



## Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible.

This is an author-deposited version published in : <http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints> ID : 12144

**To cite this version :**

Montagne, Candice. *Effets d'une exposition prénatale à un polluant, le bisphenol A, sur la transmission de l'immunité colostrale chez l'agneau*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2014, 57 p.

Any correspondance concerning this service should be sent to the repository administrator: [staff-oatao@inp-toulouse.fr](mailto:staff-oatao@inp-toulouse.fr).

# EFFETS D'UNE EXPOSITION PRÉNATALE A UN POLLUANT, LE BISPHEENOL A, SUR LA TRANSMISSION DE L'IMMUNITÉ COLOSTRALE CHEZ L'AGNEAU

---

THESE  
pour obtenir le grade de  
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement  
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

*par*

**MONTAGNE Candice**  
Née, le 9 juin 1987 à DAKAR (Sénégal)

---

**Directeur de thèse : Mme Véronique GAYRARD**

---

## JURY

PRESIDENT :  
**M. Jean-Marc SOULAT**

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :  
**Mme Véronique GAYRARD**  
**Mme Nicole HAGEN**

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE  
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRE INVITE :  
**Mme Catherine VIGUIE**

Docteur Vétérinaire



**Ministère de l'Agriculture de l'Agroalimentaire et de la Forêt**  
**ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE**

**Directeur** : M. Alain MILON

**PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE**

- M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
- M. **CORPET Denis**, *Science de l'Aliment et Technologies dans les Industries agro-alimentaires*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- M. **EUZEBY Jean**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
- M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
- M. **MARTINEAU Guy**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
- M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*
- M. **SAUTET Jean**, *Anatomie*
- M. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

**PROFESSEURS 1° CLASSE**

- M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootchnie*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*

**PROFESSEURS 2° CLASSE**

- Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **DUCOS DE LAHITTE Jacques**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*
- M. **SANS Pierre**, *Productions animales*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*

**PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE**

- Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*
- M. **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

**MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE**

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*  
M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*  
Mlle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*  
Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*  
M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*  
Mlle **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*  
M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*  
Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*  
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*  
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*  
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*

**MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)**

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*  
Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*  
Mlle **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*  
Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*  
Mlle **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie*  
M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*  
M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*  
M. **CUEVAS RAMOS Gabriel**, *Chirurgie Equine*  
Mme **DANIELS Hélène**, *Microbiologie-Pathologie infectieuse*  
M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*  
Mlle **FERRAN Aude**, *Physiologie*  
M. **GUERIN Jean-Luc**, *Elevage et Santé avicoles et cunicoles*  
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*  
Mlle **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique des animaux de rente*  
Mlle **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*  
M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*  
M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*  
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*  
M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*  
M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*  
Mlle **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*  
Mlle **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*  
Mme **PRADIER Sophie**, *Médecine interne des équidés*  
M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales (ruminants)*  
Mme **TROEGELER-MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*  
M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie (disponibilité à cpt du 01/09/10)*  
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*  
Mme **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

**MAITRES DE CONFERENCES et AGENTS CONTRACTUELS**

- M. **BOURRET Vincent**, *Microbiologie et infectiologie*  
Mme **FERNANDEZ Laura**, *Pathologie de la reproduction*

**ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS**

- Mlle **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*  
M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie*

# Remerciements

Aux membres du jury de thèse,

**A Monsieur le Professeur Jean-Marc SOULAT**

De l'Université Paul Sabatier,

Qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de mon jury de thèse.  
Hommage respectueux.

**A Madame le Docteur Véronique Gayrard-Troy**

De l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pour son encadrement, sa disponibilité et ses précieux conseils.  
Sincères remerciements.

**A Madame le docteur Catherine VIGUIE**

Docteur Vétérinaire.

Pour son aide, sa patience et sa disponibilité tout au long de l'élaboration de ce travail.  
Sincères reconnaissances.

**A Madame le Professeur Nicole Hagen-Picard**

De l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.  
Sincère reconnaissance.



## **Dédicaces**

### **A mes parents,**

merci de vous être investi dans mes études, pour tout ce que vous m'avez transmis et car vous avez toujours été là pour moi.

### **A mes sœurs,**

aujourd'hui chacune d'entre nous à trouver sa voie, et parce qu'on s'aime chacune à notre manière.

### **A mon frère,**

merci d'être là et je suis sûre que tu trouveras toi aussi ta voie.

### **A Eve, Anaïs et Julien,**

car c'est un peu grâce à vous que j'ai eu ce concours.

### **A mes copines de l'Ecole,**

merci pour votre soutien, votre joie de vivre et tous les bons moments passés ensemble ! Ces études sont passées bien vite à vos côtés.

### **A Tony, Sylvain et Cédric,**

merci pour les franches rigolades ! Je vous appellerai pour des conseils en NAC !

### **A Hervé,**

mon Amour, merci de m'avoir donné ce cœur si doux. Merci de ta patience, merci de m'avoir supporté tout au long de ces études et merci de ton aide dans l'élaboration de cette thèse.

### **A Tata et Milie,**

pour les moments d'évasion pendant ces 5 années d'école.

### **A Michel et Etiennette,**

pour m'avoir accepté dans leur famille dans les moments où la mienne me manquer.



<i>Introduction générale</i> : .....	14
<i>Introduction</i> .....	15
<b>CHAPITRE I -ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	17
<b>1. Quelques généralités</b> .....	17
<b>1.1. Toxicocinétique du bisphénol A</b> .....	17
1.1.1. Adulte.....	17
1.1.2. Fœtus et nouveau-né : .....	19
<b>1.2. BPA : un perturbateur endocrinien reprotoxique</b> .....	20
1.2.1. Données sur la capacité de liaison du BPA aux ER : .....	20
1.2.2. Effets oestrogénomimétiques : in vitro et in vivo.....	20
<b>1.3. Effet du BPA sur les grandes fonctions de l'organisme</b> .....	21
1.3.1. Reprotoxicité .....	21
1.3.2. Effet sur le métabolisme lipidique et glucidique .....	22
1.3.3. Thyroïde .....	22
<b>2. Œstradiol, bisphénol A et barrière digestive</b> : .....	23
<b>2.1. Physiologie digestive chez le nouveau-né</b> .....	23
2.1.1. Comparaison de la physiologie digestive chez l'homme et chez les ruminants .....	23
<b>2.2. Régulation de la barrière digestive par les œstrogènes et le BPA</b> .....	29
2.2.1. Régulation de la barrière intestinale colique par l'œstradiol et le BPA chez l'adulte : .....	29
2.2.2. Régulation de la barrière intestinale par les œstrogènes et le BPA en période périnatale .....	31
<b>3. Objectifs de travail</b> .....	33
<b>CHAPITRE II -ETUDE EXPERIMENTALE</b> .....	34
<b>1. Matériels et méthodes</b> .....	34
<b>1.1. Animaux : généralités</b> .....	34
<b>1.2. Conditions d'hébergement</b> .....	34
<b>1.3. Traitement de mise à la reproduction</b> .....	34
<b>1.4. Césarienne</b> .....	35
<b>1.5. Matériels tests et mise en solution</b> .....	35
<b>1.6. Traitement au BPA</b> .....	37
<b>1.7. Cinétiques d'absorption digestive</b> .....	37
1.7.1. Voie d'administration.....	37
1.7.2. Séquence de prélèvement d'échantillons sanguins.....	37
<b>1.8. Dosage des différents marqueurs de perméabilité</b> .....	38
<b>1.9. Dosage des IgG</b> .....	38
<b>1.10. Analyses des données</b> : .....	39
<b>2. Résultats</b> .....	40
<b>2.1. Exposition des mères</b> .....	40
<b>2.2. Evaluation de l'exposition materno-fœtale à la naissance</b> .....	42
<b>2.3. Evaluation du poids corporel des agneaux</b> : .....	44
<b>4.1. Evaluation de la perméabilité digestive</b> .....	44
<b>CHAPITRE III – DISCUSSION GENERALE</b> .....	50

<b>1. Exposition des mères.....</b>	<b>50</b>
<b>2. Exposition materno-fœtale au BPA à la naissance : .....</b>	<b>50</b>
<b>3. Perméabilité digestive des agneaux: .....</b>	<b>51</b>
<b>Conclusion .....</b>	<b>53</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>55</b>

# Liste des illustrations :

## Listes des figures

Figure 1 : Voies métaboliques majeures du BPA chez les mammifères (d'après l'expertise collective de l'Inserm, « Reproduction et environnement », 2011) .....	18
Figure 2 : Structure chimique du BPA et de l'œstradiol.....	20
Figure 3 : Structure de l'intestin grêle (d'après Science Directe). .....	23
Figure 4 : Les voies de transport trans-épithéliales.....	24
Figure 5 : Schéma représentant les deux voies de passage des immunoglobulines chez le nouveau-né et la fermeture de la barrière intestinale. (D'après Neu J.).....	28
Figure 6 : Mécanisme d'action de l'œstradiol sur la perméabilité paracellulaire. (D'après Houdeau E.).....	30
Figure 7 : Schéma comparatif de la quantité d'immunoglobuline supposée acquise en présence ou en absence de BPA. ERs : récepteurs aux œstrogènes, TJ : Tight junctions. ....	32
Figure 8 : Traitement de synchronisation classique réalisé chez les ovins .....	34
Figure 9 : schéma récapitulatif du protocole d'expérimentation réalisé.....	36
Figure 10 : Données observés (points) et prédites (lignes) pour l'évolution au cours du temps des concentrations sériques de BPA chez une brebis gravide représentative pendant trois périodes de 7 jours consécutifs suivant la 1 <sup>ère</sup> , la 30 <sup>ème</sup> et la 59 <sup>ème</sup> administration de BPA.....	41
Figure 11 : Evolution au cours du temps de la concentration sérique moyenne ( $\pm$ Ecart-type) de BPA (motifs pleins) et de BPA-Gluc (motifs vides) chez des brebis gravides (n=6) traitées avec des injections quotidiennes de BPA [5mg/ (kg*j) sc] du 28 <sup>ème</sup> jour jusqu'à la fin de la gestation. Le BPA et le BPA-Gluc ont été mesurés simultanément dans des échantillons sériés de sang collectés juste après les première (ligne pleine) et la 58 <sup>ème</sup> (ligne en pointillé) administrations. ....	42
Figure 12 : Exposition fœtale au BPA : concentrations individuelles en BPA dans le sang de cordon d'agneaux et dans le sang jugulaire de leurs mères respectives.....	43
Figure 13 : Evolution dans le temps des poids corporels moyens ( $\pm$ sem) des agneaux mâles et femelles nés de mères traitées avec une solution témoin ou avec du BPA (5 mg/kg/j sc de JG 29 à la fin de la gestation). ....	44
Figure 14 : concentrations sériques moyennes (moy $\pm$ ET) en dextran-FITC en fonction du temps et aires sous la courbe (AUC totales) des concentrations plasmatiques en dextran-FITC chez des agneaux mâles issus de brebis traitées quotidiennement par injection sous-cutanée de 5mg/kg/j au BPA (BPA, n = 8) ou par une solution solvant (VEH, n= 8).....	45
Figure 15: concentration sériques en dextran-FITC (moy $\pm$ ET) en fonction du temps et aires sous la courbe des concentrations plasmatiques en dextran-FITC (AUC totales) chez des agneaux femelles issues de brebis traitées quotidiennement par injection sous-cutanée de 5mg/kg/j au BPA (BPA, n = 4) ou par une solution solvant (VEH, n= 6).....	45
Figure 16 : concentrations plasmatiques moyennes (moy $\pm$ ET) en antipyrine en fonction du temps et aires sous la courbe des concentrations plasmatiques en antipyrine (AUC totales) chez des agneaux mâles issus de brebis traitées quotidiennement par injection sous-cutanée de 5mg/kg/j au BPA (BPA, n = 8) ou par une solution solvant (VEH, n= 8).....	47
Figure 17 : concentration plasmatique moyenne (moy $\pm$ ET) en dextran-FITC en fonction du temps et aires sous la courbe des concentrations plasmatiques en antipyrine (AUC totales) chez des agneaux femelles issues de brebis traitées quotidiennement par injection sous-cutanée de 5mg/kg/j au BPA (BPA, n = 4) ou par une solution solvant (VEH, n= 6).....	47
Figure 18 : analyse statistique et effets observés concernant l'antipyrine en fonction du sexe et du groupe sur le Tmax.....	48

