Debrauwer, L., Rahmani, R., Cravedi, J.-P., and Chagnon, M.-C. (2011). Bis(hydroxyphenyl)methane-bisphenol F-metabolism by the HepG2 human hepatoma cell line and cryopreserved human hepatocytes. Drug Chem Toxicol *34*, 445–453.

Eberl, G., and Littman, D.R. (2003). The role of the nuclear hormone receptor RORgammat in the development of lymph nodes and Peyer's patches. Immunol. Rev. *195*, 81–90.

Edlow, A.G., Chen, M., Smith, N.A., Lu, C., and McElrath, T.F. (2012). Fetal bisphenol A exposure: concentration of conjugated and unconjugated bisphenol A in amniotic fluid in the second and third trimesters. Reprod. Toxicol. *34*, 1–7.

EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzymes, Flavourings and Processing Aids (CEF) (2014). Draft Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs. EFSA Journal.

EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzymes, Flavourings and Processing Aids (CEF) (2015). Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs: Opinion on BPA. EFSA Journal *13*, 3978.

Egger, G., and Dixon, J. (2014). Beyond Obesity and Lifestyle: A Review of 21st Century Chronic Disease Determinants. BioMed Research International *2014*, 1–12.

Ehrlich, A.K., Pennington, J.M., Bisson, W.H., Kolluri, S.K., and Kerkvliet, N.I. (2017). TCDD, FICZ, and other high affinity AhR ligands dose-dependently determine the fate of CD4+ T cell differentiation. Toxicological Sciences.

Eladak, S., Grisin, T., Moison, D., Guerquin, M.-J., N'Tumba-Byn, T., Pozzi-Gaudin, S., Benachi, A., Livera, G., Rouiller-Fabre, V., and Habert, R. (2015). A new chapter in the bisphenol A story: bisphenol S and bisphenol F are not safe alternatives to this compound. Fertil. Steril. *103*, 11–21.

Emson, C.L., Bell, S.E., Jones, A., Wisden, W., and McKenzie, A.N. (1998). Interleukin (IL)-4-independent induction of immunoglobulin (Ig)E, and perturbation of T cell development in transgenic mice expressing IL-13. J. Exp. Med. *188*, 399–404.

van Esterik, J.C.J., Verharen, H.W., Hodemaekers, H.M., Gremmer, E.R., Nagarajah, B., Kamstra, J.H., Dollé, M.E.T., Legler, J., and van der Ven, L.T.M. (2015). Compound- and sex-specific effects on programming of energy and immune homeostasis in adult C57BL/6JxFVB mice after perinatal TCDD and PCB 153. Toxicology and Applied Pharmacology *289*, 262–275.

European Food Safety Authority (EFSA) (2007). Opinion of the Scientific Panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) related to 2,2-BIS(4-HYDROXYPHENYL)PROPANE: Opinion of the Scientific Panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) related to 2,2-BIS(4-HYDROXYP. EFSA Journal *5*, 428.

Falk, P.G., Hooper, L.V., Midtvedt, T., and Gordon, J.I. (1998). Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. Microbiol. Mol. Biol. Rev. *62*, 1157–1170.

Fallani, M., Young, D., Scott, J., Norin, E., Amarri, S., Adam, R., Aguilera, M., Khanna, S., Gil, A., Edwards, C.A., et al. (2010). Intestinal microbiota of 6-week-old infants across Europe: geographic influence beyond delivery mode, breast-feeding, and antibiotics. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. *51*, 77–84.

Fanaro, S., Chierici, R., Guerrini, P., and Vigi, V. (2003). Intestinal microflora in early infancy: composition and development. Acta Paediatr Suppl *91*, 48–55.

Farabollini, F., Porrini, S., Della Seta, D., Bianchi, F., and Dessì-Fulgheri, F. (2002). Effects of perinatal exposure to bisphenol A on sociosexual behavior of female and male rats. Environ. Health Perspect. *110 Suppl 3*, 409–414.

FDA, C.R.S. (2008). DRAFT ASSESSMENT OF BISPHENOL A FOR USE IN FOOD CONTACT APPLICATIONS.

Federal Register (2013). Federal Register / Rules and Regulations. *78*.

Fenichel, P., Dechaux, H., Harthe, C., Gal, J., Ferrari, P., Pacini, P., Wagner-Mahler, K., Pugeat, M., and Brucker-Davis, F. (2012). Unconjugated bisphenol A cord blood levels in boys with descended or undescended testes. Human Reproduction *27*, 983–990.

Fernández, L., Langa, S., Martín, V., Maldonado, A., Jiménez, E., Martín, R., and Rodríguez, J.M. (2013). The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. Pharmacol. Res. *69*, 1–10.

Ferrier, L., Mazelin, L., Cenac, N., Desreumaux, P., Janin, A., Emilie, D., Colombel, J.-F., Garcia-Villar, R., Fioramonti, J., and Bueno, L. (2003). Stress-induced disruption of colonic epithelial barrier: role of interferon-gamma and myosin light chain kinase in mice. Gastroenterology *125*, 795–804.

Fic, A., Žegura, B., Sollner Dolenc, M., Filipič, M., and Peterlin Mašič, L. (2013). Mutagenicity and DNA damage of bisphenol A and its structural analogues in HepG2 cells. Arh Hig Rada Toksikol *64*, 189–200.

Fihn, B.M., Sjöqvist, A., and Jodal, M. (2000). Permeability of the rat small intestinal epithelium along the villus-crypt axis: effects of glucose transport. Gastroenterology *119*, 1029–1036.

Finkelman, F.D., Katona, I.M., Mosmann, T.R., and Coffman, R.L. (1988a). IFN-gamma regulates the isotypes of Ig secreted during in vivo humoral immune responses. J. Immunol. *140*, 1022–1027.

Finkelman, F.D., Katona, I.M., Urban, J.F., Holmes, J., Ohara, J., Tung, A.S., Sample, J.V., and Paul, W.E. (1988b). IL-4 is required to generate and sustain in vivo IgE responses. J. Immunol. *141*, 2335–2341.

van der Flier, L.G., and Clevers, H. (2009). Stem Cells, Self-Renewal, and Differentiation in the Intestinal Epithelium. Annual Review of Physiology *71*, 241–260.

Fossiez, F., Banchereau, J., Murray, R., Van Kooten, C., Garrone, P., and Lebecque, S. (1998). Interleukin-17. Int. Rev. Immunol. *16*, 541–551.

Fu, P., and Kawamura, K. (2010). Ubiquity of bisphenol A in the atmosphere. Environmental Pollution *158*, 3138–3143.

Gallagher, E.J., and LeRoith, D. (2015). Obesity and Diabetes: The Increased Risk of Cancer and Cancer-Related Mortality. Physiological Reviews *95*, 727–748.

Galluzzo, P., Caiazza, F., Moreno, S., and Marino, M. (2007). Role of ERbeta palmitoylation in the inhibition of human colon cancer cell proliferation. Endocr. Relat. Cancer *14*, 153–167.

Garidou, L., Pomié, C., Klopp, P., Waget, A., Charpentier, J., Aloulou, M., Giry, A., Serino, M., Stenman, L., Lahtinen, S., et al. (2015). The Gut Microbiota Regulates Intestinal CD4 T Cells Expressing RORγt and Controls Metabolic Disease. Cell Metab. *22*, 100–112.

Gascon, M., Casas, M., Morales, E., Valvi, D., Ballesteros-Gómez, A., Luque, N., Rubio, S., Monfort, N., Ventura, R., Martínez, D., et al. (2015). Prenatal exposure to bisphenol A and phthalates and childhood respiratory tract infections and allergy. Journal of Allergy and Clinical Immunology *135*, 370–378.e7.

Gayrard, V., Lacroix, M.Z., Collet, S.H., Viguié, C., Bousquet-Melou, A., Toutain, P.-L., and Picard-Hagen, N. (2013). High Bioavailability of Bisphenol A from Sublingual Exposure. Environmental Health Perspectives.

Geary, M., Pringle, P.J., Persaud, M., Wilshin, J., Hindmarsh, P.C., Rodeck, C.H., and Brook, C.G. (1999). Leptin concentrations in maternal serum and cord blood: relationship to maternal anthropometry and fetal growth. Br J Obstet Gynaecol *106*, 1054–1060.

Genuis, S.J., Beesoon, S., Birkholz, D., and Lobo, R.A. (2012). Human Excretion of Bisphenol A: Blood, Urine, and Sweat (BUS) Study. Journal of Environmental and Public Health *2012*, 1–10.

Gerbe, F., van Es, J.H., Makrini, L., Brulin, B., Mellitzer, G., Robine, S., Romagnolo, B., Shroyer, N.F., Bourgaux, J.-F., Pignodel, C., et al. (2011). Distinct ATOH1 and Neurog3 requirements define tuft cells as a new secretory cell type in the intestinal epithelium. The Journal of Cell Biology *192*, 767–780.

Gerona, R.R., Woodruff, T.J., Dickenson, C.A., Pan, J., Schwartz, J.M., Sen, S., Friesen, M.W., Fujimoto, V.Y., and Hunt, P.A. (2013). Bisphenol-A (BPA), BPA Glucuronide, and BPA Sulfate in Midgestation Umbilical Cord Serum in a Northern and Central California Population. Environmental Science & Technology *47*, 12477–12485.

Gerona, R.R., Pan, J., Zota, A.R., Schwartz, J.M., Friesen, M., Taylor, J.A., Hunt, P.A., and Woodruff, T.J. (2016). Direct measurement of Bisphenol A (BPA), BPA glucuronide and BPA sulfate in a diverse and low-income population of pregnant women reveals high exposure, with potential implications for previous exposure estimates: a cross-sectional study. Environmental Health *15*.

Ginsberg, G., and Rice, D.C. (2009). Does Rapid Metabolism Ensure Negligible Risk from Bisphenol A? Environmental Health Perspectives *117*, 1639–1643.

Glausiusz, J. (2014). Toxicology: The plastics puzzle. Nature *508*, 306–308.

Gluckman, P.D., Hanson, M.A., Spencer, H.G., and Bateson, P. (2005). Environmental influences during development and their later consequences for health and disease: implications for the interpretation of empirical studies. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences *272*, 671–677.

Goldenberg, R.L., Andrews, W.W., Faye-Petersen, O.M., Goepfert, A.R., Cliver, S.P., and Hauth, J.C. (2006). The Alabama Preterm Birth Study: Intrauterine infection and placental histologic findings in preterm births of males and females less than 32 weeks. American Journal of Obstetrics and Gynecology *195*, 1533–1537.

Goodson, A., Summerfield, W., and Cooper, I. (2002). Survey of bisphenol A and bisphenol F in canned foods. Food Addit Contam *19*, 796–802.

Gordon, H.A. (1967). A substance acting on smooth muscle in intestinal contents of germfree animals. Ann. N. Y. Acad. Sci. *147*, 85–106.

Gore, A.C., Crews, D., Doan, L.L., La Merrill, M., Patisaul, H., and Zota, A. (2014). INTRODUCTION TO ENDOCRINE DISRUPTING CHEMICALS (EDCs).

Goto, Y., Panea, C., Nakato, G., Cebula, A., Lee, C., Diez, M.G., Laufer, T.M., Ignatowicz, L., and Ivanov, I.I. (2014). Segmented Filamentous Bacteria Antigens Presented by Intestinal Dendritic Cells Drive Mucosal Th17 Cell Differentiation. Immunity *40*, 594–607.

Gould, J.C., Leonard, L.S., Maness, S.C., Wagner, B.L., Conner, K., Zacharewski, T., Safe, S., McDonnell, D.P., and Gaido, K.W. (1998). Bisphenol A interacts with the estrogen receptor alpha in a distinct manner from estradiol. Mol. Cell. Endocrinol. *142*, 203–214.