Figure 19 : concentrations plasmatiques moyennes (moy $\pm$ ET) en immunoglobulines G en fonction du temps et aires sous la courbe des concentrations plasmatiques en immunoglobulines G (AUC totales) chez des agneaux mâles issus de brebis traitées quotidiennement par injection sous-cutanée de 5mg/kg/j au BPA (BPA, n = 8) ou par une solution solvant (VEH, n= 8) .....	49
Figure 20 : concentrations plasmatiques moyennes (moy $\pm$ ET) en immunoglobulines G en fonction du temps et aires sous la courbe des concentrations plasmatiques en immunoglobulines G (AUC totales) chez des agneaux femelles issues de brebis traitées quotidiennement par injection sous-cutanée de 5mg/kg/j au BPA (BPA, n = 8) ou par une solution solvant (VEH, n= 8) .....	49

### Liste des tableaux :

Tableau 1 : Métabolisation du BPA et élimination du BPA et du BPA-G après une administration par voie orale de bisphénol A. ( <i>d'après Farbos, 2012</i> ) .....	19
Tableau 2 : Exposition maternelle et exposition fœtale interne au BPA (moyenne sérum/concentration dans tissus $\pm$ SEM) et son principal métabolite, le BPA-Gluc à la naissance.....	43

## Listes des acronymes et abréviations :

ANOVA : Analysis of variance - Analyse de variance  
AUC : Area Under the Curve – Aire sous la courbe  
BPA : Bisphénol A  
BPA-Gluc : Bisphénol A - glucuronide  
Dextran– FITC : Dextran-fluorescein isothiocyanate  
DJT : Dose Journalière Tolérable  
E2 : 17 $\beta$ -œstradiol  
EFSA : European Food Safety Authority - Agence européenne de sécurité des aliments  
ERs : récepteurs aux œstrogènes  
FcRn : récepteur FC néonatal (FcRn)  
FGA : Acétate de fluorogestone  
HCl : acide chlorhydrique  
HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance  
HRP : peroxydase de raifort (horseradish peroxydase)  
IA : insémination artificielle  
Ig : immunoglobulines  
IgG : immunoglobulines G  
Inserm : Institut national de la santé et de la recherche médicale  
JAM : Junctional Adhesion Molecule  
OCDE : Organisation de coopération et de développement économiques  
LOQ : Limit of quantification – Limite de quantification  
ND : nom déposé  
NOAEL : No Observed Adverse Effect Level (plus forte dose testée pour laquelle on n'observe aucuns effet délétère sur l'organisme)  
OMS : Organisation Mondiale de la Santé  
OVX : Ovariectomisée  
REACH: Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals - Enregistrement, évaluation, autorisation et restriction des produits chimiques,  
SC : sous cutané  
SEM: Standard Error of the Mean - Erreur type  
SD : Standard deviation - Ecart-type  
T4 : Thyroxine  
TJ : Tight junctions- Jonctions serrées  
UPLC-MS/MS : Ultra performance liquid chromatography/Mass spectrometry – Chromatographie en phase liquid ultra performante couplée à une détection par spectrométrie de masse  
UV : Ultra violet  
 $\beta$ PAG : Pregnant Associated Glycoprotein - Protéines Associées à la Gestation

## **Introduction générale :**

Depuis l'augmentation de l'utilisation des substances chimiques, les perturbateurs endocriniens sont au centre de nombreux débats scientifiques. Selon le programme international sur la sécurité chimique un perturbateur endocrinien est « une substance ou un mélange de substances 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 » [1].

Le bisphénol A (BPA) est considéré comme un perturbateur endocrinien et il est particulièrement concerné par les nombreux débats scientifiques. Dans notre étude, l'objectif est de déterminer l'impact d'une exposition *in utero* sur la perméabilité digestive et l'acquisition de l'immunité passive chez l'agneau.

Ce travail a été réalisé au sein de l'UMR 1331 TOXALIM INRA/ENVT sous la direction de Catherine Viguié.

Le premier chapitre de ce manuscrit fait la synthèse bibliographique des données toxicocinétiques du BPA, de ses effets sur les fonctions physiologiques et des propriétés digestives de l'agneau nouveau-né. Il met également en avant les caractéristiques de la placentation chez la brebis qui fait d'elle un modèle pertinent dans l'étude de la perméabilité digestive de l'agneau nouveau-né.

Le deuxième chapitre présente les études expérimentales mis en place pour répondre à notre principal objectif : les effets d'une exposition prénatale au BPA sur la transmission de l'immunité colostrale chez l'agneau.

Enfin l'ensemble des résultats sera discuté et mis en perspective avec les études menées dans d'autres espèces.

## **Introduction**

Le BPA est un monomère de nombreux plastiques et de résines. Ces composés sont très utilisés par les industries dans la fabrication des emballages agro alimentaires comme les canettes, ou encore les boites de conserves. La quantité totale de BPA fabriqué dans l'UE est estimée à 700000 tonnes/an. L'Agence de Protection Environnementale des USA et l'Agence De Sécurité Alimentaire Européenne ont admis une NOAEL à 5mg/kg/jour conduisant après la prise en compte des facteurs de sécurité/extrapolation à une Dose Journalière Admissible (DJA) de 5µg/kg/jour

Le BPA est omni-présent dans notre environnement et les données scientifiques et épidémiologiques tendent à le classer parmi les substances dites « perturbateurs endocriniens ». L'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) définit un perturbateur endocrinien par : « une substance ou un mélange exogène altérant les fonctions du système endocrinien et induisant de ce fait des effets nocifs sur la santé d'un organisme intact, de ses descendants ou au niveau des (sous)-populations ».

Le BPA est ainsi considéré comme un perturbateur endocrinien car il a la propriété de se fixer aux récepteurs aux œstrogènes et d'altérer leurs fonctions. A l'heure actuelle les conséquences sur la santé sont mal appréhendées surtout celles concernant les systèmes autres que le système reproducteur.

De nombreux effets de perturbation endocrinienne sont reconnus comme avérés chez l'animal. Toutefois d'autres effets ont également été décrits sans pour autant que les données disponibles permettent de les classer avérés sur la base de la reproductibilité des études. Parmi ce type d'effets, on trouve des effets sur la barrière digestive en termes de nociceptivité et/ou de perméabilité. Cette barrière, sensible aux œstrogènes en raison de la présence de récepteurs aux œstrogènes au niveau de la muqueuse digestive, pourrait être altérée par le BPA. Cette barrière suit un processus de maturation complexe en période périnatale qui va largement contribuer à définir le statut immunitaire des nouveaux nés. Ces processus peuvent être très variables en fonction des espèces et les données chez le rat [2] suggèrent qu'une exposition in utero au BPA pourrait altérer le fonctionnement de la barrière digestive du nouveau-né conduisant à des perturbations non seulement chez le nouveau-né mais également à plus long terme.

Ce projet de recherche développé au cœur de cette thèse avait pour but de contribuer à une meilleure compréhension des effets du BPA sur les processus de maturation périnatale de la barrière digestive dans un contexte d'exposition *in utero* en s'appuyant sur un modèle original : l'hyperperméabilité digestive du nouveau-né ruminant aux macromolécules dont les immunoglobulines (Ig) colostrales.

# **CHAPITRE I -ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

## **1. Quelques généralités**

La première synthèse du bisphénol A fut réalisée en 1891. Il fut ensuite largement étudié dans le cadre du développement des œstrogènes de synthèse. Il n'est finalement pas utilisé en tant qu'œstrogène de synthèse mais plutôt dans l'industrie pour servir à la synthèse de plastiques polycarbonates et de résines. Son importance dans les emballages agro-alimentaire en fait un produit largement utilisé dans les foyers et de fait un contaminant ubiquitaire des populations humaines. Son utilisation dans des emballages alimentaires suggère une exposition essentiellement digestive. L'épithélium digestif est donc la première cible avant tout processus de métabolisation par le foie.

L'utilisation du BPA dans la fabrication de matériaux en contact avec des aliments est autorisée avec une limite de migration spécifique de 0,6mg/kg dans les aliments.

La Dose Journalière Admissible (DJA) actuelle établie par l'EFSA est de 5µg/kg/j Cette DJA a été établie à partir de la NOAEL, qui est de 5mg/kg/j. Depuis mars 2011, l'utilisation du BPA dans la fabrication de biberon est interdite. En France une loi a été votée visant à interdire l'utilisation du BPA dans les conditionnements alimentaires.

### 1.1. Toxicocinétique du bisphénol A

#### 1.1.1. Adulte

##### *Absorption :*

L'absorption prépondérante serait l'absorption digestive après ingestion de bisphénol A. Les études réalisées chez l'animal montrent que le BPA est presque totalement absorbé par voie digestive [1].

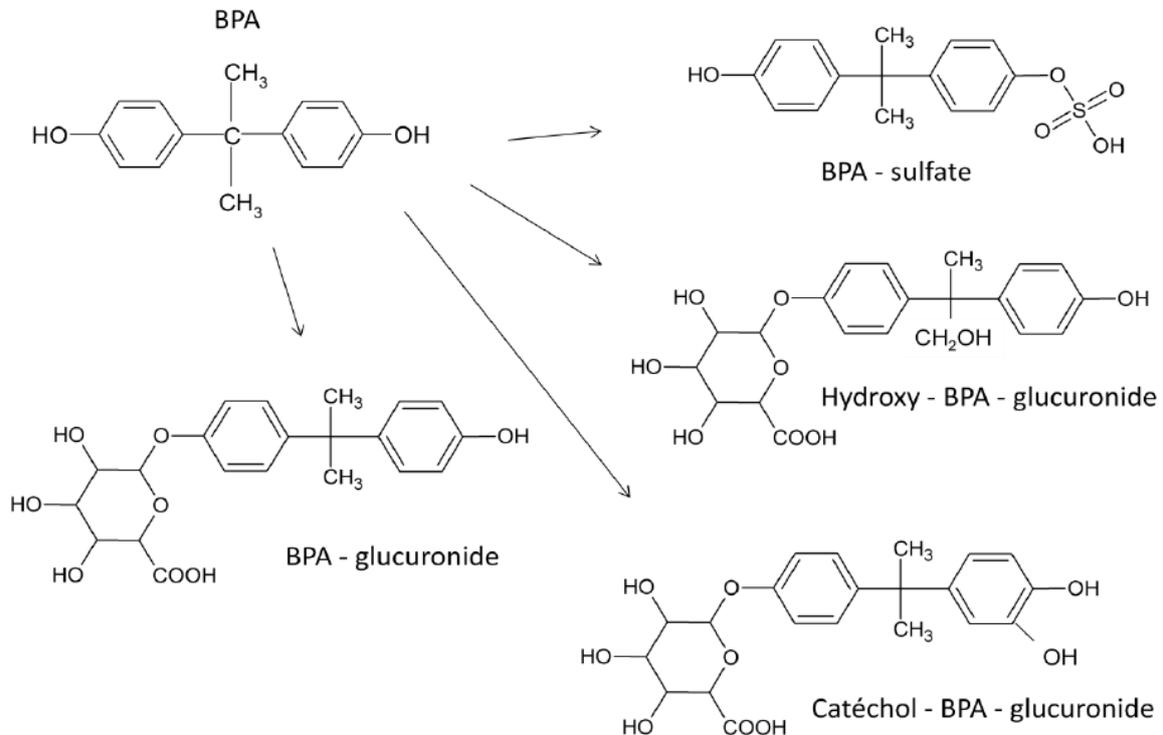
##### *Distribution :*

Suite à son absorption digestive le BPA est soumis à un très fort effet de premier passage hépatique chez toutes les espèces animales qui explique la faible biodisponibilité du BPA.

##### *Métabolisme :*

La voie de métabolisation majoritaire, quelle que soit l'espèce, est la conjugaison du BPA à l'acide glucuronique conduisant à l'obtention de BPA-glucuronide (BPA-Gluc) (figure 1).

Cette conjugaison se déroule majoritairement dans le foie et, de façon moins importante, dans l'intestin. Dans la plupart des espèces dont l'homme, le BPA-Gluc est éliminé majoritairement par voie urinaire [3].



**Figure 1 : Voies métaboliques majeures du BPA chez les mammifères (d'après l'expertise collective de l'Inserm, « Reproduction et environnement », 2011)**

Les deux voies principales de métabolisation du BPA sont des voies de conjugaison hépatique. Il s'agit de voies de détoxification car elles conduisent à des métabolites inactifs : le BPA-glucuronide (BPA-Gluc) et le BPA-sulfate. En effet, seul le BPA non conjugué a des effets oestrogénomimétiques.

#### *Elimination :*

Lors d'une administration de BPA par voie orale, le BPA-Gluc est excrété principalement dans la bile chez les rongeurs[4]. Dans ces espèces, le BPA-Gluc peut être hydrolysé et réabsorbé sous forme de BPA « libre » au niveau de l'intestin du fait de l'existence d'un cycle entérohépatique. Chez l'homme, la brebis et le porc l'élimination du BPA-Gluc se fait majoritairement par voie urinaire (60%).