Gouzy, A., and Brignon, J.-M. (2015). BISPHENOLS F ET S (ET AUTRES). INERIS.

Gramec Skledar, D., Troberg, J., Lavdas, J., Peterlin Ma?i?, L., and Finel, M. (2015). Differences in the glucuronidation of bisphenols F and S between two homologous human UGT enzymes, 1A9 and 1A10. Xenobiotica *45*, 511–519.

Groschwitz, K.R., and Hogan, S.P. (2009). Intestinal barrier function: Molecular regulation and disease pathogenesis. Journal of Allergy and Clinical Immunology *124*, 3–20.

Guo, H., Liu, T., Uemura, Y., Jiao, S., Wang, D., Lin, Z., Narita, Y., Suzuki, M., Hirosawa, N., Ichihara, Y., et al. (2010). Bisphenol A in combination with TNF-alpha selectively induces Th2 cell-promoting dendritic cells in vitro with an estrogen-like activity. Cell Mol Immunol *7*, 227–234.

Gupta, C. (2000). Reproductive malformation of the male offspring following maternal exposure to estrogenic chemicals. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. *224*, 61–68.

Haarbo, J., Marslew, U., Gotfredsen, A., and Christiansen, C. (1991). Postmenopausal hormone replacement therapy prevents central distribution of body fat after menopause. Metab. Clin. Exp. *40*, 1323–1326.

Haller, H. (1977). [Epidermiology and associated risk factors of hyperlipoproteinemia]. Z Gesamte Inn Med *32*, 124–128.

Han, J.-L., and Lin, H.-L. (2014). Intestinal microbiota and type 2 diabetes: From mechanism insights to therapeutic perspective. World Journal of Gastroenterology *20*, 17737–17745.

Harmsen, H.J.M., and de Goffau, M.C. (2016). The Human Gut Microbiota. In Microbiota of the Human Body, A. Schwiertz, ed. (Cham: Springer International Publishing), pp. 95–108.

Harmsen, H.J., Wildeboer-Veloo, A.C., Raangs, G.C., Wagendorp, A.A., Klijn, N., Bindels, J.G., and Welling, G.W. (2000). Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. *30*, 61–67.

Hauck, Z.Z., Huang, K., Li, G., and van Breemen, R.B. (2016). Determination of bisphenol A-glucuronide in human urine using ultrahigh-pressure liquid chromatography/tandem mass spectrometry: Determination of BPA-glucuronide using UHPLC/MS/MS. Rapid Communications in Mass Spectrometry *30*, 400–406.

He, Y., Miao, M., Herrinton, L.J., Wu, C., Yuan, W., Zhou, Z., and Li, D.-K. (2009). Bisphenol A levels in blood and urine in a Chinese population and the personal factors affecting the levels. Environ. Res. *109*, 629–633.

Heinälä, M., Ylinen, K., Tuomi, T., Santonen, T., and Porras, S.P. (2017). Assessment of Occupational Exposure to Bisphenol A in Five Different Production Companies in Finland. Ann Work Expo Health *61*, 44–55.

Heine, P.A., Taylor, J.A., Iwamoto, G.A., Lubahn, D.B., and Cooke, P.S. (2000). Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-alpha knockout mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *97*, 12729–12734.

Hepworth, M.R., Monticelli, L.A., Fung, T.C., Ziegler, C.G., Grunberg, S., Sinha, R., Mantegazza, A.R., Ma, H.L., Crawford, A., Angelosanto, J.M., et al. (2013). Innate lymphoid cells regulate CD4+ T-cell responses to intestinal commensal bacteria. Nature *498*, 113–117.

Higashihara, N., Shiraishi, K., Miyata, K., Oshima, Y., Minobe, Y., and Yamasaki, K. (2007). Subacute oral toxicity study of bisphenol F based on the draft protocol for the "Enhanced OECD Test Guideline no. 407." Arch. Toxicol. *81*, 825–832.

Hong, J., Stubbins, R.E., Smith, R.R., Harvey, A.E., and Núñez, N.P. (2009). Differential susceptibility to obesity between male, female and ovariectomized female mice. Nutr J *8*, 11.

Honma, S., Suzuki, A., Buchanan, D.L., Katsu, Y., Watanabe, H., and Iguchi, T. (2002). Low dose effect of in utero exposure to bisphenol A and diethylstilbestrol on female mouse reproduction. Reprod. Toxicol. *16*, 117–122.

Hormann, A.M., Vom Saal, F.S., Nagel, S.C., Stahlhut, R.W., Moyer, C.L., Ellersieck, M.R., Welshons, W.V., Toutain, P.-L., and Taylor, J.A. (2014). Holding thermal receipt paper and eating food after using hand sanitizer results in high serum bioactive and urine total levels of bisphenol A (BPA). PLoS ONE *9*, e110509.

Houdeau, é. (2011). Perturbateurs endocriniens et contamination orale : l'intestin oublié. Médecine & Longévité *3*, 85–93.

Houdeau, E. (2016). Sex Differences in Gastrointestinal Physiology and Diseases. In Sex Differences in Physiology, (Elsevier), pp. 125–143.

Howdeshell, K.L., Hotchkiss, A.K., Thayer, K.A., Vandenbergh, J.G., and vom Saal, F.S. (1999). Exposure to bisphenol A advances puberty. Nature *401*, 763–764.

Howitt, M.R., Lavoie, S., Michaud, M., Blum, A.M., Tran, S.V., Weinstock, J.V., Gallini, C.A., Redding, K., Margolskee, R.F., Osborne, L.C., et al. (2016). Tuft cells, taste-chemosensory cells, orchestrate parasite type 2 immunity in the gut. Science *351*, 1329–1333.

Hsieh, C.S., Macatonia, S.E., Tripp, C.S., Wolf, S.F., O'Garra, A., and Murphy, K.M. (1993). Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. Science *260*, 547–549.

Hu, X., Wang, T., Liang, S., Li, W., Wu, X., and Jin, F. (2015). Antibiotic-induced imbalances in gut microbiota aggravates cholesterol accumulation and liver injuries in rats fed a high-cholesterol diet. Appl. Microbiol. Biotechnol. *99*, 9111–9122.

Huang, Y., Park, Y., Wang-Zhu, Y., Larange, A., Arens, R., Bernardo, I., Olivares-Villagómez, D., Herndler-Brandstetter, D., Abraham, N., Grubeck-Loebenstein, B., et al. (2011). Mucosal memory $CD8^+$ T cells are selected in the periphery by an MHC class I molecule. Nat. Immunol. *12*, 1086–1095.

Huurre, A., Kalliomäki, M., Rautava, S., Rinne, M., Salminen, S., and Isolauri, E. (2008). Mode of delivery - effects on gut microbiota and humoral immunity. Neonatology *93*, 236–240.

Idelman, G., Jacobson, E.M., Tuttle, T.R., and Ben-Jonathan, N. (2011). Lactogens and estrogens in breast cancer chemoresistance. Expert Review of Endocrinology & Metabolism *6*, 411–422.

Ike, M., Chen, M.Y., Danzl, E., Sei, K., and Fujita, M. (2006). Biodegradation of a variety of bisphenols under aerobic and anaerobic conditions. Water Science and Technology *53*, 153–159.

Irvin, C., Zafar, I., Good, J., Rollins, D., Christianson, C., Gorska, M.M., Martin, R.J., and Alam, R. (2014). Increased frequency of dual-positive TH2/TH17 cells in bronchoalveolar lavage fluid characterizes a population of patients with severe asthma. J. Allergy Clin. Immunol. *134*, 1175–1186.e7.

Ishido, M., Masuo, Y., Kunimoto, M., Oka, S., and Morita, M. (2004). Bisphenol A causes hyperactivity in the rat concomitantly with impairment of tyrosine hydroxylase immunoreactivity. J. Neurosci. Res. *76*, 423–433.

Itoh, M., Suganami, T., Hachiya, R., and Ogawa, Y. (2011). Adipose Tissue Remodeling as Homeostatic Inflammation. International Journal of Inflammation *2011*, 1–8.

Ivanov, I.I., Frutos, R. de L., Manel, N., Yoshinaga, K., Rifkin, D.B., Sartor, R.B., Finlay, B.B., and Littman, D.R. (2008). Specific Microbiota Direct the Differentiation of IL-17-Producing T-Helper Cells in the Mucosa of the Small Intestine. Cell Host & Microbe *4*, 337–349.

Ivanov, I.I., Atarashi, K., Manel, N., Brodie, E.L., Shima, T., Karaoz, U., Wei, D., Goldfarb, K.C., Santee, C.A., Lynch, S.V., et al. (2009). Induction of Intestinal Th17 Cells by Segmented Filamentous Bacteria. Cell *139*, 485–498.

Ivry Del Moral, L., Le Corre, L., Poirier, H., Niot, I., Truntzer, T., Merlin, J.-F., Rouimi, P., Besnard, P., Rahmani, R., and Chagnon, M.C. (2016). Obesogen effects after perinatal exposure of 4,4′-sulfonyldiphenol (Bisphenol S) in C57BL/6 mice. Toxicology *357–358*, 11–20.

Iwamuro, S., Yamada, M., Kato, M., and Kikuyama, S. (2006). Effects of bisphenol A on thyroid hormone-dependent up-regulation of thyroid hormone receptor alpha and beta and down-regulation of retinoid X receptor gamma in Xenopus tail culture. Life Sci. *79*, 2165–2171.

Jain, N., and Walker, W.A. (2014). Diet and host–microbial crosstalk in postnatal intestinal immune homeostasis. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology *12*, 14–25.

Jandhyala, S.M. (2015). Role of the normal gut microbiota. World Journal of Gastroenterology *21*, 8787.

Javurek, A.B., Spollen, W.G., Johnson, S.A., Bivens, N.J., Bromert, K.H., Givan, S.A., and Rosenfeld, C.S. (2016). Effects of exposure to bisphenol A and ethinyl estradiol on the gut microbiota of parents and their offspring in a rodent model. Gut Microbes *7*, 471–485.

Ji, K., Hong, S., Kho, Y., and Choi, K. (2013). Effects of bisphenol s exposure on endocrine functions and reproduction of zebrafish. Environ. Sci. Technol. *47*, 8793–8800.

Jiménez, E., Fernández, L., Marín, M.L., Martín, R., Odriozola, J.M., Nueno-Palop, C., Narbad, A., Olivares, M., Xaus, J., and Rodríguez, J.M. (2005). Isolation of commensal bacteria from

umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section. Curr. Microbiol. *51*, 270–274.

Jiménez, E., Marín, M.L., Martín, R., Odriozola, J.M., Olivares, M., Xaus, J., Fernández, L., and Rodríguez, J.M. (2008). Is meconium from healthy newborns actually sterile? Res. Microbiol. *159*, 187–193.

Kabir, E.R., Rahman, M.S., and Rahman, I. (2015). A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. Environ. Toxicol. Pharmacol. *40*, 241–258.

Kaddar, N., Bendridi, N., Harthé, C., de Ravel, M.R., Bienvenu, A.-L., Cuilleron, C.-Y., Mappus, E., Pugeat, M., and Déchaud, H. (2009). Development of a radioimmunoassay for the measurement of Bisphenol A in biological samples. Anal. Chim. Acta *645*, 1–4.

Kaetzel, C.S., and Mostov, K. (2005). Chapter 12 - Immunoglobulin Transport and the Polymeric Immunoglobulin Receptor A2 - Mestecky, Jiri. In Mucosal Immunology (Third Edition), M.E. Lamm, J.R. McGhee, J. Bienenstock, L. Mayer, and W. Strober, eds. (Burlington: Academic Press), p. 211–VI.

Kalupahana, N.S., Moustaid-Moussa, N., and Claycombe, K.J. (2012). Immunity as a link between obesity and insulin resistance. Molecular Aspects of Medicine *33*, 26–34.