<b>Paramètres</b> (unités)	<b>Brebis</b> Moyenne ± SD	<b>Porc</b> Moyenne ± SD	<b>Chien</b> Moyenne ± SD	<b>Rat</b> Moyenne	<b>Souris</b> Moyenne
<b>Métabolisation</b>					
F <sub>BPA-BPA-G</sub> (%)	98.8 ± 1.0	98.9 ± 0.7	98.1 ± 0.4	NE	NE
F <sub>BPA-autres</sub> (%)	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	NE	NE
<b>Élimination</b>					
F <sub>BPA-G urine</sub> (%)	89.7 ± 17.8	98.9 ± 0.7	12.2 ± 2.1	11.65	48.4
F <sub>BPA-G autres</sub> (%)	9.1 ± 18.1	0.0 ± 0.0	86.0 ± 2.2	NE	NE

**Tableau 1 : Métabolisation du BPA et élimination du BPA et du BPA-G après une administration par voie orale de bisphénol A. (d'après Farbos, 2012)**

F<sub>BPA-BPA-G</sub> : fraction de la dose métabolisée en BPA-G ; F<sub>BPA-autre</sub> : fraction de la dose métabolisée en un autre métabolite que le BPA-G, F<sub>BPA-G urine</sub> : fraction de la dose éliminée sous forme de BPA-G dans les urines, F<sub>BPA-G autre</sub> : fraction de la dose éliminée sous forme de BPA-G par une autre voie que la voie urinaire, NE : non estimable

#### 1.1.2. Fœtus et nouveau-né :

Chez le rat, lors de la perfusion de l'utérus avec du BPA-Gluc, du BPA-Gluc est retrouvé dans le compartiment fœtal. On retrouve également du BPA sous forme non conjugué ce qui suggère que l'unité foeto-placentaire a la capacité de déconjuguer le BPA-Gluc[5]. Dans le liquide amniotique, on ne retrouve que du BPA, aucune trace de BPA-Gluc n'est détectable.

Une étude menée au laboratoire en 2013 chez des brebis a permis de montrer que la clairance maternelle par voie non placentaire représente environ 98% de la clairance maternelle totale contre 8,6% en ce qui concerne la clairance fœtale non placentaire. La clairance placentaire fœtale de BPA, une fois rapportée au poids vif, est quatre fois plus importante que la clairance placentaire maternelle de BPA. Après une exposition maternelle par perfusion intra-veineuse de BPA (2mg/ (kg.j)), l'exposition du fœtus au BPA est équivalente à l'exposition maternelle en termes de doses. En effet il a été établi que 4,5% du BPA passe de la mère au fœtus mais lorsque l'on normalise au poids vif du fœtus celui-ci est exposé à une dose d'environ 2mg/ (kg.j).

En ce qui concerne les conjugués du BPA, après l'exposition de la mère au BPA, les concentrations en BPA-Gluc et BPA-Sulfate sont très élevées chez le fœtus et le ratio moyen des concentrations plasmatiques de BPA conjugué entre le fœtus et la mère de  $3,5 \pm 10,5$  pour le BPA-Gluc et de  $8 \pm 14$  pour le BPA-Sulfate [6].

## 1.2. BPA : un perturbateur endocrinien reprotoxique

### 1.2.1. Données sur la capacité de liaison du BPA aux ER :

Considéré comme un œstrogène faible puisqu'ayant une affinité, *in vitro*, 1 000 à 10 000 fois inférieure à celle de l'œstradiol pour les récepteurs aux œstrogènes ER $\alpha$  et ER $\beta$ , le bisphénol A et ses effets n'ont pas été étudiés pendant longtemps par les scientifiques. Ces dernières années, de nombreuses études ont attesté de la capacité de cette molécule à avoir des effets extrêmement proches de ceux de l'œstradiol (E<sub>2</sub>)[7].

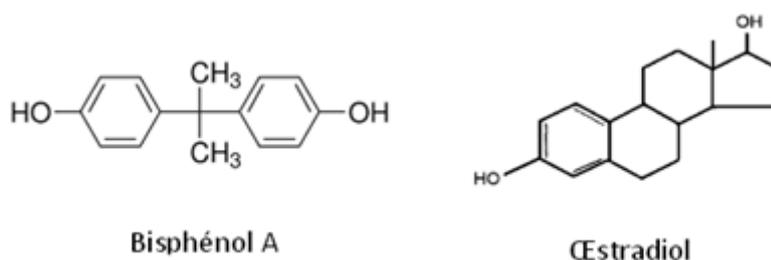


Figure 2 : Structure chimique du BPA et de l'œstradiol

### 1.2.2. Effets oestrogénomimétiques : *in vitro* et *in vivo*

Les deux tests *in vitro* les plus utilisés et les plus sensibles pour mesurer l'activité oestrogénomimétique sont le test de prolifération de cellules de cancer du sein MCF-7 (excellent pour détecter l'activité oestrogénomimétique de composés connus ou la présence d'activité oestrogénomimétique d'un mélange de composés chimiques) et le test avec des levures recombinantes transformées. Ces levures sont composées notamment d'un promoteur sensible aux œstrogènes. Celui-ci permet de dépister les activités oestrogéniques [8].

On utilise, *in vivo*, le test utéroprolifératif validé par l'OCDE[9] pour l'évaluation réglementaire des composés oestrogénomimétiques. Ce test permet d'identifier les substances qui ont la capacité d'interagir avec les systèmes endocriniens. Les deux principaux modèles sont des ratte ovariectomisées ou des ratte prépubères. L'ovariectomie chez la rate induit des modifications de paramètres morphologiques utérins et une augmentation de l'expression des récepteurs à l'œstradiol dans l'utérus. L'administration chez des ratte ovariectomisées de BPA par voie sous-cutanée, à des doses de 0,5 à 50 mg/kg pc/j pendant 5 jours, ne permet pas de rétablir ces paramètres utérins à un niveau similaire à celui des ratte non ovariectomisées.

Le BPA ne permet pas non plus de supprimer l'augmentation de l'expression des récepteurs ER $\alpha$  et  $\beta$  induite par l'ovariectomie contrairement à l'œstradiol[10].

Une étude a été menée en 2010 chez des brebis prépubères ovariectomisées. Ces brebis ont été traitées par perfusion intraveineuse de BPA pendant 4 jours avec des concentrations allant de 0,5 à 80 mg/kg pc/j. Les résultats ont montré que le BPA a les mêmes effets sur le système générateur de pulses de LH que l'E<sub>2</sub> à savoir une inhibition [11].

### 1.3. Effet du BPA sur les grandes fonctions de l'organisme

#### 1.3.1. Reprotoxicité

*Effet sur le système reproducteur mâle :*

Lors d'une exposition *in utero* à des faibles doses de BPA, la souris adulte présente une augmentation du poids de la prostate [12]. Des doses de 2 $\mu$ g/kg/j par voie orale à des souris CF-1 en gestation provoquent chez les nouveau-nés mâles une diminution du poids de l'épididyme et des glandes séminales, une hausse du poids des glandes préputiales et de la prostate. Pour une dose de 20 $\mu$ g/kg/j on observe une diminution de la production journalière de sperme [13]. De même chez des rats Sprague-Dawley dont les mères ont été exposées à des doses de 20 à 200 $\mu$ g/kg/j par voie orale, on observe une diminution de la production de sperme, la diminution maximale étant observée chez le groupe exposé aux doses les plus faibles [14, 15].

Chez l'homme, les effets sur le système reproducteur mâle sont controversés car les études épidémiologiques ne convergent pas totalement.

*Effet sur le système reproducteur femelle :*

Une étude conduite sur des couples humains qui recouraient à une méthode de fécondation *in vitro* a montré qu'il existe une corrélation négative entre les concentrations urinaires en BPA et conjugués et certains paramètres de succès de fécondation *in vitro* (nombre d'ovocytes après stimulation ovarienne et qualité des ovocytes collectés chez la femme) [16].

Certains effets sont considérés comme avérés par un panel d'expert scientifique de l'ANSES: avancement de l'âge de la puberté et altération du développement de la glande mammaire chez la souris [17, 18], perturbation du cycle œstral et diminution des niveaux de LH sur des rates ovariectomisées [19].

### 1.3.2. Effet sur le métabolisme lipidique et glucidique

Chez l'homme, l'incidence du diabète a été corrélée à des teneurs urinaires en BPA-G élevées [20]. En revanche, chez l'animal les effets sur le métabolisme du glucose seraient controversés alors que les effets sur la lipogenèse (activation) sont considérés comme avérés [21].

### 1.3.3. Thyroïde

En parallèle des études conduites sur le système reproducteur, de plus en plus d'études se concentrent sur les effets du BPA sur la thyroïde. En 2011, une étude épidémiologique menée aux Etats-Unis sur des hommes infertiles suggérait l'existence d'une corrélation négative entre la teneur urinaire en BPA/métabolites et les paramètres de la fonction thyroïdienne.

Une des études *in vivo*, menée chez des rats, consistait à déterminer chez les nouveaux nés les effets de l'administration par voie orale d'une dose de 1mg/kg/j (inférieure à la NOAEL qui est de 5mg/kg/j) à des mères tout au long de la gestation et jusqu'au sevrage sur la concentration en T4 totale circulante. Cette étude a mené à conclure à que chez les petits issus de mères traitées au BPA la concentration en T4 totale est plus importante mais sans diminution de TSH [22]. L'idée selon laquelle le BPA aurait un effet antagoniste sur le rétrocontrôle négatif est donc fortement suspectée. Dans une autre expérience, le traitement de rates gravides par voie orale à 10µg/kg/j était associé à une diminution transitoire de la concentration en T4 libre en post-partum immédiat (0 à 7 jours post partum chez les mères). Chez les petits, une augmentation en T4 libre à J7 post natal suivie d'une diminution à J21 post natal [23] ont été notées.

Le modèle ovin, en raison de sa similarité avec humain en termes d'ontogenèse et de régulation de l'axe thyroïdien, a été utilisé dans une étude d'exposition *in utero* par voie sous-cutanée de 5mg/kg/j du 28<sup>ème</sup> jour à la fin de la gestation. Dans cette étude, l'exposition au BPA était associée à une diminution de la concentration en T4 totale chez les mères traitées et chez leurs nouveau-nés [24].

## 2. Œstradiol, bisphénol A et barrière digestive :

### 2.1. Physiologie digestive chez le nouveau-né

#### 2.1.1. Comparaison de la physiologie digestive chez l'homme et chez les ruminants

#### Appareil digestif de l'adulte : mécanismes d'absorption intestinale et système digestif stomacal

L'estomac est le premier appareil du tube digestif à commencer la digestion des aliments. Il s'agit d'une digestion mécanique et chimique. L'Homme est un monogastrique au même titre que l'agneau nouveau-né alors que les ruminants adultes sont des polygastriques.

L'intestin grêle permet la digestion par l'action des enzymes pancréatiques sur le contenu déjà en partie digéré par les sucs gastriques. Il assure l'absorption des nutriments. Ceci est possible grâce à la muqueuse intestinale qui assure un transit du milieu extérieur (lumière intestinale) vers le milieu intérieur (circulation générale) mais également le contraire. Sa fonction d'échangeur repose sur certaines particularités : une longueur très importante (jusqu'à 60 mètres chez un bovin adulte), les villosités et les microvillosités de la membrane plasmique du pôle apical des entérocytes [25]. L'absorption intestinale se fait par diffusion simple et par transports actifs [26].

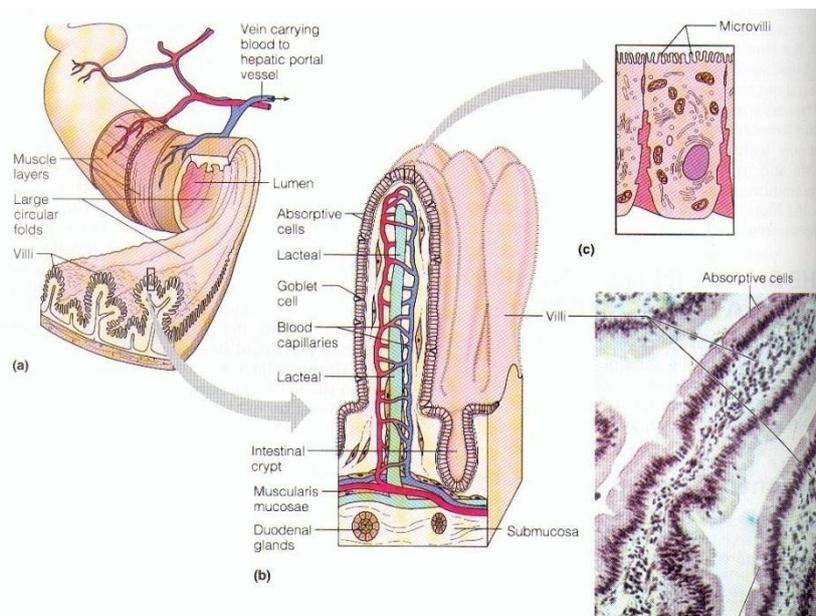


Figure 3 : Structure de l'intestin grêle (d'après Science Direct).