Kamphuis, J.B.J., Mercier-Bonin, M., Eutamène, H., and Theodorou, V. (2017). Mucus organisation is shaped by colonic content; a new view. Scientific Reports *7*.

Kandaraki, E., Chatzigeorgiou, A., Livadas, S., Palioura, E., Economou, F., Koutsilieris, M., Palimeri, S., Panidis, D., and Diamanti-Kandarakis, E. (2011). Endocrine Disruptors and Polycystic Ovary Syndrome (PCOS): Elevated Serum Levels of Bisphenol A in Women with PCOS. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism *96*, E480–E484.

Kang, J.-H., and Kondo, F. (2002). Bisphenol A migration from cans containing coffee and caffeine. Food Addit Contam *19*, 886–890.

Kang, J.-H., Kito, K., and Kondo, F. (2003). Factors influencing the migration of bisphenol A from cans. J. Food Prot. *66*, 1444–1447.

Karpuzoglu, E., Phillips, R.A., Gogal, R.M., and Ansar Ahmed, S. (2007). IFN-γ-inducing transcription factor, T-bet is upregulated by estrogen in murine splenocytes: Role of IL-27 but not IL-12. Molecular Immunology *44*, 1808–1814.

Karupiah, G., Xie, Q.W., Buller, R.M., Nathan, C., Duarte, C., and MacMicking, J.D. (1993). Inhibition of viral replication by interferon-gamma-induced nitric oxide synthase. Science *261*, 1445–1448.

Kasper-Sonnenberg, M., Wittsiepe, J., Koch, H.M., Fromme, H., and Wilhelm, M. (2012). Determination of bisphenol a in urine from mother-child pairs-results from the duisburg birth cohort study, Germany. J. Toxicol. Environ. Health Part A *75*, 429–437.

Kawai, K., Nozaki, T., Nishikata, H., Aou, S., Takii, M., and Kubo, C. (2003). Aggressive behavior and serum testosterone concentration during the maturation process of male mice: the effects of fetal exposure to bisphenol A. Environ. Health Perspect. *111*, 175–178.

Ke, Z.-H., Pan, J.-X., Jin, L.-Y., Xu, H.-Y., Yu, T.-T., Ullah, K., Rahman, T.U., Ren, J., Cheng, Y., Dong, X.-Y., et al. (2016). Bisphenol A Exposure May Induce Hepatic Lipid Accumulation via Reprogramming the DNA Methylation Patterns of Genes Involved in Lipid Metabolism. Scientific Reports *6*.

Kelsey, M.M., Zaepfel, A., Bjornstad, P., and Nadeau, K.J. (2014). Age-Related Consequences of Childhood Obesity. Gerontology *60*, 222–228.

Kharrazian, D. (2014). The Potential Roles of Bisphenol A (BPA) Pathogenesis in Autoimmunity. Autoimmune Diseases *2014*, 1–12.

Khokhlova, E.V., Smeianov, V.V., Efimov, B.A., Kafarskaia, L.I., Pavlova, S.I., and Shkoporov, A.N. (2012). Anti-inflammatory properties of intestinal Bifidobacterium strains isolated from healthy infants: Anti-inflammatory effects of bifidobacteria. Microbiology and Immunology *56*, 27–39.

Khurana, S., Ranmal, S., and Ben-Jonathan, N. (2000). Exposure of newborn male and female rats to environmental estrogens: delayed and sustained hyperprolactinemia and alterations in estrogen receptor expression. Endocrinology *141*, 4512–4517.

Kierszenbaum, A.L. (2002). Histology and cell biology: an introduction to pathology (St. Louis, Mo: Mosby).

Kim, K., and Park, H. (2013). Association between urinary concentrations of bisphenol A and type 2 diabetes in Korean adults: A population-based cross-sectional study. International Journal of Hygiene and Environmental Health *216*, 467–471.

Kim, D.H., Oh, C.H., Hwang, Y.-C., Jeong, I.-K., Ahn, K.J., Chung, H.-Y., and Chang, J.-S. (2012). Serum Bisphenol A Concentration in Postmenopausal Women with Osteoporosis. Journal of Bone Metabolism *19*, 87.

Kim, M.H., Taparowsky, E.J., and Kim, C.H. (2015). Retinoic Acid Differentially Regulates the Migration of Innate Lymphoid Cell Subsets to the Gut. Immunity *43*, 107–119.

Kim, S.-H., Cho, B.-H., Kiyono, H., and Jang, Y.-S. (2017). Microbiota-derived butyrate suppresses group 3 innate lymphoid cells in terminal ileal Peyer's patches. Scientific Reports *7*.

Kinch, C.D., Ibhazehiebo, K., Jeong, J.-H., Habibi, H.R., and Kurrasch, D.M. (2015). Low-dose exposure to bisphenol A and replacement bisphenol S induces precocious hypothalamic neurogenesis in embryonic zebrafish. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *112*, 1475–1480.

Kiss, E.A., Vonarbourg, C., Kopfmann, S., Hobeika, E., Finke, D., Esser, C., and Diefenbach, A. (2011). Natural aryl hydrocarbon receptor ligands control organogenesis of intestinal lymphoid follicles. Science *334*, 1561–1565.

Kitamura, S., Suzuki, T., Sanoh, S., Kohta, R., Jinno, N., Sugihara, K., Yoshihara, S., Fujimoto, N., Watanabe, H., and Ohta, S. (2005). Comparative study of the endocrine-disrupting activity of bisphenol A and 19 related compounds. Toxicol. Sci. *84*, 249–259.

Klein, S.L., and Flanagan, K.L. (2016). Sex differences in immune responses. Nature Reviews Immunology *16*, 626–638.

Kloukos, D., Pandis, N., and Eliades, T. (2013). In vivo bisphenol-a release from dental pit and fissure sealants: a systematic review. J Dent *41*, 659–667.

Kobyliak, N., Conte, C., Cammarota, G., Haley, A.P., Styriak, I., Gaspar, L., Fusek, J., Rodrigo, L., and Kruzliak, P. (2016). Probiotics in prevention and treatment of obesity: a critical view. Nutr Metab (Lond) *13*, 14.

Kong, X., Feng, D., Mathews, S., and Gao, B. (2013). Hepatoprotective and anti-fibrotic functions of interleukin-22: Therapeutic potential for the treatment of alcoholic liver disease: Therapeutic potential of interleukin-22. Journal of Gastroenterology and Hepatology *28*, 56–60.

Konieczna, A., Rutkowska, A., and Rachoń, D. (2015). Health risk of exposure to Bisphenol A (BPA). Rocz Panstw Zakl Hig *66*, 5–11.

Kopf, M., Le Gros, G., Bachmann, M., Lamers, M.C., Bluethmann, H., and Köhler, G. (1993). Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses. Nature *362*, 245–248.

Kotani, Y., Yokota, I., Kitamura, S., Matsuda, J., Naito, E., and Kuroda, Y. (2004). Plasma adiponectin levels in newborns are higher than those in adults and positively correlated with birth weight. Clinical Endocrinology *61*, 418–423.

Kovacic, J.C., Castellano, J.M., Farkouh, M.E., and Fuster, V. (2014). The Relationships Between Cardiovascular Disease and Diabetes. Endocrinology and Metabolism Clinics of North America *43*, 41–57.

Krishnan, A.V., Stathis, P., Permuth, S.F., Tokes, L., and Feldman, D. (1993). Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. Endocrinology *132*, 2279–2286.

Krüger, T., Long, M., and Bonefeld-Jørgensen, E.C. (2008). Plastic components affect the activation of the aryl hydrocarbon and the androgen receptor. Toxicology *246*, 112–123.

Kurosawa, T., Hiroi, H., Tsutsumi, O., Ishikawa, T., Osuga, Y., Fujiwara, T., Inoue, S., Muramatsu, M., Momoeda, M., and Taketani, Y. (2002). The activity of bisphenol A depends on both the estrogen receptor subtype and the cell type. Endocr. J. *49*, 465–471.

Lai, K.-P., Chung, Y.-T., Li, R., Wan, H.-T., and Wong, C.K.-C. (2016). Bisphenol A alters gut microbiome: Comparative metagenomics analysis. Environ. Pollut. *218*, 923–930.

LaKind, J.S., Goodman, M., and Naiman, D.Q. (2012). Use of NHANES Data to Link Chemical Exposures to Chronic Diseases: A Cautionary Tale. PLoS ONE *7*, e51086.

Lang, I.A. (2008). Association of Urinary Bisphenol A Concentration With Medical Disorders and Laboratory Abnormalities in Adults. JAMA *300*, 1303.

Lange, K., Buerger, M., Stallmach, A., and Bruns, T. (2016). Effects of Antibiotics on Gut Microbiota. Dig Dis *34*, 260–268.

Larsson, K., Lindh, C.H., Jönsson, B.A., Giovanoulis, G., Bibi, M., Bottai, M., Bergström, A., and Berglund, M. (2017). Phthalates, non-phthalate plasticizers and bisphenols in Swedish preschool dust in relation to children's exposure. Environ Int *102*, 114–124.

Lee, J.S., Cella, M., McDonald, K.G., Garlanda, C., Kennedy, G.D., Nukaya, M., Mantovani, A., Kopan, R., Bradfield, C.A., Newberry, R.D., et al. (2011). AHR drives the development of gut ILC22 cells and postnatal lymphoid tissues via pathways dependent on and independent of Notch. Nat. Immunol. *13*, 144–151.

Lee, S., Liu, X., Takeda, S., and Choi, K. (2013). Genotoxic potentials and related mechanisms of bisphenol A and other bisphenol compounds: a comparison study employing chicken DT40 cells. Chemosphere *93*, 434–440.

Legeay, S., and Faure, S. (2017). Is bisphenol A an environmental obesogen? Fundamental & Clinical Pharmacology.

Ley, R.E., Bäckhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C.A., Knight, R.D., and Gordon, J.I. (2005). Obesity alters gut microbial ecology. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *102*, 11070–11075.

Ley, R.E., Turnbaugh, P.J., Klein, S., and Gordon, J.I. (2006). Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. Nature *444*, 1022–1023.

Li, D.-K., Zhou, Z., Miao, M., He, Y., Wang, J., Ferber, J., Herrinton, L.J., Gao, E., and Yuan, W. (2011a). Urine bisphenol-A (BPA) level in relation to semen quality. Fertil. Steril. *95*, 625-630.e1-4.

Li, M., Bi, Y., Qi, L., Wang, T., Xu, M., Huang, Y., Xu, Y., Chen, Y., Lu, J., Wang, W., et al. (2012). Exposure to bisphenol A is associated with low-grade albuminuria in Chinese adults. Kidney International *81*, 1131–1139.

Li, Y., Innocentin, S., Withers, D.R., Roberts, N.A., Gallagher, A.R., Grigorieva, E.F., Wilhelm, C., and Veldhoen, M. (2011b). Exogenous stimuli maintain intraepithelial lymphocytes via aryl hydrocarbon receptor activation. Cell *147*, 629–640.

Li, Z., Jin, H., Oh, S.Y., and Ji, G.E. (2016). Anti-obese effects of two Lactobacilli and two Bifidobacteria on ICR mice fed on a high fat diet. Biochem. Biophys. Res. Commun. *480*, 222–227.

Liao, C., Liu, F., and Kannan, K. (2012a). Bisphenol S, a New Bisphenol Analogue, in Paper Products and Currency Bills and Its Association with Bisphenol A Residues. Environmental Science & Technology *46*, 6515–6522.

Liao, C., Liu, F., Guo, Y., Moon, H.-B., Nakata, H., Wu, Q., and Kannan, K. (2012b). Occurrence of Eight Bisphenol Analogues in Indoor Dust from the United States and Several Asian Countries: Implications for Human Exposure. Environmental Science & Technology *46*, 9138–9145.

Liu, J., Yu, P., Qian, W., Li, Y., Zhao, J., Huan, F., Wang, J., and Xiao, H. (2013). Perinatal Bisphenol A Exposure and Adult Glucose Homeostasis: Identifying Critical Windows of Exposure. PLoS ONE *8*, e64143.

Loganathan, S.N., and Kannan, K. (2011). Occurrence of Bisphenol A in Indoor Dust from Two Locations in the Eastern United States and Implications for Human Exposures. Archives of Environmental Contamination and Toxicology *61*, 68–73.

Loi Française (2010). Loi n°2010-729 du 30 juin 2010.

Loi Française (2012). Loi n°2012-1442 du 24 décembre 2012.

Lügering, A., Ross, M., Sieker, M., Heidemann, J., Williams, I.R., Domschke, W., and Kucharzik, T. (2010). CCR6 identifies lymphoid tissue inducer cells within cryptopatches: Expression of CCR6 in cryptopatches. Clinical & Experimental Immunology *160*, 440–449.

Luo, S., Li, Y., Li, Y., Zhu, Q., Jiang, J., Wu, C., and Shen, T. (2016). Gestational and lactational exposure to low-dose bisphenol A increases Th17 cells in mice offspring. Environ Toxicol Pharmacol *47*, 149–158.

Lv, Y., Rui, C., Dai, Y., Pang, Q., Li, Y., Fan, R., and Lu, S. (2016). Exposure of children to BPA through dust and the association of urinary BPA and triclosan with oxidative stress in Guangzhou, China. Environ Sci Process Impacts *18*, 1492–1499.

MacKay, H., Patterson, Z.R., and Abizaid, A. (2017). Perinatal Exposure to Low-Dose Bisphenol-A Disrupts the Structural and Functional Development of the Hypothalamic Feeding Circuitry. Endocrinology *158*, 768–777.

Mackie, R.I., Sghir, A., and Gaskins, H.R. (1999). Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. Am. J. Clin. Nutr. *69*, 1035S–1045S.

Macpherson, A.J., and Harris, N.L. (2004). Opinion: Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. Nature Reviews Immunology *4*, 478–485.

Macpherson, A., Khoo, U.Y., Forgacs, I., Philpott-Howard, J., and Bjarnason, I. (1996). Mucosal antibodies in inflammatory bowel disease are directed against intestinal bacteria. Gut *38*, 365–375.

Madsen, J.L., and Graff, J. (2004). Effects of ageing on gastrointestinal motor function. Age Ageing *33*, 154–159.

Malaisé, Y., Ménard, S., Cartier, C., Lencina, C., Sommer, C., Gaultier, E., Houdeau, E., and Guzylack-Piriou, L. (2017). Consequences of bisphenol a perinatal exposure on immune responses and gut barrier function in mice. Arch. Toxicol.

Malamut, G., El Machhour, R., Montcuquet, N., Martin-Lannerée, S., Dusanter-Fourt, I., Verkarre, V., Mention, J.-J., Rahmi, G., Kiyono, H., Butz, E.A., et al. (2010). IL-15 triggers an antiapoptotic pathway in human intraepithelial lymphocytes that is a potential new target in celiac disease-associated inflammation and lymphomagenesis. J. Clin. Invest. *120*, 2131–2143.

Marcobal, A., Barboza, M., Sonnenburg, E.D., Pudlo, N., Martens, E.C., Desai, P., Lebrilla, C.B., Weimer, B.C., Mills, D.A., German, J.B., et al. (2011). Bacteroides in the Infant Gut Consume Milk Oligosaccharides via Mucus-Utilization Pathways. Cell Host & Microbe *10*, 507–514.

Marino, M., Pellegrini, M., La Rosa, P., and Acconcia, F. (2012). Susceptibility of estrogen receptor rapid responses to xenoestrogens: Physiological outcomes. Steroids *77*, 910–917.

Marmugi, A., Ducheix, S., Lasserre, F., Polizzi, A., Paris, A., Priymenko, N., Bertrand-Michel, J., Pineau, T., Guillou, H., Martin, P.G.P., et al. (2012). Low doses of bisphenol a induce gene expression related to lipid synthesis and trigger triglyceride accumulation in adult mouse liver. Hepatology *55*, 395–407.

Masuno, H., Kidani, T., Sekiya, K., Sakayama, K., Shiosaka, T., Yamamoto, H., and Honda, K. (2002). Bisphenol A in combination with insulin can accelerate the conversion of 3T3-L1 fibroblasts to adipocytes. J. Lipid Res. *43*, 676–684.

Matamoros, S., Gras-Leguen, C., Le Vacon, F., Potel, G., and de La Cochetiere, M.-F. (2013). Development of intestinal microbiota in infants and its impact on health. Trends Microbiol. *21*, 167–173.

Mathers, C.D., and Loncar, D. (2006). Projections of Global Mortality and Burden of Disease from 2002 to 2030. PLoS Medicine *3*, e442.

Mathew, R., and Castriotta, R.J. (2014). High Hypopnea/Apnea Ratio (HAR) in Extreme Obesity. Journal of Clinical Sleep Medicine.

Matthews (2006). Estrogen receptor and aryl hydrocarbon receptor signaling pathways. Nuclear Receptor Signaling.

Mazzini, E., Massimiliano, L., Penna, G., and Rescigno, M. (2014). Oral tolerance can be established via gap junction transfer of fed antigens from CX3CR1(+) macrophages to CD103(+) dendritic cells. Immunity *40*, 248–261.

McDole, J.R., Wheeler, L.W., McDonald, K.G., Wang, B., Konjufca, V., Knoop, K.A., Newberry, R.D., and Miller, M.J. (2012). Goblet cells deliver luminal antigen to CD103+ dendritic cells in the small intestine. Nature *483*, 345–349.

McMillen, I.C., Muhlhausler, B.S., Duffield, J.A., and Yuen, B.S.J. (2004). Prenatal programming of postnatal obesity: fetal nutrition and the regulation of leptin synthesis and secretion before birth. Proc Nutr Soc *63*, 405–412.

Melzer, D., Rice, N.E., Lewis, C., Henley, W.E., and Galloway, T.S. (2010). Association of Urinary Bisphenol A Concentration with Heart Disease: Evidence from NHANES 2003/06. PLoS ONE *5*, e8673.

Ménard, S., Cerf-Bensussan, N., and Heyman, M. (2010). Multiple facets of intestinal permeability and epithelial handling of dietary antigens. Mucosal Immunol *3*, 247–259.

Menard, S., Guzylack-Piriou, L., Lencina, C., Leveque, M., Naturel, M., Sekkal, S., Harkat, C., Gaultier, E., Olier, M., Garcia-Villar, R., et al. (2014a). Perinatal exposure to a low dose of bisphenol A impaired systemic cellular immune response and predisposes young rats to intestinal parasitic infection. PLoS One *9*, e112752.

Menard, S., Guzylack-Piriou, L., Leveque, M., Braniste, V., Lencina, C., Naturel, M., Moussa, L., Sekkal, S., Harkat, C., Gaultier, E., et al. (2014b). Food intolerance at adulthood after perinatal exposure to the endocrine disruptor bisphenol A. FASEB J. *28*, 4893–4900.

Merchant Research & Consulting Ltd. (2014). Bisphenol A (BPA): 2014 World Market Outlook and Forecast up to 2018. 165.

Michałowicz, J. (2014). Bisphenol A – Sources, toxicity and biotransformation. Environmental Toxicology and Pharmacology *37*, 738–758.

Mielke, H., and Gundert-Remy, U. (2009). Bisphenol A levels in blood depend on age and exposure. Toxicol. Lett. *190*, 32–40.

Mielke, H., Partosch, F., and Gundert-Remy, U. (2011). The contribution of dermal exposure to the internal exposure of bisphenol A in man. Toxicology Letters *204*, 190–198.

Mikkelsen, K.H., Frost, M., Bahl, M.I., Licht, T.R., Jensen, U.S., Rosenberg, J., Pedersen, O., Hansen, T., Rehfeld, J.F., Holst, J.J., et al. (2015). Effect of Antibiotics on Gut Microbiota, Gut Hormones and Glucose Metabolism. PLoS ONE *10*, e0142352.

Mikołajewska, K., Stragierowicz, J., and Gromadzińska, J. (2015). Bisphenol A - Application, sources of exposure and potential risks in infants, children and pregnant women. Int J Occup Med Environ Health *28*, 209–241.

Miyawaki, J., Sakayama, K., Kato, H., Yamamoto, H., and Masuno, H. (2007). Perinatal and postnatal exposure to bisphenol a increases adipose tissue mass and serum cholesterol level in mice. J. Atheroscler. Thromb. *14*, 245–252.

Molina-Molina, J.-M., Amaya, E., Grimaldi, M., Sáenz, J.-M., Real, M., Fernández, M.F., Balaguer, P., and Olea, N. (2013). In vitro study on the agonistic and antagonistic activities of bisphenol-S and other bisphenol-A congeners and derivatives via nuclear receptors. Toxicol. Appl. Pharmacol. *272*, 127–136.

Monira, S., Nakamura, S., Gotoh, K., Izutsu, K., Watanabe, H., Alam, N.H., Endtz, H.P., Cravioto, A., Ali, S.I., Nakaya, T., et al. (2011). Gut microbiota of healthy and malnourished children in bangladesh. Front Microbiol *2*, 228.

Monje, L., Varayoud, J., Luque, E.H., and Ramos, J.G. (2007). Neonatal exposure to bisphenol A modifies the abundance of estrogen receptor alpha transcripts with alternative 5'-untranslated regions in the female rat preoptic area. J. Endocrinol. *194*, 201–212.

Monje, L., Varayoud, J., Muñoz-de-Toro, M., Luque, E.H., and Ramos, J.G. (2010). Exposure of neonatal female rats to bisphenol A disrupts hypothalamic LHRH pre-mRNA processing and estrogen receptor alpha expression in nuclei controlling estrous cyclicity. Reprod. Toxicol. *30*, 625–634.

Moore, K.W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R.L., and O'Garra, A. (2001). Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. Annu. Rev. Immunol. *19*, 683–765.

Moriyama, K., Tagami, T., Akamizu, T., Usui, T., Saijo, M., Kanamoto, N., Hataya, Y., Shimatsu, A., Kuzuya, H., and Nakao, K. (2002). Thyroid hormone action is disrupted by bisphenol A as an antagonist. J. Clin. Endocrinol. Metab. *87*, 5185–5190.

Mowat, A.M., and Agace, W.W. (2014). Regional specialization within the intestinal immune system. Nat. Rev. Immunol. *14*, 667–685.

Muñoz-de-Toro, M., Markey, C.M., Wadia, P.R., Luque, E.H., Rubin, B.S., Sonnenschein, C., and Soto, A.M. (2005). Perinatal exposure to bisphenol-A alters peripubertal mammary gland development in mice. Endocrinology *146*, 4138–4147.

Murray, T.J., Maffini, M.V., Ucci, A.A., Sonnenschein, C., and Soto, A.M. (2007). Induction of mammary gland ductal hyperplasias and carcinoma in situ following fetal bisphenol A exposure. Reprod. Toxicol. *23*, 383–390.

Nachman, R.M., Fox, S.D., Golden, W.C., Sibinga, E., Groopman, J.D., and Lees, P.S.J. (2015). Serial Free Bisphenol A and Bisphenol A Glucuronide Concentrations in Neonates. J. Pediatr. *167*, 64–69.

Nadal, I., Santacruz, A., Marcos, A., Warnberg, J., Garagorri, J.M., Garagorri, M., Moreno, L.A., Martin-Matillas, M., Campoy, C., Martí, A., et al. (2009). Shifts in clostridia, bacteroides and immunoglobulin-coating fecal bacteria associated with weight loss in obese adolescents. Int J Obes (Lond) *33*, 758–767.

Nagel, S.C., Hagelbarger, J.L., and McDonnell, D.P. (2001). Development of an ER action indicator mouse for the study of estrogens, selective ER modulators (SERMs), and Xenobiotics. Endocrinology *142*, 4721–4728.