## Rôle de la barrière intestinale épithéliale : généralités

Comme le montre la figure 4 ci-dessous la barrière épithéliale a un rôle important car elle permet le passage de molécules de la lumière intestinale à la circulation générale. Elle doit assurer la protection de l'organisme contre des agents pathogènes présents dans le milieu extérieur et assurer le passage, actif ou passif, des molécules présentes dans la lumière du tube digestif.

Le passage des molécules peut se faire selon deux voies. La voie transcellulaire permet le passage des molécules liposolubles et des petites molécules hydrosolubles. Elle permet le passage de molécules soit par diffusion passive grâce aux aquaporines, par transport actif grâce à des transporteurs ou par endocytose, transcytose ou exocytose (concerne les peptides de grandes tailles et les protéines).

La voie paracellulaire permet le passage des molécules de moyenne et de grande taille. Cette voie de passage est régulée par la présence de jonctions. Ces jonctions se trouvent à l'interface entre deux entérocytes. Elles assurent un maintien de l'homéostasie entre les différents compartiments, elles protègent le milieu interne des agents potentiellement dangereux présents dans la lumière intestinale et permettent une communication entre les cellules. Ces jonctions sont au nombre de quatre : jonctions serrées (tight junctions), les jonctions intermédiaires, les desmosomes et les jonctions communicantes (gap junctions). Les jonctions qui nous intéressent dans cet exposé sont les jonctions serrées. Elles sont composées de protéines transmembranaires telles que les occludines, les claudines et les JAM (Junctional Adhesion Molecule).

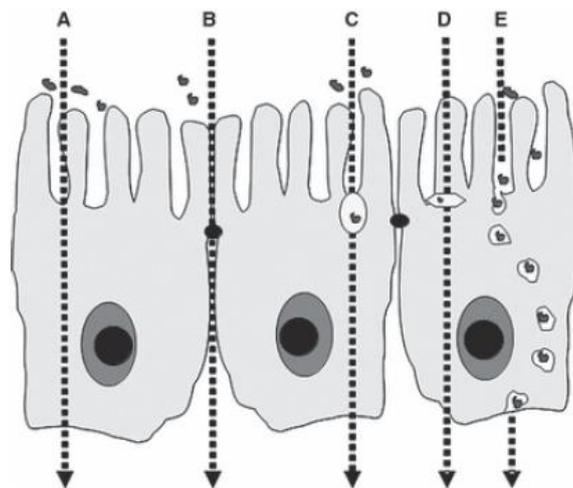


Figure 4 : Les voies de transport trans-épithéliales.

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

### Particularités chez les ruminants :

Chez le nouveau né ruminant, l'appareil digestif a un fonctionnement de type monogastrique. La caillette est le seul estomac fonctionnel et le plus développé. La gouttière œsophagienne permet le passage des liquides directement dans la caillette. Une fois le lait arrivé dans la caillette, il est très rapidement transformé en caillot sous l'effet de la chymosine (ou présure) qui est produite par la paroi gastrique et de l'acidité des sécrétions gastriques. Le lactosérum, qui contient les fractions protéiques non coagulables (lactalbumine et immunoglobuline), le lactose, les minéraux et l'eau, sont exsudés à partir du caillot. Le lactosérum étant évacué très rapidement dans le duodénum, ceci permet une meilleure absorption de l'eau, des ions et des produits de la digestion.

### *Maturation histologique*

Chez le veau nouveau-né, la maturation de l'intestin grêle dépend de la durée de la gestation et de l'ingestion du colostrum. Si les fonctions digestives se développent durant la vie fœtale, les changements les plus importants se déroulent durant les 48 premières heures extra-utérines.

La couche muqueuse se développe de la partie proximale du tube digestif à la partie distale. Les cryptes et les villosités sont ainsi modifiées tout d'abord au niveau du duodénum puis apparaissent au fur et à mesure dans les parties les plus distales [27]. Jusqu'à 5-7 jours post-partum, le veau présente encore des entérocytes avec de larges vacuoles vides. Puis il y a une maturation des entérocytes et, les vacuoles vides disparaissent pour permettre une meilleure fermeture de la barrière intestinale [28].

### *Maturation enzymatique*

Durant les deux premiers tiers de gestation des bovins, il y a une très forte activité des enzymes dans l'intestin grêle du fœtus. Pendant la phase de différenciation du tube digestif, dernier tiers de gestation, les concentrations des enzymes chutent brutalement [29].

A partir du second trimestre de la vie fœtale, les ruminants ont déjà une activité de coagulation au sein de la caillette. Cette coagulation est permise par l'action quasi exclusive de la chymosine (présure) et de la pepsine qui est encore très basse [30-32]. La quantité de chymosine est maximale dans les premières quarante huit heures de vie, puis chute tandis que la quantité de pepsine augmente considérablement [30, 33].

Les sécrétions d'acide chlorhydrique (HCl) sont très faibles à la naissance et elles le restent pendant quelques jours [34]. Ceci s'explique par le nombre très faible de cellules pariétales (qui sécrètent HCl) qui augmente rapidement dans les premières 72h [30][35].

La digestion chez le nouveau-né est assurée par des enzymes lysosomales présentes dans les entérocytes. Ces enzymes hydrolysent les macromolécules. Ce phénomène est présent chez les mammifères dans la période périnatale et concerne la digestion du colostrum, du lait et l'absorption des vitamines et des minéraux[36][37].

Plusieurs paramètres assurent le passage des immunoglobulines de la lumière du tube digestif à la circulation sanguine [38]. Durant les premiers jours de vie, les vacuoles intestinales n'ont pas d'activité lysosomale permettant ainsi le transfert des immunoglobulines présentes dans le colostrum jusqu'à la circulation générale sans dégradation enzymatique préalable[39]. Au cours des 2 premiers jours de vie, l'activité des enzymes gastriques, telles que la chymosine, va augmenter, tandis que l'activité des enzymes pancréatiques diminue. Les enzymes protéolytiques ne sont alors actives qu'à la fin de l'intestin grêle. De manière à assurer une activité faible des enzymes digestives, le pH est très bas dans la portion proximale du duodénum.

Au-delà de 36 heures après la mise-bas, le nombre de cellules pariétales augmente et conjointement l'activité de la pepsine. Ce moment correspond à l'arrêt de l'absorption des immunoglobulines.

### **Passage des immunoglobulines et particularités des ruminants :**

#### *Placentation :*

Chez les ovins, la partie fœtale du placenta est formée à partir de la fusion du chorion non vascularisé et de l'allantoïde vascularisée. Des villosités confinées dans les cotylédons se développent et augmentent ainsi la surface d'échange. Le placenta des ovins est dit : chorioallantoïque, villositaire et cotylédonnaire. Selon la classification de Grosser, il est aussi dit syndesmochorial.

#### *Transfert passif de l'immunité colostrale :*

Chez les ruminants, du fait de la structure placentaire, les nombreux échanges entre la mère et le fœtus ne concernent malheureusement pas le passage des immunoglobulines. Il faudra donc que l'agneau se nourrisse rapidement du colostrum de sa mère. Ce colostrum est riche en

anticorps notamment en immunoglobulines G (IgG) et spécifique de l'exposition de la mère à des agents infectieux pendant son existence, soit naturellement, soit par vaccination [40].

Le colostrum est la base de l'acquisition de l'immunité passive par les jeunes ruminants. Un accès tardif au colostrum ou un accès à un colostrum de mauvaise qualité ou en quantité insuffisante peut conduire à un mauvais transfert de l'immunité passive. Ceci aura pour conséquences un taux de mortalité élevé.

#### *Cinétique et mécanisme d'absorption des IgG :*

Grâce aux caractéristiques de la maturation de l'intestin grêle, les IgG ne sont pas détruites par les sécrétions intestinales et pourront ainsi être absorbées intactes. Cette absorption de macromolécules par la membrane intestinale est possible dans les premières 24h de vie de l'agneau. Chez le veau nouveau-né, les IgG colostrales sont absorbées au niveau de l'intestin grêle par les cellules épithéliales. L'absorption se fait en majorité dans le jéjunum au niveau de la bordure en brosse de l'épithélium intestinale grâce à un phénomène de pinocytose (passage transcellulaire)[41][42]. L'absorption est également possible par des espaces intercellulaires suffisamment larges en raison de l'immaturité de l'épithélium du ruminant nouveau-né [43].

Ces IgG rejoignent la circulation générale en passant par le système lymphatique [44]. Dans les deux heures qui suivent l'ingestion du colostrum, la concentration d'immunoglobulines dans le sérum augmente et elle atteint son maximum au bout de 24 à 36h conférant ainsi une protection systémique.

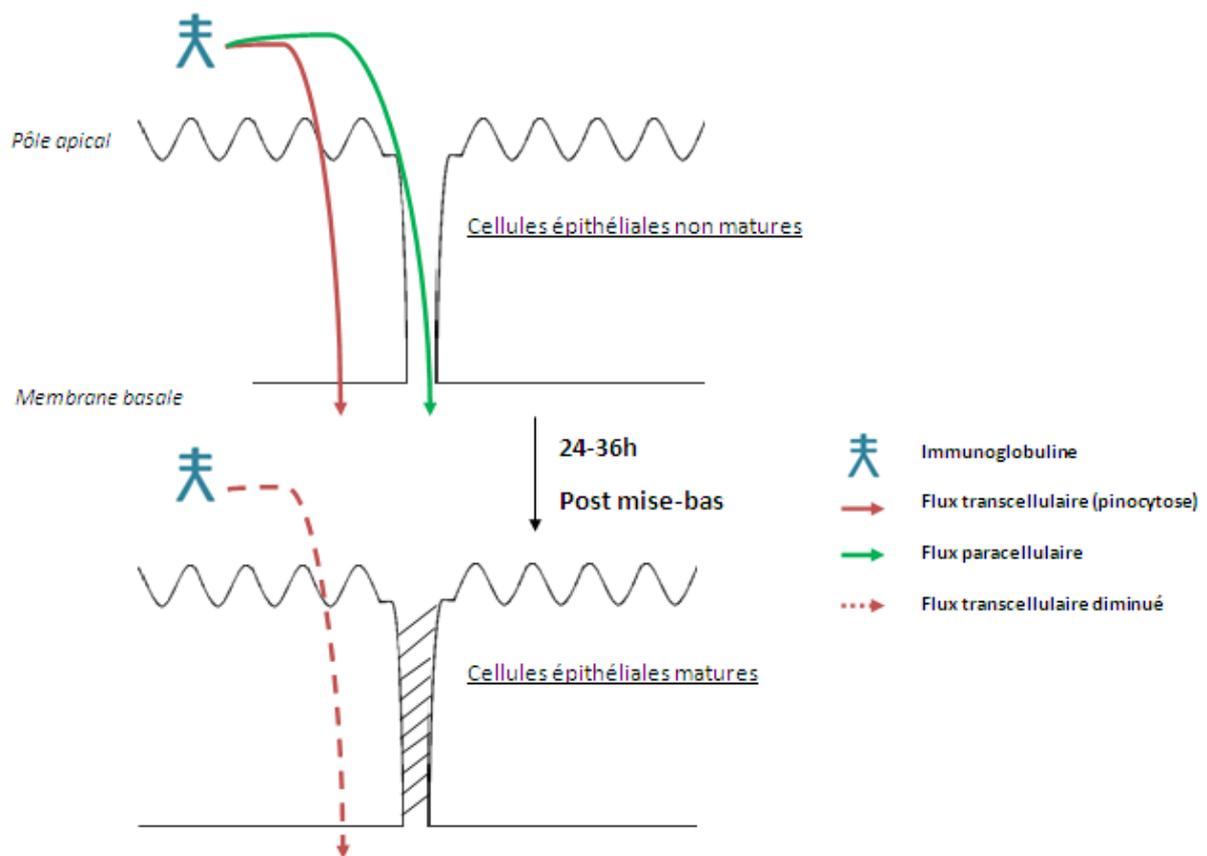
Chez le rongeur nouveau-né, la présence d'un domaine Fc sur les chaînes lourdes des immunoglobulines lui confère la capacité de fixation sur un récepteur Fc neonatal (FcRn), hétérodimère qui constitue une glycoprotéine transmembranaire [45]. Ce récepteur participe de façon active à l'absorption des IgG. Ce récepteur a été découvert au niveau de la bordure en brosse de la partie proximale de l'intestin grêle sur des rongeurs nouveau-nés [45, 46]. Chez l'homme il est présent également à l'âge adulte au niveau des cellules épithéliales de l'intestin grêle [47]. Enfin chez les agneaux, il serait exprimé au niveau des cellules épithéliales cryptiques du duodénum et principalement localisé au niveau du pôle apical de la cellule [48].

Dans l'espèce bovine, la barrière intestinale devient imperméable aux macromolécules environ 36h après la mise-bas. La fermeture de la barrière intestinale dépend principalement de la capacité de renouvellement des cellules épithéliales. Cependant même après cette

fermeture, la présence d'immunoglobulines colostrales dans le tube digestif reste intéressante car elle confère un effet prophylactique local.

On observe ensuite un renouvellement complet des cellules de l'épithélium intestinal. Les cellules immatures de l'intestin grêle sont remplacées par de nouvelles cellules interrompant ainsi le passage des IgG par voie paracellulaire. Quant au passage par la voie transcellulaire, il restera possible jusqu'au début de l'activité des enzymes digestives qui détruiront les immunoglobulines encore présentes dans la lumière intestinale. L'absorption des immunoglobulines est ainsi progressivement interrompue [48].

La protection générale conférée par ce stock d'Ig est limitée dans le temps et sera relayée après la première semaine de vie du nouveau-né par la synthèse endogène d'Ig [49][50].



**Figure 5 : Schéma représentant les deux voies de passage des immunoglobulines chez le nouveau-né et la fermeture de la barrière intestinale. (D'après Neu J.)**

Le ruminant est un modèle intéressant car il y a chez le nouveau-né un marqueur physiologique pertinent d'un point de vue biologique facilement accessible de la

fonctionnalité de la barrière digestive et notamment en terme de perméabilité : le taux d'immunoglobulines dans le plasma.

## 2.2. Régulation de la barrière digestive par les œstrogènes et le BPA

Le BPA a la capacité de se fixer sur les récepteurs aux œstrogènes dont certains (ER $\beta$ ) sont exprimés au niveau de l'épithélium digestif. Quelles sont les conséquences de cette fixation sur la barrière digestive? La fonction principale de la barrière digestive est l'absorption des nutriments et de l'eau, l'épithélium intestinal est également une barrière contre de nombreuses substances présentes dans la lumière du tube digestif.

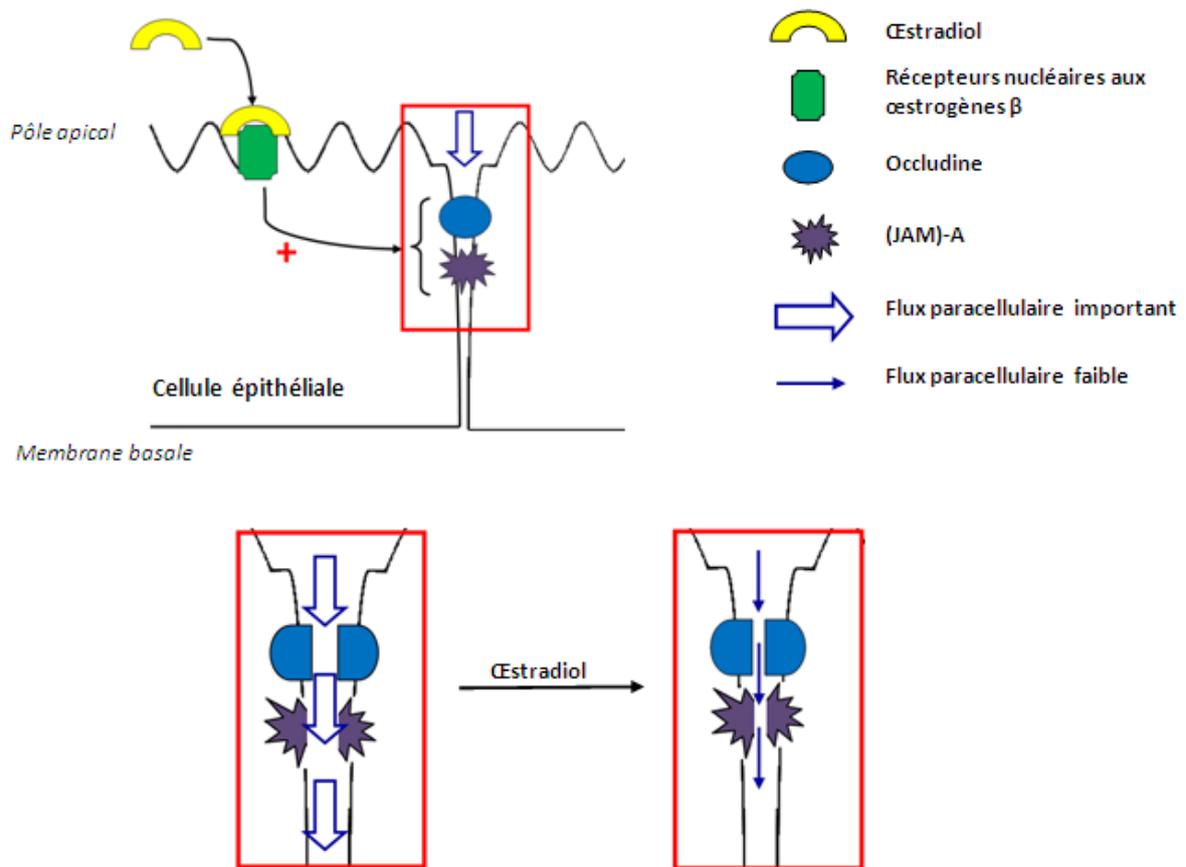
La maturation de la barrière intestinale se fait très tôt avant et après la naissance. Il a été démontré que les œstrogènes jouent un rôle essentiel dans l'organisation et le maintien de la barrière épithéliale digestive [51].

### 2.2.1. Régulation de la barrière intestinale colique par l'œstradiol et le BPA chez l'adulte :

L'œstradiol est capable d'induire une augmentation de l'expression des jonctions serrées [52] et donc une perméabilité colique plus faible. Ceci a été démontré en 2005 dans une étude sur des rats des deux sexes qui a montré que les femelles en pro-œstrus ont une perméabilité colique plus faible que les mâles en conditions normales [53].

Le mécanisme moléculaire implique des récepteurs aux œstrogènes  $\alpha$  et  $\beta$  et plus spécifiquement les récepteurs  $\beta$  dont l'expression reste majoritaire au niveau des cellules épithéliales du colon. L'activation de ces récepteurs serait associée à une augmentation de l'expression d'occludine et de JAM-A à la surface des cellules épithéliales résultant en une diminution de la perméabilité de l'épithélium du colon [54].

Plus récemment, sur le plan fonctionnel, une étude a montré que la fluctuation des niveaux d'œstrogènes au cours du cycle œstral serait associée à une modulation de la voie de passage paracellulaire [55].



**Figure 6 : Mécanisme d'action de l'œstradiol sur la perméabilité paracellulaire. (D'après Houdeau E.)**

Le BPA est décrit comme un perturbateur endocrinien capable de se lier et d'activer les récepteurs à l'œstradiol. C'est un oestrogénomimétique qui a la capacité de traverser la barrière placentaire chez le rongeur et chez la brebis [11].

Une exposition au BPA a des conséquences importantes sur la barrière intestinale. C'est ce qui a été démontré lors d'une administration quotidienne par voie orale de faibles doses à des rates ovariectomisées. Cette exposition provoque une diminution de la perméabilité paracellulaire du colon au même titre qu'une exposition à l'œstradiol. Cet effet de diminution de la perméabilité paracellulaire est bloqué par les antagonistes des ER et mimé par les agonistes des isoformes beta [2]. Ceci corrobore les propriétés oestrogénomimétiques du BPA.

Si la barrière intestinale est pour la première fois identifiée comme une cible du BPA, les conséquences biologiques à la fois pour la mère et le nouveau-né restent à déterminer.

### 2.2.2. Régulation de la barrière intestinale par les œstrogènes et le BPA en période périnatale

#### *Régulation de la barrière intestinale par l'œstrogène :*

Chez le rat adulte, l'œstradiol est capable de modifier la perméabilité digestive paracellulaire en augmentant l'expression de l'occludine et de la JAM-A. Heureusement, le foie fœtal de rat est capable de synthétiser l' $\alpha$ -foetoprotéine qui complexent les œstrogènes maternels circulant afin de protéger le fœtus d'une exposition trop précoce aux œstrogènes [56].

Chez l'homme, l' $\alpha$ -foetoprotéine a la même capacité à former des complexes avec les œstrogènes. Il y a ensuite dans les premiers 12-24 mois la présence d'œstrogènes circulants dont les taux d'œstrogènes diminuent avant d'augmenter progressivement jusqu'à la puberté [57].

Chez le mouton, la concentration plasmatique fœtale de l' $\alpha$ -foetoprotéine est très importante dans le premier tiers de gestation puis elle diminue au profit d'une augmentation de la concentration dans le liquide amniotique jusqu'à la moitié de la gestation. Enfin la concentration de l' $\alpha$ -foetoprotéine en fin de gestation est surtout assurée par une production par la mère [58].

Une fois complexés, les œstrogènes ne sont plus capables de diminuer la perméabilité digestive. La perméabilité paracellulaire serait alors conservée.

#### *Régulation de la barrière intestinale par le BPA :*

Contrairement à l'œstradiol, le BPA libre n'est pas complexé par l'alpha-foetoprotéine humaine. Il reste donc disponible pour perturber le système endocrinien fœtal [59] et ainsi perturber la perméabilité digestive.

Chez les jeunes rats, une exposition *in utero* et pendant l'allaitement au BPA augmenterait le risque de développer une inflammation intestinale sévère à l'âge adulte. Ces effets ont essentiellement été observés dans la descendance femelle, plus sensibles naturellement aux effets des œstrogènes que les mâles. Cette prédisposition à développer des maladies inflammatoires dans l'intestin serait la conséquence d'une maturation imparfaite du système immunitaire de la muqueuse intestinale [2].

La figure 7 ci-dessous décrit les conséquences possibles d'une exposition au BPA et présente notre hypothèse principale selon laquelle une exposition au BPA diminuerait le passage des immunoglobulines. En effet, le BPA grâce à ces propriétés oestrogénomimétiques se fixerait aux ERs augmentant l'expression des TJ. Ceci aurait pour conséquences de diminuer la perméabilité digestive paracellulaire. En parallèle, la perméabilité transcellulaire serait peu à

peu diminuée en raison de l'activité des enzymes digestives qui détruisent les immunoglobulines présentes dans la lumière du tube digestive.

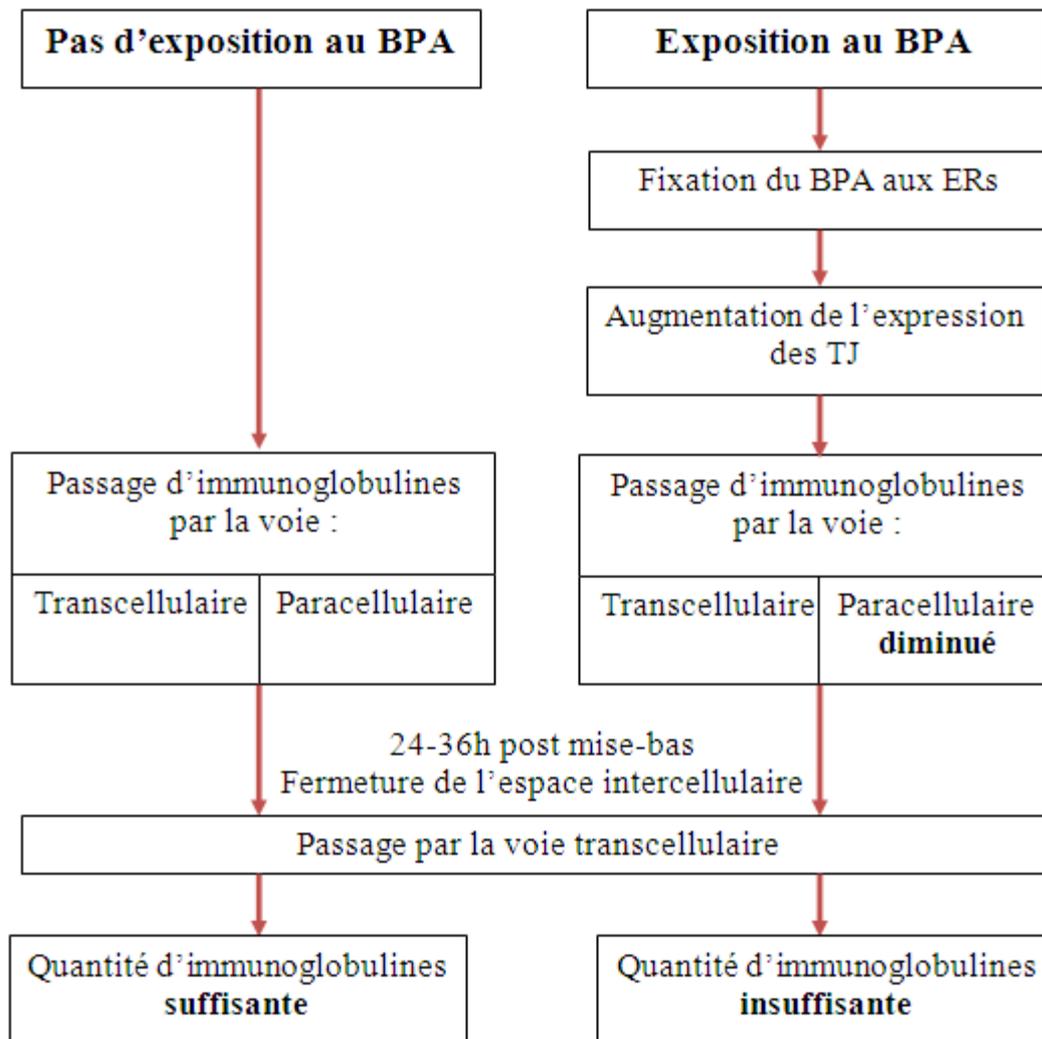


Figure 7 : Schéma comparatif de la quantité d'immunoglobuline supposée acquise en présence ou en absence de BPA. ERs : récepteurs aux œstrogènes, TJ : Tight junctions.