Nakajima, Y., Goldblum, R.M., and Midoro-Horiuti, T. (2012). Fetal exposure to bisphenol A as a risk factor for the development of childhood asthma: an animal model study. Environmental Health *11*.

Nardi, R.M., Silva, M.E., Vieira, E.C., Bambirra, E.A., and Nicoli, J.R. (1989). Intragastric infection of germfree and conventional mice with Salmonella typhimurium. Braz. J. Med. Biol. Res. *22*, 1389–1392.

Nathan, C.F. (1983). Mechanisms of macrophage antimicrobial activity. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. *77*, 620–630.

Navarro, G., Allard, C., Xu, W., and Mauvais-Jarvis, F. (2015). The role of androgens in metabolism, obesity, and diabetes in males and females: Androgens and Diabetes. Obesity *23*, 713–719.

Newbold, R.R., Jefferson, W.N., and Padilla-Banks, E. (2007). Long-term adverse effects of neonatal exposure to bisphenol A on the murine female reproductive tract. Reproductive Toxicology *24*, 253–258.

Nikolopoulou, A., and Kadoglou, N.P. (2012). Obesity and metabolic syndrome as related to cardiovascular disease. Expert Review of Cardiovascular Therapy *10*, 933–939.

Ning, G., Bi, Y., Wang, T., Xu, M., Xu, Y., Huang, Y., Li, M., Li, X., Wang, W., Chen, Y., et al. (2011). Relationship of Urinary Bisphenol A Concentration to Risk for Prevalent Type 2 Diabetes in Chinese Adults: A Cross-sectional Analysis. Annals of Internal Medicine *155*, 368.

Nishizawa, H., Imanishi, S., and Manabe, N. (2005). Effects of exposure in utero to bisphenol a on the expression of aryl hydrocarbon receptor, related factors, and xenobiotic metabolizing enzymes in murine embryos. J. Reprod. Dev. *51*, 593–605.

Novelli, M., Piaggi, S., and Tata, V.D. (2005). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced impairment of glucose-stimulated insulin secretion in isolated rat pancreatic islets. Toxicology Letters *156*, 307–314.

Nygaard, U.C., Vinje, N.E., Samuelsen, M., Andreassen, M., Groeng, E.-C., Bølling, A.K., Becher, R., Lovik, M., and Bodin, J. (2015). Early life exposure to bisphenol A investigated in mouse models of airway allergy, food allergy and oral tolerance. Food and Chemical Toxicology *83*, 17–25.

Ochel, M., Vohr, H.W., Pfeiffer, C., and Gleichmann, E. (1991). IL-4 is required for the IgE and IgG1 increase and IgG1 autoantibody formation in mice treated with mercuric chloride. J. Immunol. *146*, 3006–3011.

Ogden, C.L., Carroll, M.D., Fryar, C.D., and Flegal, K.M. (2015). Prevalence of obesity among adults and youth: United States, 2011-2014 (US Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Health Statistics).

O'Hara, A.M., and Shanahan, F. (2006). The gut flora as a forgotten organ. EMBO Rep. *7*, 688–693.

Ohlstein, J.F., Strong, A.L., McLachlan, J.A., Gimble, J.M., Burow, M.E., and Bunnell, B.A. (2014). Bisphenol A enhances adipogenic differentiation of human adipose stromal/stem cells. Journal of Molecular Endocrinology *53*, 345–353.

Ohtake, F., Takeyama, K., Matsumoto, T., Kitagawa, H., Yamamoto, Y., Nohara, K., Tohyama, C., Krust, A., Mimura, J., Chambon, P., et al. (2003). Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor. Nature *423*, 545–550.

Olde, B., and Leeb-Lundberg, L.M.F. (2009). GPR30/GPER1: searching for a role in estrogen physiology. Trends in Endocrinology & Metabolism *20*, 409–416.

Olsén, L., Lind, L., and Lind, P.M. (2012). Associations between circulating levels of bisphenol A and phthalate metabolites and coronary risk in the elderly. Ecotoxicology and Environmental Safety *80*, 179–183.

Ortiga-Carvalho, T.M., Sidhaye, A.R., and Wondisford, F.E. (2014). Thyroid hormone receptors and resistance to thyroid hormone disorders. Nature Reviews Endocrinology *10*, 582–591.

Ottman, N., Smidt, H., de Vos, W.M., and Belzer, C. (2012). The function of our microbiota: who is out there and what do they do? Frontiers in Cellular and Infection Microbiology *2*.

Owens, C.V., Lambright, C., Bobseine, K., Ryan, B., Gray, L.E., Gullett, B.K., and Wilson, V.S. (2007). Identification of estrogenic compounds emitted from the combustion of computer printed circuit boards in electronic waste. Environ. Sci. Technol. *41*, 8506–8511.

Owyang, A.M., Zaph, C., Wilson, E.H., Guild, K.J., McClanahan, T., Miller, H.R.P., Cua, D.J., Goldschmidt, M., Hunter, C.A., Kastelein, R.A., et al. (2006). Interleukin 25 regulates type 2 cytokine-dependent immunity and limits chronic inflammation in the gastrointestinal tract. The Journal of Experimental Medicine *203*, 843–849.

Padmanabhan, P., Grosse, J., Asad, A.B.M.A., Radda, G.K., and Golay, X. (2013). Gastrointestinal transit measurements in mice with 99mTc-DTPA-labeled activated charcoal using NanoSPECT-CT. EJNMMI Research *3*, 60.

Padmanabhan, V., Siefert, K., Ransom, S., Johnson, T., Pinkerton, J., Anderson, L., Tao, L., and Kannan, K. (2008). Maternal bisphenol-A levels at delivery: a looming problem? J Perinatol *28*, 258–263.

Palm, N.W., de Zoete, M.R., and Flavell, R.A. (2015). Immune–microbiota interactions in health and disease. Clinical Immunology *159*, 122–127.

Palmer, C., Bik, E.M., DiGiulio, D.B., Relman, D.A., and Brown, P.O. (2007). Development of the human infant intestinal microbiota. PLoS Biol. *5*, e177.

Pan, C., Tang, J., Wang, X., Wu, F., Ge, J., and Chen, F. (2014). Role of Interleukin-22 in liver diseases. Inflammation Research *63*, 519–525.

Panel on Food Contact Materials, Enzymes, Flavourings and Processing Aids (CEF), Silano, V., Bolognesi, C., Castle, L., Cravedi, J.-P., Engel, K.-H., Fowler, P., Franz, R., Grob, K., Gürtler, R., et al. (2016). A statement on the developmental immunotoxicity of bisphenol A (BPA): answer to the question from the Dutch Ministry of Health, Welfare and Sport. EFSA Journal *14*, e04580.

Pannacciulli, N., Ortega, E., Koska, J., Salbe, A.D., Bunt, J.C., and Krakoff, J. (2007). Glucose Response to an Oral Glucose Tolerance Test Predicts Weight Change in Non-diabetic Subjects*. Obesity *15*, 632–639.

Parigi, S.M., Eldh, M., Larssen, P., Gabrielsson, S., and Villablanca, E.J. (2015). Breast Milk and Solid Food Shaping Intestinal Immunity. Frontiers in Immunology *6*.

Park, H.-J., Park, H.-S., Lee, J.-U., Bothwell, A.L.M., and Choi, J.-M. (2016). Gender-specific differences in PPARγ regulation of follicular helper T cell responses with estrogen. Scientific Reports *6*.

Pene, J., Gauchat, J.-F., Lecart, S., Drouet, E., Guglielmi, P., Boulay, V., Delwail, A., Foster, D., Lecron, J.-C., and Yssel, H. (2004). Cutting Edge: IL-21 Is a Switch Factor for the Production of IgG1 and IgG3 by Human B Cells. The Journal of Immunology *172*, 5154–5157.

Pereira, S.S., and Alvarez-Leite, J.I. (2014). Low-Grade Inflammation, Obesity, and Diabetes. Curr Obes Rep *3*, 422–431.

Pereira-Fernandes, A., Demaegdt, H., Vandermeiren, K., Hectors, T.L.M., Jorens, P.G., Blust, R., and Vanparys, C. (2013). Evaluation of a screening system for obesogenic compounds: screening of endocrine disrupting compounds and evaluation of the PPAR dependency of the effect. PLoS ONE *8*, e77481.

Peterson, L.W., and Artis, D. (2014). Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. Nature Reviews Immunology *14*, 141–153.

Peterson, D.A., McNulty, N.P., Guruge, J.L., and Gordon, J.I. (2007). IgA Response to Symbiotic Bacteria as a Mediator of Gut Homeostasis. Cell Host & Microbe *2*, 328–339.

Pettersson, U.S., Waldén, T.B., Carlsson, P.-O., Jansson, L., and Phillipson, M. (2012). Female Mice are Protected against High-Fat Diet Induced Metabolic Syndrome and Increase the Regulatory T Cell Population in Adipose Tissue. PLoS ONE *7*, e46057.

Petzold, S., Averbeck, M., Simon, J.C., Lehmann, I., and Polte, T. (2014). Lifetime-Dependent Effects of Bisphenol A on Asthma Development in an Experimental Mouse Model. PLoS ONE *9*, e100468.

Polanczyk, M.J., Carson, B.D., Subramanian, S., Afentoulis, M., Vandenbark, A.A., Ziegler, S.F., and Offner, H. (2004). Cutting edge: estrogen drives expansion of the CD4+CD25+ regulatory T cell compartment. J Immunol *173*, 2227–2230.

Porras, S.P., Heinälä, M., and Santonen, T. (2014). Bisphenol A exposure via thermal paper receipts. Toxicology Letters *230*, 413–420.

Pot, C. (2012). Aryl hydrocarbon receptor controls regulatory CD4+T cell function. Swiss Medical Weekly.

Pottenger, L.H., Domoradzki, J.Y., Markham, D.A., Hansen, S.C., Cagen, S.Z., and Waechter, J.M. (2000). The relative bioavailability and metabolism of bisphenol A in rats is dependent upon the route of administration. Toxicol. Sci. *54*, 3–18.

Prakash, S., Rodes, L., Coussa-Charley, M., Tomaro-Duchesneau, C., Tomaro-Duchesneau, C., Coussa-Charley, and Rodes (2011). Gut microbiota: next frontier in understanding human health and development of biotherapeutics. Biologics: Targets and Therapy 71.

Prins, G., Birch, L., Tang, W., and Ho, S. (2007). Developmental estrogen exposures predispose to prostate carcinogenesis with aging? Reproductive Toxicology *23*, 374–382.

Qiu, J., Heller, J.J., Guo, X., Chen, Z.E., Fish, K., Fu, Y.-X., and Zhou, L. (2012). The aryl hydrocarbon receptor regulates gut immunity through modulation of innate lymphoid cells. Immunity *36*, 92–104.

Qiu, J., Guo, X., Chen, Z.-M.E., He, L., Sonnenberg, G.F., Artis, D., Fu, Y.-X., and Zhou, L. (2013). Group 3 innate lymphoid cells inhibit T-cell-mediated intestinal inflammation through aryl hydrocarbon receptor signaling and regulation of microflora. Immunity *39*, 386–399.

Qiu, W., Chen, J., Li, Y., Chen, Z., Jiang, L., Yang, M., and Wu, M. (2016). Oxidative stress and immune disturbance after long-term exposure to bisphenol A in juvenile common carp (Cyprinus carpio). Ecotoxicology and Environmental Safety *130*, 93–102.

Quintana, F.J., Basso, A.S., Iglesias, A.H., Korn, T., Farez, M.F., Bettelli, E., Caccamo, M., Oukka, M., and Weiner, H.L. (2008). Control of Treg and TH17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. Nature *453*, 65–71.