### **3. Objectifs de travail**

Les données expérimentales obtenues dans un modèle rongeur suggèrent que le BPA altère la perméabilité colique passive (paracellulaire) chez l'adulte. Ces effets dépendants des ER $\beta$  s'expriment à faibles doses et procèdent probablement d'une exposition systémique. Dans ces conditions, il est légitime de s'interroger sur l'impact d'une exposition systémique *in utero* au BPA sur la fonctionnalité de la barrière digestive dans les premières heures de la vie. Les ruminants constituent de ce point de vue un modèle particulièrement intéressant. En effet, le mode de placentation dans cette espèce, est peu compatible avec un transfert transplacentaire de macromolécules tels que les anticorps et l'essentiel du transfert d'immunité de la mère au jeune se produit en période néonatale par voie colostrale. L'absorption massive d'immunoglobulines résulte d'une hyperperméabilité de la barrière digestive dans les premières 24 h de vie et est caractérisée par des mécanismes d'absorption passive paracellulaire et d'endocytose non spécifique. Il est à noter que ce phénomène se produit également chez le nouveau-né humain mais à une échelle beaucoup plus faible et de façon plus importante chez l'enfant prématuré.

Cette partie du projet est basée sur l'hypothèse selon laquelle une exposition systémique du fœtus au BPA pourrait conduire à une diminution de l'hyperperméabilité physiologique de la barrière digestive dans les premières heures de la vie selon un mécanisme comparable à celui impliqué dans l'altération de la perméabilité paracellulaire colique chez l'adulte. Une telle perturbation entrainerait un défaut de transfert d'immunité passive de la mère au jeune durant cette période. L'acquisition de cette immunité passive peut être facilement caractérisée chez l'ovine en déterminant la cinétique d'absorption de différentes classes d'immunoglobulines. Cette étude sera réalisée sur la descendance de brebis réparties en deux groupes: traitement BPA sur les quatre cinquièmes de la gestation (NOAEL par voie sous cutanée) et traitement solvant. L'efficacité des différents processus d'absorption sera évaluée chez ces agneaux. Si notre hypothèse est correcte, l'absorption digestive des immunoglobulines devrait être amoindrie chez les agneaux issus de mères traitées au bisphénol A.

# **CHAPITRE II -ETUDE EXPERIMENTALE**

## **1. Matériels et méthodes**

### 1.1. Animaux : généralités

Cette étude a été conduite sur des brebis adultes multipares de race Lacaune, de 3,5 ans d'âge moyen. La semence pour la procédure d'insémination artificielle provenait de deux béliers Lacaune. Le bélier utilisé pour la monte naturelle était un Black Belly.

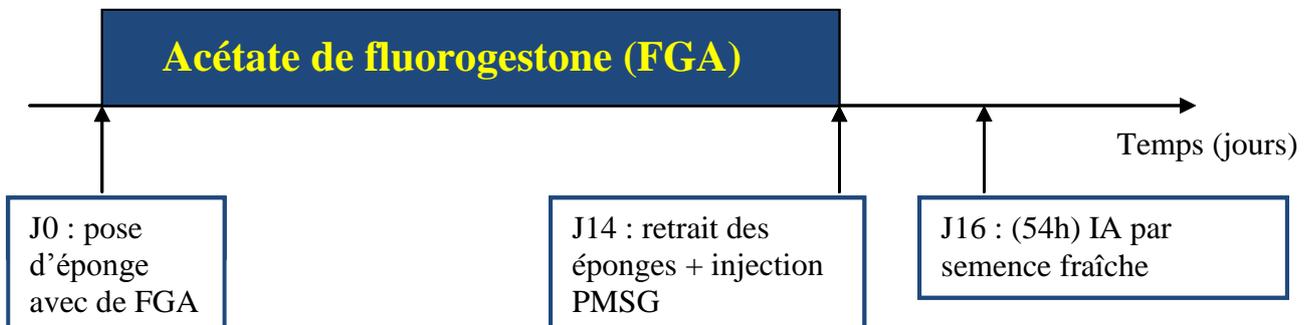
### 1.2. Conditions d'hébergement

Les brebis ont été hébergées dans une bergerie avec des conditions naturelles de lumière et de température. Elles ont été nourries aux granulés Brebilac® avec de la paille et du foin à volonté.

Les rations de gestation et de lactation ont été ajustées tous les deux mois afin de couvrir les besoins. L'eau a été donnée *ad libitum*. Les agneaux, après avoir reçu la dose de colostrum, ont été mis à proximité des mères pour assurer la reconnaissance entre la mère et son (ou ses) agneaux. Ils étaient cependant séparés par un dispositif empêchant toute tétée pendant 6h afin d'éviter toute absorption d'Ig que celles provenant de l'administration de colostrum à quantité connue réalisée immédiatement après la naissance

### 1.3. Traitement de mise à la reproduction

Le traitement de mise à la reproduction est un traitement classique de synchronisation réalisé chez les ovins (Fig.8)



**Figure 8 : Traitement de synchronisation classique réalisé chez les ovins**

Une dizaine de jours après l'insémination artificielle (IA), le bélier Black Belly muni d'un harnais marqueur a été introduit dans le troupeau afin d'assurer la fécondation des brebis en échec d'IA.

Pour l'étude, les brebis gravides ont été réparties en 2 groupes équilibrés par rapport à l'âge et au mode de saillie : un groupe ne recevant pas de BPA (lot témoin noté VEH) et un groupe recevant du BPA (lot noté BPA).

#### *Diagnostic de gestation :*

Le diagnostic de gestation a été réalisé à l'aide d'un contrôle échographique et d'un dosage de la  $\beta$ PAG (Pregnant Associated Glycoprotein) à 28j après l'IA. Seules les brebis gravides ont été gardées dans l'étude.

#### 1.4. Césarienne

Nous avons effectué une anesthésie rachidienne à l'aide de 75 à 125mg de lidocaïne (Lurocaïne ND) injecté dans des conditions aseptiques au niveau de l'espace sacro-lombaire. Une fois la césarienne effectuée les agneaux ont été présentés immédiatement à leurs mères afin d'établir le lien mères/agneaux. L'anesthésie rachidienne a été choisie afin de limiter l'exposition des agneaux aux produits anesthésiants et pour permettre l'établissement du lien mères/agneaux précocement.

Immédiatement après la section du cordon ombilical, les mères ont reçu une injection d'anti-inflammatoire non stéroïdien (flunixin de méglumine à 1mg/kg, Meflosyl ND) et d'antibiotique (amoxicilline Longue Action à 20mg/kg, Longamox ND).

#### 1.5. Matériels tests et mise en solution

Les produits ont été achetés chez SIGMA-ALDRICH, dans le cas contraire la précision est fournie.

Le bisphénol A employé est du 4,4'-isopropylidenediphénol, sa formule chimique est  $(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{C}_6\text{H}_4\text{OH})_2$ . Il est vendu sous forme de poudre blanche. Sa pureté est supérieure ou égale à 99%. Son poids moléculaire est de 228,29g/mol et sa solubilité dans l'eau est de 300mg/L.

Afin d'observer la perméabilité digestive transcellulaire et paracellulaire, on utilise respectivement de l'antipyrine et du dextran-FITC 4kD.

### Préparation des solutions mères de bisphénol A (500mg/ml) :

Cinq solutions mères différentes ont été préparées pour la durée de l'expérience. Les solutions mères ont été préparées à l'aide de BPA (99% de pureté) dissout dans de l'éthanol absolu (>99,8%) à la concentration de 500mg/ml. Puis la solution a été aliquotée dans des flacons en verre ambrés sertis. Les flacons ont été étiquetés et conservés à +4°C.

### Préparation de la solution de BPA à administrer (91mg/ml) :

La solution mère de BPA à administrer par voie sous cutanée a été préparée de façon hebdomadaire en diluant 5,5 fois la solution de BPA dans de l'huile de maïs. La solution a été stockée dans des flacons ambrés sertis étiquetés et conservés à +4°C. Les solutions de solvant ont été obtenues en diluant de l'éthanol dans de l'huile de maïs.

### Réalisation de la phase animale :

La figure 9 ci-dessous résume le protocole d'expérimentation réalisé.

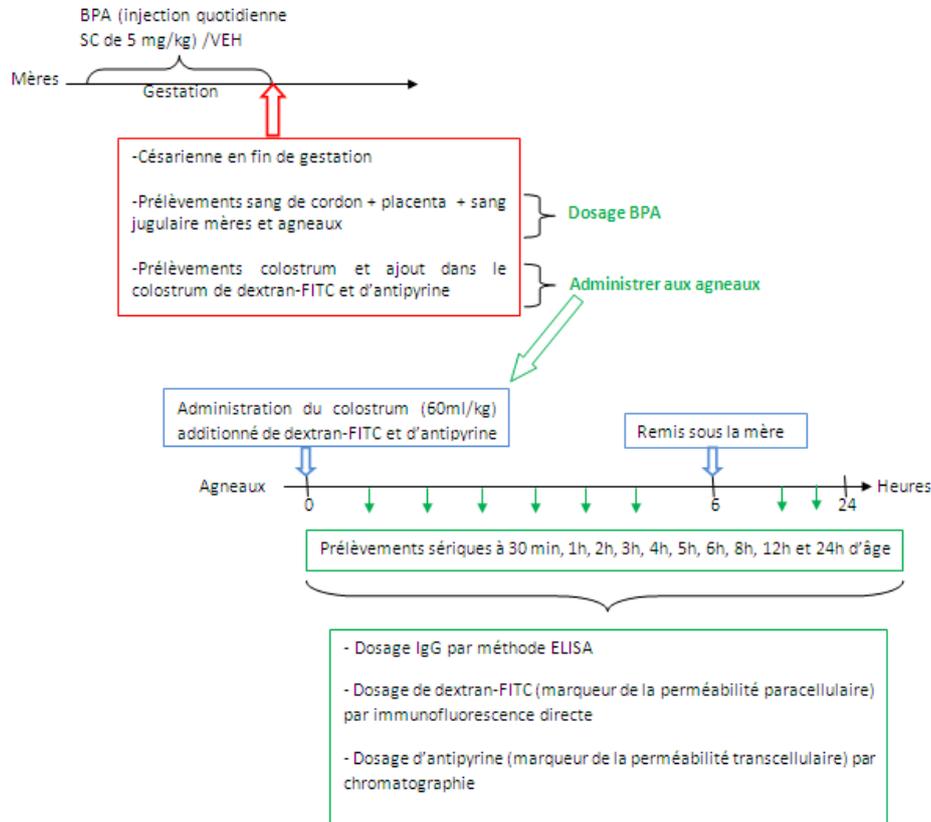


Figure 9 : schéma récapitulatif du protocole d'expérimentation réalisé

## 1.6. Traitement au BPA

La posologie de BPA était de 5mg/kg. La dose de BPA à administrer a été ajustée mensuellement en fonction de l'évolution du poids corporel des brebis.

Les administrations de BPA ont été réalisées quotidiennement par voie sous cutanée en variant les sites d'injection afin de limiter tant que possible des phénomènes d'irritation locale préjudiciables à l'absorption.

## 1.7. Cinétiques d'absorption digestive

### 1.7.1. Voie d'administration

L'antipyrine et le dextran-FITC ont été dissouts dans le colostrum (10mg d'antipyrine et 20mg de dextran pour 60ml de colostrum). Les agneaux ont tout d'abord ingéré du sérum physiologique dans un biberon afin de susciter le réflexe de fermeture de la gouttière œsophagienne. Une sonde gastro-oesophagienne a été introduite par une narine jusque dans l'estomac. Cette sonde a permis l'administration d'une quantité précise de colostrum calculée en fonction du poids à la naissance des agneaux. Une fois la quantité nécessaire administrée par voie orale, c'est-à-dire 60ml/kg, correspondant à ce qu'un agneau ingère spontanément sur les 4 premières heures de vie, les agneaux ont été placés dans des boxes à claires voies permettant de maintenir le contact avec leurs mères mais empêchant toute tétée. Ils ont eu de nouveau accès à la mamelle seulement 6h après l'administration.

### 1.7.2. Séquence de prélèvement d'échantillons sanguins

Dès la fin de la césarienne des prélèvements de sang de cordon, de liquide amniotique et de placenta sont réalisés sur tous les animaux. Parallèlement du sang jugulaire est prélevé aux mères et aux agneaux nouveau-nés.

Puis à partir de 30min après l'extraction des agneaux par césarienne des prélèvements de sang jugulaire sont réalisés. Le premier prélèvement est réalisé à 30 min puis toutes les heures jusqu'à 6h. Enfin les derniers prélèvements sont effectués à 8h, 12h et 24h après l'extraction des agneaux.

## 1.8. Dosage des différents marqueurs de perméabilité

### *Dosage de l'antipyrine :*

Les concentrations plasmatiques d'antipyrine ont été déterminées par HPLC couplée à un détecteur UV après extraction sur phase solide du plasma surchargé avec 1 µg de standard interne (acétophénétidine, 10 µg/ml) sur cartouche SPE (Bond Elut C8 Varian®100 mg, Les Ulis, France). L'élution s'est faite avec 1 mL de dichlorométhanol-méthanol (85/15, v/v). L'éluat a été évaporé à la vapeur d'azote à 40 °C et reconstitué avec 100 µL d'eau-méthanol (50/50, v/v). Les analyses ont été réalisées sur une chaîne HPLC Kontron (Paris, France) en conditions isocratiques. La phase mobile (acétonitrile-tampon phosphate 25 mM, pH=7.2 (25/75, v/v)) a été pompée à un débit de 0.6 mL/min à travers une colonne maintenue à 40 °C (Inertsil ODS3® C18, 3 µm, 150 x 4 mm avec une pré colonne Inertsil ODS3® 10x4 mm, Bischoff, Allemagne). La détection UV s'est faite à 254 nm. La gamme étalon s'étendait respectivement de 0.2 à 20.0 µg/mL. L'équation de la courbe d'étalonnage a été obtenue par ajustement des données (rapport de l'aire du pic/ l'aire du standard interne vs. les concentrations théoriques) suivant une équation linéaire en utilisant une régression linéaire avec  $1/(\text{concentrations théoriques})^2$  comme facteur de pondération.

L'extraction a été réalisée sur un volume de plasma de 150 µL. Les coefficients de variation moyens intra- et inter-dosage des trois QC (0.8, 3.5 et 12 µg/mL) ont été inférieurs à respectivement 2 % et 7 %. L'exactitude a été de  $86 \pm 7$  %. La LLOQ a été validée à 0.2 µg/mL.

### *Dosage du dextran-FITC :*

Les concentrations plasmatiques en dextran FITC ont été déterminées par la mesure de la fluorescence à la longueur d'émission du FITC après excitation à la longueur d'onde d'excitation du FITC sur microplaque. Les concentrations sériques en dextran-FITC ont été déduites des valeurs de DO obtenues à partir d'une gamme étalon de dextran-FITC dilué dans du sérum d'agneaux nouveau nés.

## 1.9. Dosage des IgG

Le dosage des IgG a été réalisé à l'aide d'une méthode ELISA avec des kits « Alpha Diagnostic International ». Ces kits permettent d'évaluer spécifiquement les immunoglobulines G.

Le test immunologique, utilisant la chaîne lourde des anticorps spécifiques, fournit une quantification sensible et sélective des IgG de moutons, que l'on trouve circulant dans le sang ou présent dans les différents fluides corporels.

Le principe du kit ELISA IgG Mouton est basé sur la méthode d'ELISA Sandwich. Les IgG de moutons, présents dans l'échantillon, se fixent à deux anticorps. Le premier est fixé aux puits de la plaque et le deuxième est conjugué à une enzyme : la peroxydase de raifort (HRP). L'ajout d'un substrat (TMB) produit une couleur dans les puits par réaction enzymatique avec la HRP. L'intensité de la couleur est directement proportionnelle à la quantité d'IgG présente dans le plasma.

Une fois la réaction terminée, l'absorbance à 450nm a été mesurée. Une courbe étalon a été déterminée à partir de concentrations connues. Les échantillons ont été dilués dans du tampon (de 50 à 500 000 fois) de façon à se situer dans la gamme étalon.

#### *Performance du kit :*

Grâce à une méthode d'immunoélectrophorèse et ELISA, il a été montré que les anticorps utilisés dans le kit réagissent spécifiquement avec les IgG et ne réagissent pas avec les IgM, IgA ou les autres protéines sériques ovines. Cependant on observe une réaction partielle avec les IgG bovines ou caprines.

#### 1.10. Analyses des données :

A partir des cinétiques temporelles des concentrations plasmatiques en antipyrine, dextran, IgG, les aires sous la courbe des concentrations plasmatiques (AUC) ont été calculées en utilisant la méthode des trapèzes linéaires. Les concentrations plasmatiques maximales (Cmax) et le temps d'occurrence de ces valeurs maximales (Tmax) ont été déduits des valeurs observées. Les AUC ont été calculées des premières aux dernières concentrations détectables.

L'effet du traitement sur l'évolution du poids des brebis ou le décours temporel des concentrations sériques des différents marqueurs de perméabilité digestive (dextran, antipyrine et d'immunoglobulines G) a été analysé avec une ANOVA avec comme facteurs à effets fixes le sexe des agneaux, le traitement, le temps du prélèvement et leurs différentes interactions. L'animal niché dans le facteur d'interaction traitement/sexe.

L'équation de ce premier modèle s'écrit :

$$\mu = \text{sexe} + \text{temps} + \text{traitement} + \text{sexe} * \text{temps} * \text{traitement} + \text{sexe} * \text{traitement} + \text{temps} * \text{traitement} + \text{animal} (\text{sexe} * \text{traitement})$$

Les paramètres moyens (AUC, Tmax et Cmax) ont été analysés avec une ANOVA avec comme facteurs à effets fixes le traitement, le sexe et l'interaction traitement/sexe.

L'équation de ce deuxième modèle s'écrit :

$$\mu = \text{sexe} + \text{traitement} + \text{sexe} * \text{traitement} + \varepsilon$$

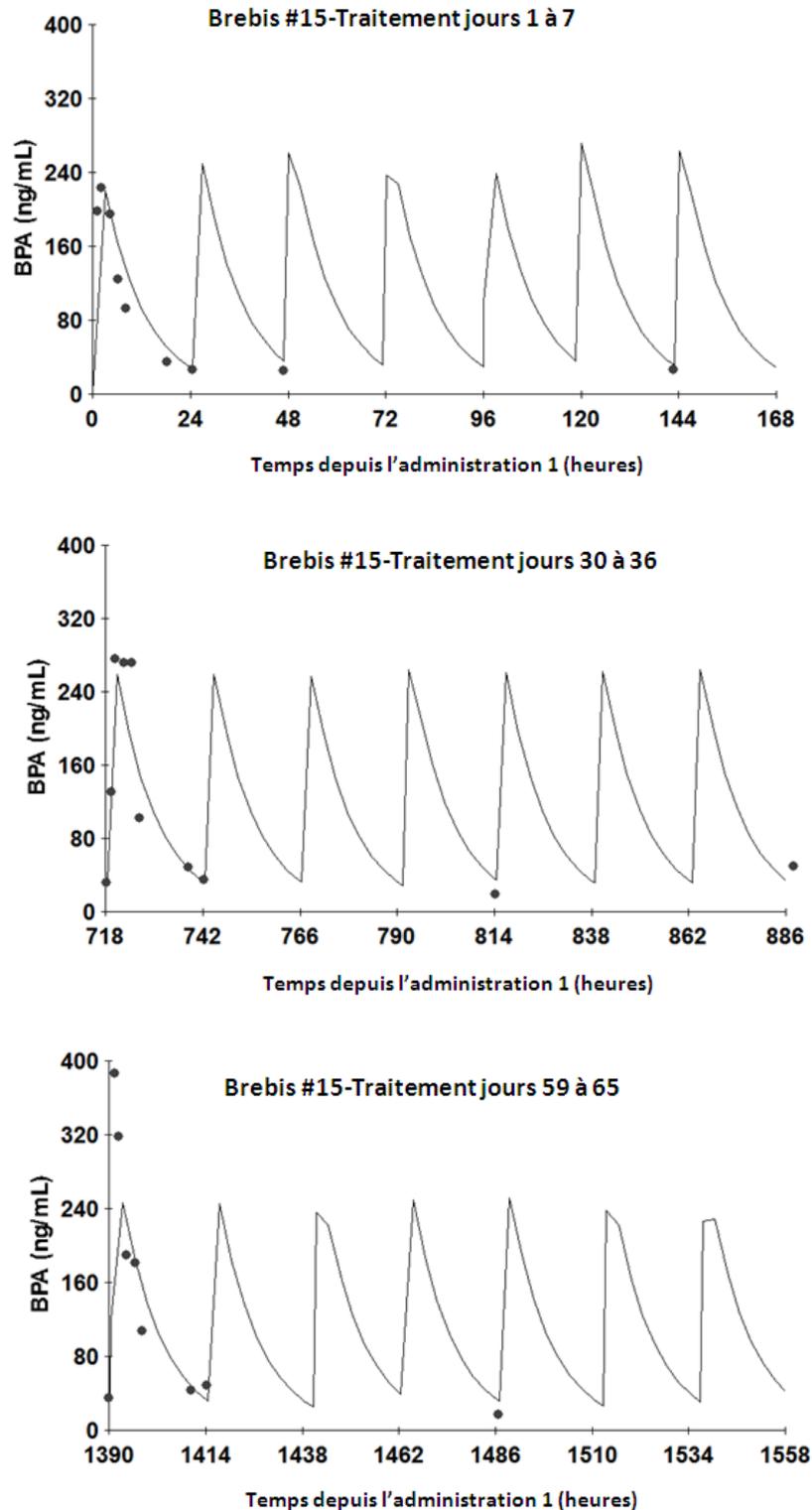
Ces analyses ont été réalisées avec le logiciel SYSTAT® (version 10, Chicago, IL, USA). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes  $\pm$  écarts types (SD).

## 2. Résultats

### 2.1. Exposition des mères

L'évolution dans le temps des concentrations de BPA dans les échantillons collectés deux fois par semaine et dans les échantillons sériés prélevés juste après les injections sous-cutanées (SC), a été ajustée à une équation biexponentielle correspondant à un modèle mono-compartimental pour des administrations extravasculaires répétées avec un facteur de pondération  $1/\hat{y}^2$ .