Ramos, J.G., Varayoud, J., Kass, L., Rodríguez, H., Costabel, L., Muñoz-De-Toro, M., and Luque, E.H. (2003). Bisphenol a induces both transient and permanent histofunctional alterations of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in prenatally exposed male rats. Endocrinology *144*, 3206–3215.

Reachcentrum (2010). Bisphenol A REACH consortium.

Remely, M., Aumueller, E., Merold, C., Dworzak, S., Hippe, B., Zanner, J., Pointner, A., Brath, H., and Haslberger, A.G. (2014). Effects of short chain fatty acid producing bacteria on epigenetic regulation of FFAR3 in type 2 diabetes and obesity. Gene *537*, 85–92.

Renz, H., Brandtzaeg, P., and Hornef, M. (2011). The impact of perinatal immune development on mucosal homeostasis and chronic inflammation. Nat. Rev. Immunol. *12*, 9–23.

Renz-Polster, H., David, M.R., Buist, A.S., Vollmer, W.M., O'Connor, E.A., Frazier, E.A., and Wall, M.A. (2005). Caesarean section delivery and the risk of allergic disorders in childhood. Clinical <html_ent Glyph="@amp;" Ascii="&"/> Experimental Allergy *35*, 1466–1472.

Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B., Francolini, M., Rotta, G., Bonasio, R., Granucci, F., Kraehenbuhl, J.P., and Ricciardi-Castagnoli, P. (2001). Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. Nat. Immunol. *2*, 361–367.

Rinne, M., Kalliomaki, M., Arvilommi, H., Salminen, S., and Isolauri, E. (2005). Effect of probiotics and breastfeeding on the bifidobacterium and lactobacillus/enterococcus microbiota and humoral immune responses. J. Pediatr. *147*, 186–191.

Riu, A., Grimaldi, M., le Maire, A., Bey, G., Phillips, K., Boulahtouf, A., Perdu, E., Zalko, D., Bourguet, W., and Balaguer, P. (2011). Peroxisome proliferator-activated receptor γ is a target for halogenated analogs of bisphenol A. Environ. Health Perspect. *119*, 1227–1232.

Rochester, J.R., and Bolden, A.L. (2015). Bisphenol S and F: A Systematic Review and Comparison of the Hormonal Activity of Bisphenol A Substitutes. Environmental Health Perspectives.

Rogers, J.A., Metz, L., and Yong, V.W. (2012). Review: Endocrine disrupting chemicals and immune responses: a focus on bisphenol-A and its potential mechanisms. Mol Immunol *53*, 421–430.

Rogers, J.A., Mishra, M.K., Hahn, J., Greene, C.J., Yates, R.M., Metz, L.M., and Yong, V.W. (2017). Gestational bisphenol-A exposure lowers the threshold for autoimmunity in a model of multiple sclerosis. Proceedings of the National Academy of Sciences *114*, 4999–5004.

Rolla, S., Alchera, E., Imarisio, C., Bardina, V., Valente, G., Cappello, P., Mombello, C., Follenzi, A., Novelli, F., and Carini, R. (2016). The balance between IL-17 and IL-22 produced by liver-infiltrating T-helper cells critically controls NASH development in mice. Clin. Sci. *130*, 193–203.

Rönn, M., Lind, L., Örberg, J., Kullberg, J., Söderberg, S., Larsson, A., Johansson, L., Ahlström, H., and Lind, P.M. (2014). Bisphenol A is related to circulating levels of adiponectin, leptin and ghrelin, but not to fat mass or fat distribution in humans. Chemosphere *112*, 42–48.

Ross, M.G., and Beall, M.H. (2008). Adult Sequelae of Intrauterine Growth Restriction. Seminars in Perinatology *32*, 213–218.

Routledge, E.J., White, R., Parker, M.G., and Sumpter, J.P. (2000). Differential Effects of Xenoestrogens on Coactivator Recruitment by Estrogen Receptor (ER) α and ERβ. Journal of Biological Chemistry *275*, 35986–35993.

Roy, A., Bauer, S.M., and Lawrence, B.P. (2012). Developmental Exposure to Bisphenol A Modulates Innate but Not Adaptive Immune Responses to Influenza A Virus Infection. PLoS ONE *7*, e38448.

Roy, A., Gaylo, A., Cao, W., Saubermann, L.J., and Lawrence, B.P. (2013). Neither direct nor developmental exposure to bisphenol A alters the severity of experimental inflammatory colitis in mice. Journal of Immunotoxicology *10*, 334–340.

Rubin, B.S., Murray, M.K., Damassa, D.A., King, J.C., and Soto, A.M. (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.

Rubin, B.S., Lenkowski, J.R., Schaeberle, C.M., Vandenberg, L.N., Ronsheim, P.M., and Soto, A.M. (2006). Evidence of altered brain sexual differentiation in mice exposed perinatally to low, environmentally relevant levels of bisphenol A. Endocrinology *147*, 3681–3691.

Sad, S., Marcotte, R., and Mosmann, T.R. (1995). Cytokine-induced differentiation of precursor mouse CD8+ T cells into cytotoxic CD8+ T cells secreting Th1 or Th2 cytokines. Immunity *2*, 271–279.

Samavat, H., and Kurzer, M.S. (2015). Estrogen metabolism and breast cancer. Cancer Letters *356*, 231–243.

Satokari, R., Grönroos, T., Laitinen, K., Salminen, S., and Isolauri, E. (2009). Bifidobacterium and Lactobacillus DNA in the human placenta. Lett. Appl. Microbiol. *48*, 8–12.

Sawa, S., Lochner, M., Satoh-Takayama, N., Dulauroy, S., Bérard, M., Kleinschek, M., Cua, D., Di Santo, J.P., and Eberl, G. (2011). RORγt+ innate lymphoid cells regulate intestinal homeostasis by integrating negative signals from the symbiotic microbiota. Nat. Immunol. *12*, 320–326.

Schatz, M., and Rosenwasser, L. (2014). The allergic asthma phenotype. J Allergy Clin Immunol Pract *2*, 645–648; quiz 649.

Scholtens, P.A.M.J., Oozeer, R., Martin, R., Amor, K.B., and Knol, J. (2012). The early settlers: intestinal microbiology in early life. Annu Rev Food Sci Technol *3*, 425–447.

Schönfelder, G., Wittfoht, W., Hopp, H., Talsness, C.E., Paul, M., and Chahoud, I. (2002). Parent bisphenol A accumulation in the human maternal-fetal-placental unit. Environ. Health Perspect. *110*, A703-707.

Schulert, G.S., and Graham, T.B. (2014). Chronic inflammatory arthritis of the ankle/hindfoot/midfoot complex in children with extreme obesity. J Clin Rheumatol *20*, 317–321.

Segal, D.M., Taurog, J.D., and Metzger, H. (1977). Dimeric immunoglobulin E serves as a unit signal for mast cell degranulation. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *74*, 2993–2997.

Shankar, A., and Teppala, S. (2011). Relationship between urinary bisphenol A levels and diabetes mellitus. J. Clin. Endocrinol. Metab. *96*, 3822–3826.

Shankar, A., Teppala, S., and Sabanayagam, C. (2012). Urinary bisphenol a levels and measures of obesity: results from the national health and nutrition examination survey 2003-2008. ISRN Endocrinol *2012*, 965243.

Shanle, E.K., and Xu, W. (2011). Endocrine Disrupting Chemicals Targeting Estrogen Receptor Signaling: Identification and Mechanisms of Action. Chemical Research in Toxicology *24*, 6–19.

Shearer, W.T., Rosenblatt, H.M., Gelman, R.S., Oyomopito, R., Plaeger, S., Stiehm, E.R., Wara, D.W., Douglas, S.D., Luzuriaga, K., McFarland, E.J., et al. (2003). Lymphocyte subsets in healthy children from birth through 18 years of age. Journal of Allergy and Clinical Immunology *112*, 973–980.

Silver, M.K., O'Neill, M.S., Sowers, M.R., and Park, S.K. (2011). Urinary Bisphenol A and Type-2 Diabetes in U.S. Adults: Data from NHANES 2003-2008. PLoS ONE *6*, e26868.

Singh, S., and Li, S.S.-L. (2012). Epigenetic Effects of Environmental Chemicals Bisphenol A and Phthalates. International Journal of Molecular Sciences *13*, 10143–10153.

Singh, N.P., Singh, U.P., Rouse, M., Zhang, J., Chatterjee, S., Nagarkatti, P.S., and Nagarkatti, M. (2016). Dietary Indoles Suppress Delayed-Type Hypersensitivity by Inducing a Switch from Proinflammatory Th17 Cells to Anti-Inflammatory Regulatory T Cells through Regulation of MicroRNA. The Journal of Immunology *196*, 1108–1122.

Skakkebaek, N.E., Toppari, J., Söder, O., Gordon, C.M., Divall, S., and Draznin, M. (2011). The exposure of fetuses and children to endocrine disrupting chemicals: a European Society for Paediatric Endocrinology (ESPE) and Pediatric Endocrine Society (PES) call to action statement. J. Clin. Endocrinol. Metab. *96*, 3056–3058.

Snapper, C.M., and Paul, W.E. (1987). Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. Science *236*, 944–947.

Somm, E., Schwitzgebel, V.M., Toulotte, A., Cederroth, C.R., Combescure, C., Nef, S., Aubert, M.L., and Hüppi, P.S. (2009). Perinatal exposure to bisphenol a alters early adipogenesis in the rat. Environ. Health Perspect. *117*, 1549–1555.

Song, S., Zhang, L., Zhang, H., Wei, W., and Jia, L. (2014). Perinatal BPA Exposure Induces Hyperglycemia, Oxidative Stress and Decreased Adiponectin Production in Later Life of Male Rat Offspring. International Journal of Environmental Research and Public Health *11*, 3728–3742.

Spits, H., and Cupedo, T. (2012). Innate lymphoid cells: emerging insights in development, lineage relationships, and function. Annu. Rev. Immunol. *30*, 647–675.

Sprague, B.L., Trentham-Dietz, A., Hedman, C.J., Wang, J., Hemming, J.D., Hampton, J.M., Buist, D.S., Aiello Bowles, E.J., Sisney, G.S., and Burnside, E.S. (2013). Circulating serum xenoestrogens and mammographic breast density. Breast Cancer Res. *15*, R45.

Stewart, A.S., Pratt-Phillips, S., and Gonzalez, L.M. (2017). Alterations in Intestinal Permeability: The Role of the "Leaky Gut" in Health and Disease. Journal of Equine Veterinary Science *52*, 10–22.

Stockinger, B., Di Meglio, P., Gialitakis, M., and Duarte, J.H. (2014). The aryl hydrocarbon receptor: multitasking in the immune system. Annu. Rev. Immunol. *32*, 403–432.

Straub, R.H. (2007). The Complex Role of Estrogens in Inflammation. Endocrine Reviews *28*, 521–574.

Strissel, K.J., Stancheva, Z., Miyoshi, H., Perfield, J.W., DeFuria, J., Jick, Z., Greenberg, A.S., and Obin, M.S. (2007). Adipocyte Death, Adipose Tissue Remodeling, and Obesity Complications. Diabetes *56*, 2910–2918.

Stroheker, T., Chagnon, M.-C., Pinnert, M.-F., Berges, R., and Canivenc-Lavier, M.-C. (2003). Estrogenic effects of food wrap packaging xenoestrogens and flavonoids in female Wistar rats: a comparative study. Reprod. Toxicol. *17*, 421–432.

Sudo, N., Sawamura, S., Tanaka, K., Aiba, Y., Kubo, C., and Koga, Y. (1997). The requirement of intestinal bacterial flora for the development of an IgE production system fully susceptible to oral tolerance induction. J. Immunol. *159*, 1739–1745.

Sueiro, R.A., Suárez, S., Araujo, M., and Garrido, M.J. (2003). Mutagenic and genotoxic evaluation of bisphenol F diglycidyl ether (BFDGE) in prokaryotic and eukaryotic systems. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis *536*, 39–48.

Sui, Y., Ai, N., Park, S.-H., Rios-Pilier, J., Perkins, J.T., Welsh, W.J., and Zhou, C. (2012). Bisphenol A and Its Analogues Activate Human Pregnane X Receptor. Environmental Health Perspectives *120*, 399–405.

Szabo, S.J., Sullivan, B.M., Peng, S.L., and Glimcher, L.H. (2003). Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. Annu. Rev. Immunol. *21*, 713–758.

Tabish, S.A. (2007). Is Diabetes Becoming the Biggest Epidemic of the Twenty-first Century? Int J Health Sci (Qassim) *1*, V–VIII.

Takao, Y., Lee, H.C., Kohra, S., and Arizono, K. (2002). Release of Bisphenol A from Food Can Lining upon Heating. JOURNAL OF HEALTH SCIENCE *48*, 331–334.

Takasawa, K., Kubota, N., Terauchi, Y., and Kadowaki, T. (2008). Impact of increased PPARgamma activity in adipocytes in vivo on adiposity, insulin sensitivity and the effects of rosiglitazone treatment. Endocr. J. *55*, 767–776.

Takeuchi, T., and Tsutsumi, O. (2002). Serum Bisphenol A Concentrations Showed Gender Differences, Possibly Linked to Androgen Levels. Biochemical and Biophysical Research Communications *291*, 76–78.

Takeuchi, T., Tsutsumi, O., Ikezuki, Y., Takai, Y., and Taketani, Y. (2004). Positive relationship between androgen and the endocrine disruptor, bisphenol A, in normal women and women with ovarian dysfunction. Endocr. J. *51*, 165–169.

Takizawa, D., Kakizaki, S., Horiguchi, N., Yamazaki, Y., Tojima, H., and Mori, M. (2011). Constitutive active/androstane receptor promotes hepatocarcinogenesis in a mouse model of non-alcoholic steatohepatitis. Carcinogenesis *32*, 576–583.

Tamboli, C.P., Neut, C., Desreumaux, P., and Colombel, J.F. (2004). Dysbiosis in inflammatory bowel disease. Gut *53*, 1–4.

Tang, Y., Bian, Z., Zhao, L., Liu, Y., Liang, S., Wang, Q., Han, X., Peng, Y., Chen, X., Shen, L., et al. (2011). Interleukin-17 exacerbates hepatic steatosis and inflammation in non-alcoholic fatty liver disease. Clin. Exp. Immunol. *166*, 281–290.

Tarapore, P., Ying, J., Ouyang, B., Burke, B., Bracken, B., and Ho, S.-M. (2014). Exposure to bisphenol A correlates with early-onset prostate cancer and promotes centrosome amplification and anchorage-independent growth in vitro. PLoS ONE *9*, e90332.

Teng, C., Goodwin, B., Shockley, K., Xia, M., Huang, R., Norris, J., Merrick, B.A., Jetten, A.M., Austin, C.P., and Tice, R.R. (2013). Bisphenol A affects androgen receptor function via multiple mechanisms. Chem. Biol. Interact. *203*, 556–564.

Thayer, K.A., Taylor, K.W., Garantziotis, S., Schurman, S.H., Kissling, G.E., Hunt, D., Herbert, B., Church, R., Jankowich, R., Churchwell, M.I., et al. (2015). Bisphenol A, Bisphenol S, and 4-Hydroxyphenyl 4-Isoprooxyphenylsulfone (BPSIP) in Urine and Blood of Cashiers. Environmental Health Perspectives *124*.

Thomas, P., and Dong, J. (2006). 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. *102*, 175–179.

Thomas, F., Hehemann, J.-H., Rebuffet, E., Czjzek, M., and Michel, G. (2011). Environmental and Gut Bacteroidetes: The Food Connection. Frontiers in Microbiology *2*.

Tian, X., Takamoto, M., and Sugane, K. (2003). Bisphenol A promotes IL-4 production by Th2 cells. Int. Arch. Allergy Immunol. *132*, 240–247.

Timms, B.G., Howdeshell, K.L., Barton, L., Bradley, S., Richter, C.A., and vom Saal, F.S. (2005). Estrogenic chemicals in plastic and oral contraceptives disrupt development of the fetal mouse prostate and urethra. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *102*, 7014–7019.

Tomas, J., Wrzosek, L., Bouznad, N., Bouet, S., Mayeur, C., Noordine, M.-L., Honvo-Houeto, E., Langella, P., Thomas, M., and Cherbuy, C. (2013). Primocolonization is associated with colonic epithelial maturation during conventionalization. FASEB J. *27*, 645–655.

Trasande, L., Attina, T.M., and Blustein, J. (2012). Association Between Urinary Bisphenol A Concentration and Obesity Prevalence in Children and Adolescents. JAMA *308*, 1113.

Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Mahowald, M.A., Magrini, V., Mardis, E.R., and Gordon, J.I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. Nature *444*, 1027–1031.

Tyagi, A.M., Srivastava, K., Mansoori, M.N., Trivedi, R., Chattopadhyay, N., and Singh, D. (2012). Estrogen Deficiency Induces the Differentiation of IL-17 Secreting Th17 Cells: A New Candidate in the Pathogenesis of Osteoporosis. PLoS ONE *7*, e44552.

Ünüvar, T., and Büyükgebiz, A. (2012). Fetal and Neonatal Endocrine Disruptors. Journal of Clinical Research in Pediatric Endocrinology *4*, 51–60.

U.S. Environmental Protection Agency (1988). Bisphenol A; CASRN 80 -05-7.

Vaishnavi, C. (2013). Translocation of gut flora and its role in sepsis. Indian Journal of Medical Microbiology *31*, 334.

Valentino, R., D'Esposito, V., Passaretti, F., Liotti, A., Cabaro, S., Longo, M., Perruolo, G., Oriente, F., Beguinot, F., and Formisano, P. (2013). Bisphenol-A Impairs Insulin Action and Up-Regulates Inflammatory Pathways in Human Subcutaneous Adipocytes and 3T3-L1 Cells. PLoS ONE *8*, e82099.

Vandenberg, L.N., Maffini, M.V., Schaeberle, C.M., Ucci, A.A., Sonnenschein, C., Rubin, B.S., and Soto, A.M. (2008). Perinatal exposure to the xenoestrogen bisphenol-A induces mammary intraductal hyperplasias in adult CD-1 mice. Reprod. Toxicol. *26*, 210–219.

Viñas, R., and Watson, C.S. (2013). Bisphenol S disrupts estradiol-induced nongenomic signaling in a rat pituitary cell line: effects on cell functions. Environ. Health Perspect. *121*, 352–358.

Völkel, W., Colnot, T., Csanády, G.A., Filser, J.G., and Dekant, W. (2002). Metabolism and kinetics of bisphenol a in humans at low doses following oral administration. Chem. Res. Toxicol. *15*, 1281–1287.

Völkel, W., Kiranoglu, M., and Fromme, H. (2008). Determination of free and total bisphenol A in human urine to assess daily uptake as a basis for a valid risk assessment. Toxicol. Lett. *179*, 155–162.

Vono, M., Lin, A., Norrby-Teglund, A., Koup, R.A., Liang, F., and Loré, K. (2017). Neutrophils acquire the capacity for antigen presentation to memory CD4 $^{+}$ T cells in vitro and ex vivo. Blood *129*, 1991–2001.

Wade, G.N., Gray, J.M., and Bartness, T.J. (1985). Gonadal influences on adiposity. Int J Obes *9 Suppl 1*, 83–92.

Walters, K.A., Simanainen, U., and Handelsman, D.J. (2010). Molecular insights into androgen actions in male and female reproductive function from androgen receptor knockout models. Human Reproduction Update *16*, 543–558.

Wang, C., Dehghani, B., Li, Y., Kaler, L.J., Vandenbark, A.A., and Offner, H. (2009). Oestrogen modulates experimental autoimmune encephalomyelitis and interleukin-17 production via programmed death 1. Immunology *126*, 329–335.

Wang, S., Xia, P., Chen, Y., Qu, Y., Xiong, Z., Ye, B., Du, Y., Tian, Y., Yin, Z., Xu, Z., et al. (2017). Regulatory Innate Lymphoid Cells Control Innate Intestinal Inflammation. Cell *171*, 201–216.e18.

Wang, T., Li, M., Chen, B., Xu, M., Xu, Y., Huang, Y., Lu, J., Chen, Y., Wang, W., Li, X., et al. (2012). Urinary bisphenol A (BPA) concentration associates with obesity and insulin resistance. J. Clin. Endocrinol. Metab. *97*, E223-227.

Wang, T., Lu, J., Xu, M., Xu, Y., Li, M., Liu, Y., Tian, X., Chen, Y., Dai, M., Wang, W., et al. (2013). Urinary Bisphenol A Concentration and Thyroid Function in Chinese Adults: Epidemiology *24*, 295–302.

Wang, Y.-F., Chao, H.-R., Wu, C.-H., Tseng, C.-H., Kuo, Y.-T., and Tsou, T.-C. (2010). A recombinant peroxisome proliferator response element-driven luciferase assay for evaluation of potential environmental obesogens. Biotechnology Letters *32*, 1789–1796.

Watson, C.J., Rowland, M., and Warhurst, G. (2001). Functional modeling of tight junctions in intestinal cell monolayers using polyethylene glycol oligomers. Am. J. Physiol., Cell Physiol. *281*, C388-397.

Weir, T.L., Manter, D.K., Sheflin, A.M., Barnett, B.A., Heuberger, A.L., and Ryan, E.P. (2013). Stool Microbiome and Metabolome Differences between Colorectal Cancer Patients and Healthy Adults. PLoS ONE *8*, e70803.

Weiskopf, D., Weinberger, B., and Grubeck-Loebenstein, B. (2009). The aging of the immune system. Transplant International *22*, 1041–1050.

Wetherill, Y.B., Petre, C.E., Monk, K.R., Puga, A., and Knudsen, K.E. (2002). The xenoestrogen bisphenol A induces inappropriate androgen receptor activation and mitogenesis in prostatic adenocarcinoma cells. Mol. Cancer Ther. *1*, 515–524.

Wetherill, Y.B., Fisher, N.L., Staubach, A., Danielsen, M., de Vere White, R.W., and Knudsen, K.E. (2005). Xenoestrogen action in prostate cancer: pleiotropic effects dependent on androgen receptor status. Cancer Res. *65*, 54–65.

WHO (2017a). WHO | Global Health Observatory (GHO) data. World Health Organization *http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/obesity_text/en/#*.

WHO (2017b). WHO | Data and statistics about Obesity in Europe. World Health Organization *http://www.euro.who.int/en/health-topics/noncommunicable-diseases/obesity/data-and-statistics*.

WHO (2017c). WHO | Data and statistics about Diabetes in America. World Health Organization *http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=rdmore&cid=4401&Itemid=40877&lang=fr*.

WHO (2017d). WHO | Data and statistics about Diabetes in Europe. World Health Organization *http://www.euro.who.int/en/health-topics/noncommunicable-diseases/diabetes/data-and-statistics*.

Wong, G.H., Clark-Lewis, I., McKimm-Breschkin, L., Harris, A.W., and Schrader, J.W. (1983). Interferon-gamma induces enhanced expression of Ia and H-2 antigens on B lymphoid, macrophage, and myeloid cell lines. J. Immunol. *131*, 788–793.

Woodhouse, A.J., and Cooke, G.M. (2004). Suppression of aromatase activity in vitro by PCBs 28 and 105 and Aroclor 1221. Toxicology Letters *152*, 91–100.

Wozniak, A.L., Bulayeva, N.N., and Watson, C.S. (2005). Xenoestrogens at picomolar to nanomolar concentrations trigger membrane estrogen receptor-alpha-mediated Ca2+ fluxes and prolactin release in GH3/B6 pituitary tumor cells. Environ. Health Perspect. *113*, 431–439.

Wrzosek, L., Miquel, S., Noordine, M.-L., Bouet, S., Joncquel Chevalier-Curt, M., Robert, V., Philippe, C., Bridonneau, C., Cherbuy, C., Robbe-Masselot, C., et al. (2013). Bacteroides

thetaiotaomicron and Faecalibacterium prausnitzii influence the production of mucus glycans and the development of goblet cells in the colonic epithelium of a gnotobiotic model rodent. BMC Biol. *11*, 61.

Wu, G.D., Chen, J., Hoffmann, C., Bittinger, K., Chen, Y.-Y., Keilbaugh, S.A., Bewtra, M., Knights, D., Walters, W.A., Knight, R., et al. (2011). Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. Science *334*, 105–108.

Yadav, M., Stephan, S., and Bluestone, J.A. (2013). Peripherally induced tregs - role in immune homeostasis and autoimmunity. Front Immunol *4*, 232.

Yamaguchi, Y., Hayashi, Y., Sugama, Y., Miura, Y., Kasahara, T., Kitamura, S., Torisu, M., Mita, S., Tominaga, A., and Takatsu, K. (1988). Highly purified murine interleukin 5 (IL-5) stimulates eosinophil function and prolongs in vitro survival. IL-5 as an eosinophil chemotactic factor. J. Exp. Med. *167*, 1737–1742.

Yamasaki, K., Noda, S., Imatanaka, N., and Yakabe, Y. (2004). Comparative study of the uterotrophic potency of 14 chemicals in a uterotrophic assay and their receptor-binding affinity. Toxicol. Lett. *146*, 111–120.

Ye, X., Wong, L.-Y., Kramer, J., Zhou, X., Jia, T., and Calafat, A.M. (2015). Urinary Concentrations of Bisphenol A and Three Other Bisphenols in Convenience Samples of U.S. Adults during 2000-2014. Environ. Sci. Technol. *49*, 11834–11839.

Yen, P.M. (2001). Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. Physiol. Rev. *81*, 1097–1142.

Zachar, Z., and Savage, D.C. (1979). Microbial interference and colonization of the murine gastrointestinal tract by Listeria monocytogenes. Infect. Immun. *23*, 168–174.

Zackular, J.P., Baxter, N.T., Iverson, K.D., Sadler, W.D., Petrosino, J.F., Chen, G.Y., and Schloss, P.D. (2013). The Gut Microbiome Modulates Colon Tumorigenesis. MBio *4*, e00692-13-e00692-13.

Zalko, D., Jacques, C., Duplan, H., Bruel, S., and Perdu, E. (2011). Viable skin efficiently absorbs and metabolizes bisphenol A. Chemosphere *82*, 424–430.

Zambrano-Zaragoza, J.F., Romo-Martínez, E.J., Durán-Avelar, M. de J., García-Magallanes, N., and Vibanco-Pérez, N. (2014). Th17 cells in autoimmune and infectious diseases. Int J Inflam *2014*, 651503.

Zapata, H.J., and Quagliarello, V.J. (2015). The Microbiota and Microbiome in Aging: Potential Implications in Health and Age-Related Diseases. Journal of the American Geriatrics Society *63*, 776–781.

Zelante, T., Iannitti, R.G., Cunha, C., De Luca, A., Giovannini, G., Pieraccini, G., Zecchi, R., D'Angelo, C., Massi-Benedetti, C., Fallarino, F., et al. (2013). Tryptophan Catabolites from Microbiota Engage Aryl Hydrocarbon Receptor and Balance Mucosal Reactivity via Interleukin-22. Immunity *39*, 372–385.

Zhou, L. (2016). AHR Function in Lymphocytes: Emerging Concepts. Trends in Immunology *37*, 17–31.

Zimmerman-Downs, J.M., Shuman, D., Stull, S.C., and Ratzlaff, R.E. (2010). Bisphenol A blood and saliva levels prior to and after dental sealant placement in adults. J Dent Hyg *84*, 145–150.

Zimmers, S.M., Browne, E.P., O'Keefe, P.W., Anderton, D.L., Kramer, L., Reckhow, D.A., and Arcaro, K.F. (2014). Determination of free Bisphenol A (BPA) concentrations in breast milk of U.S. women using a sensitive LC/MS/MS method. Chemosphere *104*, 237–243.

Zoeller, R.T. (2010). New insights into thyroid hormone action in the developing brain: the importance of T3 degradation. Endocrinology *151*, 5089–5091.

Characterization of the immuno-modulatory impacts of perinatal exposure to bisphenols in adult mice: consequences on the barrier function of the gut and on metabolic disorder susceptibility

The endocrine disruptor bisphenol A (BPA) is commonly found in food industry, more precisely in food contact packaging. BPA is used to manufacture polycarbonate plastics and epoxy resins lining food and beverage cans, becoming an ubiquitous contaminant in human food. The extent of human exposure to this chemical is thought to be correlated with the occurrence of disorders like food intolerance, obesity and type-2 diabetes (T2D). During last years, a particular interest have been raised about its ability to disrupt various physiological functions, including immune system, after perinatal exposure at relevant environmental doses for Human.

In the first study, we showed that perinatal exposure to BPA (50 µg/kg body weight/day) decreased anti-microbial activity and ileal lysozyme expression in the female mouse offspring. In those mice, we observed an increased gut permeability, in association with an increase of colonic IFN-γ level. Moreover, we observed a decrease of IgA^+ cells with a loss of IgA secretion into faeces, depicting intestinal barrier and defense function defects in BPA female offspring. Interestingly, a decrease of the intestinal ILC3 frequency associated with an increase of IgG against commensal *E.coli* in sera have been observed in these individuals. These effects were linked to a defect of maturation and migratory ability of dendritic cells from *lamina propria* (LP) and spleen. Perinatal exposure to BPA also increased IFN-γ and IL-17 secretions after *in vitro* stimulation in the gut and elicited Th17 response in the spleen. Altogether, these effects support the ability of a perinatal exposure to BPA to induce oral intolerance with ageing in female offspring.

Secondly, we showed that perinatal exposure to BPA at the same dose led to intestinal and systemic immune system homeostasis disturbances in male mouse offspring at day 45, through a decrease of Th1 and Th17 frequencies in the LP and an increase of Th1 and Th17 response in spleen. These effects were associated with an altered glucose sensibility, a decrease of faecal IgA secretion and a fall of *bifidobacteria* in the microbiota of these individuals. These BPA-mediated events precede infiltration of pro-inflammatory M1 macrophages in gonadal white adipose tissue, together with a decreased insulin sensitivity and an increased weight gain. This longitudinal study allowed us to better understand the sequential events linked to perinatal exposure to BPA that lead to obesity and T2D, and highlighted the role of immune system linked to gut microbiota in the development of these metabolic disorders.

Finally, we hypothesized that two structural analogs of BPA –i.e., Bisphenol S and F- can display similar immune-modulatory effects that could lead to similar developmental disturbances than BPA in exposed-offspring. This hypothesis was tested in a preliminary experiment in female mouse offspring perinatally exposed to BPS and BPF. We also provided preliminary results of these two compounds, compared to BPA, from an *in vitro* study.

This thesis contributes to the increase knowledge about the immunotoxic effects of bisphenol compounds in the context of the Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD).

AUTEUR : Yann Malaisé

TITRE : Caractérisation chez la souris adulte des impacts immuno-modulateurs des bisphénols après exposition périnatale : conséquences sur la fonction barrière de l'intestin et la susceptibilité aux désordres métaboliques

DIRECTEURS DE THÈSE : Dr Laurence Guzylack-Piriou et Dr Eric Houdeau

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : Toxalim Toulouse, mardi 28 novembre 2017

Le bisphénol A (BPA) est un perturbateur endocrinien couramment employé dans l'industrie agro-alimentaire, en particulier pour les matériaux en contact des denrées alimentaires. Son utilisation dans la fabrication de polycarbonates et de résines époxy, recouvrant la face interne des boîtes de conserve et des canettes, en fait un contaminant ubiquitaire de l'alimentation humaine. L'augmentation de l'exposition humaine à ce contaminant a été corrélée avec la récurrence de certains troubles comme l'intolérance alimentaire, l'obésité ou le diabète de type 2. Ces dernières années, une attention particulière a été portée sur sa capacité à perturber différentes fonctions physiologiques, dont celle du système immunitaire, après exposition périnatale à des niveaux environnementaux pertinents pour l'Homme.

Dans une première étude, nous avons montré qu'une exposition périnatale au BPA à 50 µg/kg de poids corporel/jour induit une diminution de l'activité anti-microbienne corrélée à une chute de l'expression du lysozyme dans l'iléon de la descendance femelle. La perméabilité intestinale de ces individus augmente en association avec le niveau d'IFN-γ dans les muqueuses du côlon. De plus, nous observons une diminution des plasmocytes à IgA associée à une perte de sécrétion d'IgA dans les fèces, démontrant un défaut de la fonction barrière et des défenses de l'intestin chez la descendance BPA. De manière intéressante, une diminution de la fréquence des ILC3 intestinaux est observée chez ces individus, avec une augmentation du niveau d'IgG sanguin dirigé contre une *E.coli* commensale. Ces effets sont associés à un défaut de maturation et de capacité migratoire des cellules de la *lamina propria* (LP) et de la rate. L'exposition périnatale au BPA provoque une augmentation de la sécrétion d'IFN-γ et d'IL-17 après re-stimulation *in vitro* CD3/CD28 des cellules de la LP, et une réponse de type Th17 dans la rate. Réunis, ces effets confortent la capacité du BPA, lors d'une exposition périnatale, à induire une intolérance alimentaire chez la descendance femelle.

Dans une seconde étude, nous avons mis en évidence que l'exposition périnatale au BPA, à la même dose, induit des perturbations de l'homéostasie du système immunitaire intestinal et systémique chez la descendance mâle au jour 45, *via* une diminution de la fréquence des Th1 et Th17 dans la LP et une augmentation de la réponse Th1 et Th17 dans la rate. Ces impacts apparaissent en parallèle avec une altération de la sensibilité au glucose, une diminution de la sécrétion d'IgA dans les fèces et un appauvrissement des *bifodobacteria* dans le microbiote intestinal de ces individus. L'ensemble de ces évènements précède l'infiltration de macrophages M1 pro-inflammatoires dans le tissu adipeux péri-gonadique, en association avec une diminution de la sensibilité à l'insuline et une augmentation du poids corporel apparaissant avec le vieillissement (jour 170) chez la descendance BPA. Cette étude longitudinale a permis de proposer une séquence d'évènements aboutissant à un phénotype obèse et au T2D lors d'une exposition périnatale au BPA, et ainsi de comprendre le rôle du système immunitaire en lien avec le microbiote intestinal dans le développement de ces désordres métaboliques.

Enfin, nous émettons l'hypothèse que les bisphénols S et F, deux analogues structuraux du BPA, peuvent disposer de capacités immuno-modulatrices équivalentes à celles du BPA, susceptibles de provoquer les mêmes troubles chez la descendance. Nous avons testé cette hypothèse de manière préliminaire chez la descendance femelle après exposition périnatale au BPS et au BPF. Des résultats préliminaires d'études *in vitro* sur ces deux composés en comparaison au BPA sont également apportés.

Ce travail de thèse contribue à accroître les connaissances relatives aux effets immunotoxiques des bisphénols dans le contexte de l'origine développementale des pathologies chroniques de l'adulte (DOHaD).

MOTS-CLÉS : bisphénols, système immunitaire, intestin, désordres métaboliques, aryl hydrocarbon receptor

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : Pathologie, Toxicologie, Génétique & Nutrition

---

Unité Toxalim UMR 1331, 180 Chemin de Tournefeuille, 31300 Toulouse