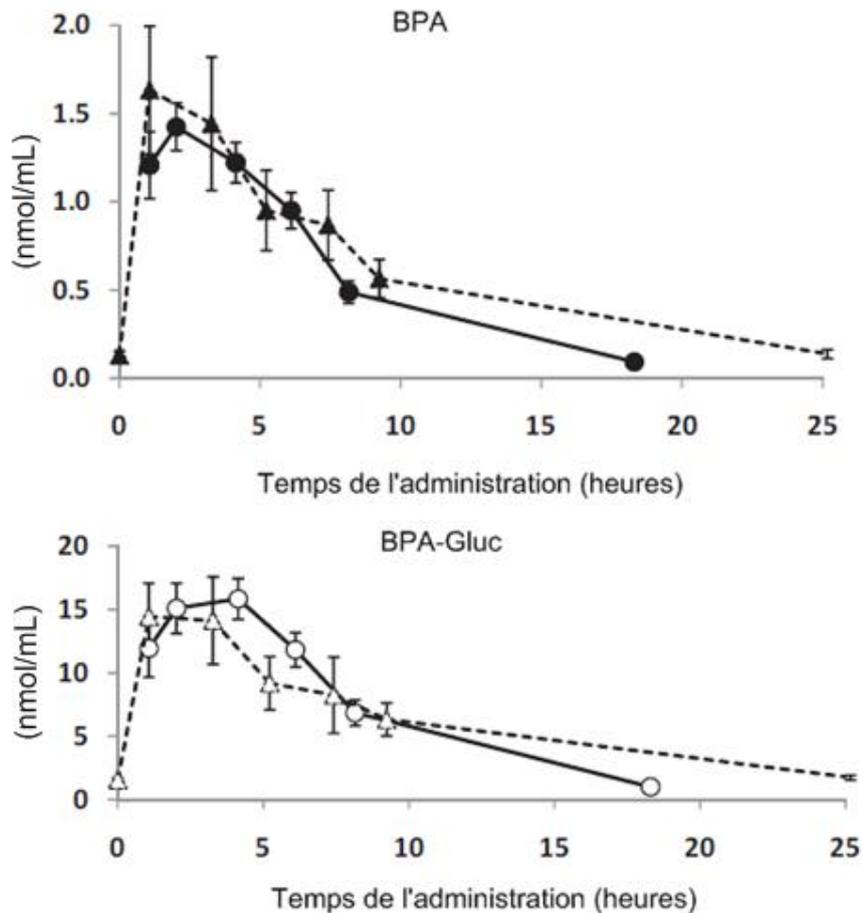
La figure 10 décrit, au cours du temps, les concentrations observées et prédites du BPA chez une brebis représentative à trois différentes fenêtres de temps (7 jours chacune) après les 1<sup>ère</sup>, 30<sup>ème</sup> et 58<sup>ème</sup> injections sous-cutanées. Les fluctuations des concentrations journalières ont été estimées entre une concentration maximale moyenne de  $240 \pm 15$  ng/ml et un minimum de  $38 \pm 4$  ng/ml. Les concentrations maximales ont été relevées environ  $94 \pm 6$  minutes après l'administration sous-cutanée (SC). Le ratio de l'AUC<sub>0-24h</sub> de la 58<sup>ème</sup> injection SC à celle obtenue pour la 1<sup>ère</sup> injection est de 0,97 indiquant que le BPA ne s'accumule pas chez les brebis gravides.



**Figure 10 :** Données observés (points) et prédites (lignes) pour l'évolution au cours du temps des concentrations sériques de BPA chez une brebis gravide représentative pendant trois périodes de 7 jours consécutifs suivant la 1<sup>ère</sup>, la 30<sup>ème</sup> et la 59<sup>ème</sup> administration de BPA.

Les brebis ont été traitées avec des injections quotidiennes de BPA (5mg/kg/jour sc) depuis le 28<sup>ème</sup> (Jour 0 du traitement) jusqu'à dernier jour de la gestation. Le BPA a été dosé dans des échantillons collectés approximativement 0, 2, 4, 6, 8, 20 and 24 h après la 1<sup>ère</sup>, la 30<sup>ème</sup> et la 59<sup>ème</sup> administration et dans des échantillons collectés deux fois par semaine juste avant la nouvelle administration tout au long du traitement. Les données ont été ajustées avec un modèle monocompartimental extravasculaire afin d'établir un profil détaillé de l'évolution au cours du temps des concentrations de BPA.

La figure 11 décrit l'évolution au cours du temps de la concentration sérique moyenne ( $\pm$  écart-type) de BPA et du BPA-Gluc chez 6 brebis gravides traitées avec des injections quotidiennes de BPA du 28<sup>ème</sup> jour jusqu'à la fin de la gestation. Le BPA et le BPA-Gluc ont été mesurés simultanément dans des échantillons sériés de sang collectés juste après la première (ligne pleine) et la 58<sup>ème</sup> (ligne en pointillé) administrations. Cette figure nous indique qu'il n'y a accumulation ni de BPA ni de BPA-Gluc chez les brebis gravides.



**Figure 11 : Evolution au cours du temps** de la concentration sérique moyenne ( $\pm$ Ecart-type) de BPA (motifs pleins) et de BPA-Gluc (motifs vides) chez des brebis gravides (n=6) traitées avec des injections quotidiennes de BPA [5mg/ (kg\*j) sc] du 28<sup>ème</sup> jour jusqu'à la fin de la gestation. Le BPA et le BPA-Gluc ont été mesurés simultanément dans des échantillons sériés de sang collectés juste après les première (ligne pleine) et la 58<sup>ème</sup> (ligne en pointillé) administrations.

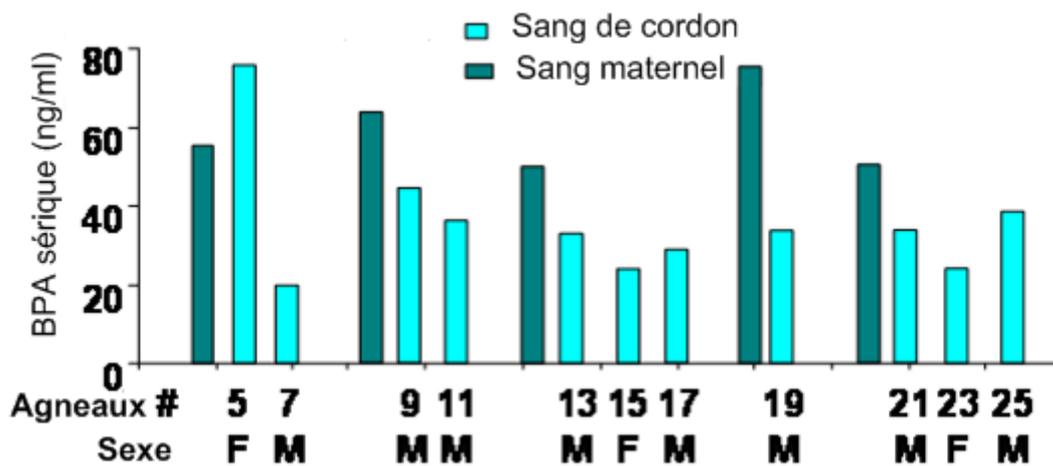
## 2.2. Evaluation de l'exposition materno-fœtale à la naissance

Le tableau 2 nous montre que les concentrations en BPA dans les sera des mères et des agneaux étaient très similaires. En revanche, les concentrations en BPA-Gluc chez les agneaux étaient respectivement 30 à 50 fois plus élevées dans le sang de cordon et dans le liquide amniotique que chez les mères à la mise-bas.

	Sang jugulaire des mères (nmol/ml) n=6	Sang de cordon des agneaux (nmol/ml) n=11	Liquide amniotique (nmol/ml) n=7	Placenta (nmol/g de tissu) n=10	Colostrum (nmol/ml) n=6
<b>BPA</b>	0.18 ± 0.03	0.13 ± 0.02	0.24 ± 0.04	6.54 ± 1.71	0.21 ± 0.03
<b>BPA-Gluc</b>	5.73 ± 1.45	161.72 ± 9.13	312.11 ± 85.86	67.09 ± 10.52	1.69 ± 0.53
<b>BPA-Gluc/BPA</b>	36 ± 12	1380 ± 184	1331 ± 283	18 ± 6	7 ± 2

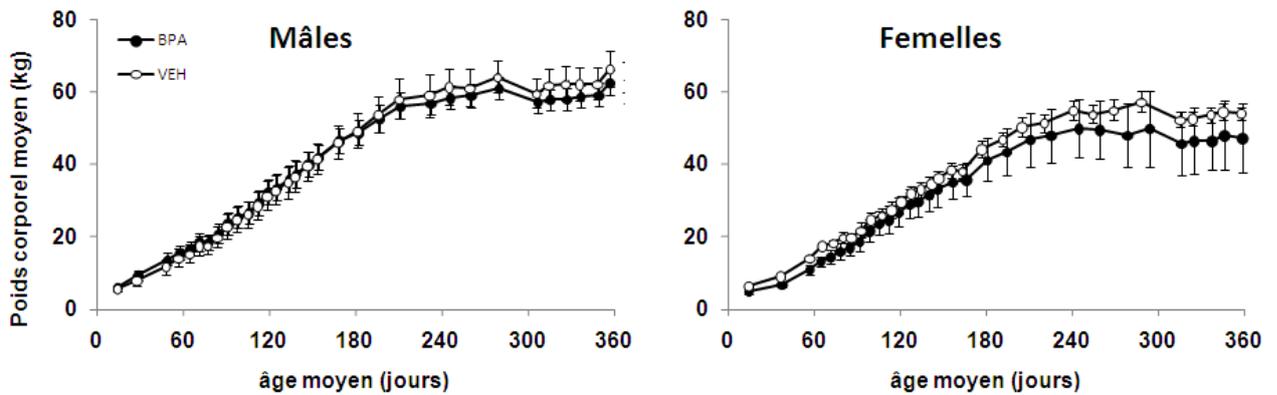
**Tableau 2** : Exposition maternelle et exposition fœtale interne au BPA (moyenne sérum/concentration dans tissus ± SEM) et son principal métabolite, le BPA-Gluc à la naissance.

En règle générale, l'exposition des nouveau-nés en BPA libre était très similaire à celle de leurs mères (figure 12).



**Figure 12** : Exposition fœtale au BPA : concentrations individuelles en BPA dans le sang de cordon d'agneaux et dans le sang jugulaire de leurs mères respectives.

### 2.3. Evaluation du poids corporel des agneaux :



**Figure 13 :** Evolution dans le temps des poids corporels moyens ( $\pm$ sem) des agneaux mâles et femelles nés de mères traitées avec une solution témoin ou avec du BPA (5 mg/kg/j sc de JG 29 à la fin de la gestation).

Les poids corporels ont été enregistrés deux fois par mois environ.  $n = 6$  pour les mâles VEH; 9 pour les mâles BPA et 3 dans chacun des groupes femelles. Le traitement des mères n'a pas affecté la croissance (interaction traitement \*temps  $p > 0.05$ ).

L'analyse statistique n'a révélé aucun effet significatif du traitement sur l'évolution des poids corporels.

#### 4.1. Evaluation de la perméabilité digestive

##### *Absorption par voie orale de dextran-FITC :*

Les figures 14 et 15 représentent les concentrations plasmatiques moyennes en dextran-FITC et les AUC associées, respectivement chez les mâles et chez les femelles issus de mères traitées par injection quotidienne sous-cutanée de 5mg/kg/j de BPA ou par une solution solvant et à droite.

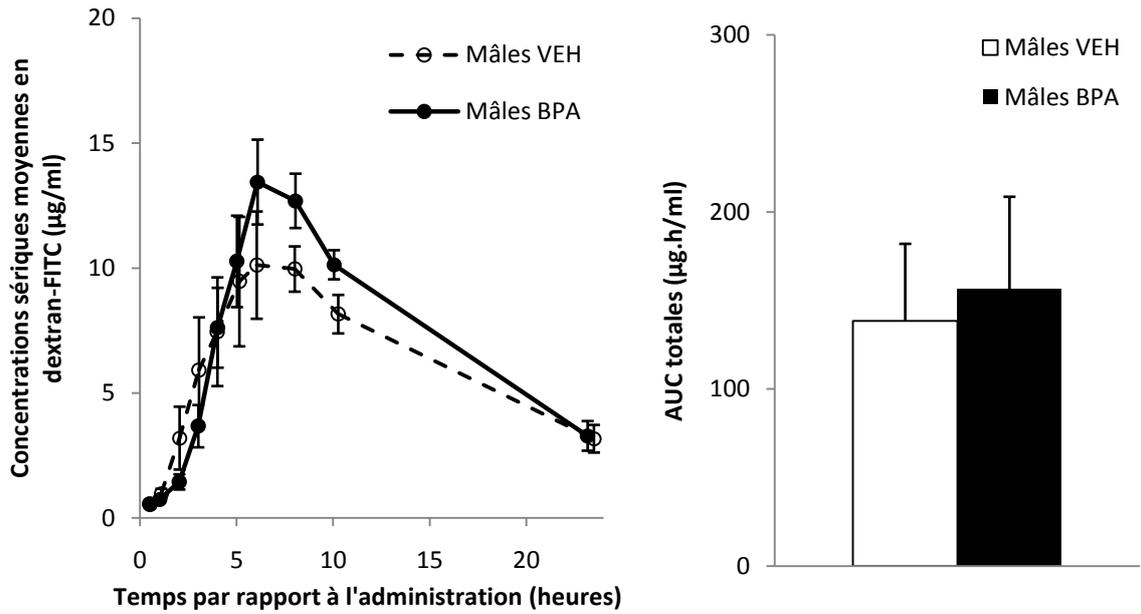


Figure 14 : concentrations sériques moyennes (moy  $\pm$  ET) en dextran-FITC en fonction du temps et aires sous la courbe (AUC totales) des concentrations plasmatiques en dextran-FITC chez des agneaux mâles issus de brebis traitées quotidiennement par injection sous-cutanée de 5mg/kg/j au BPA (BPA, n = 8) ou par une solution solvant (VEH, n= 8)

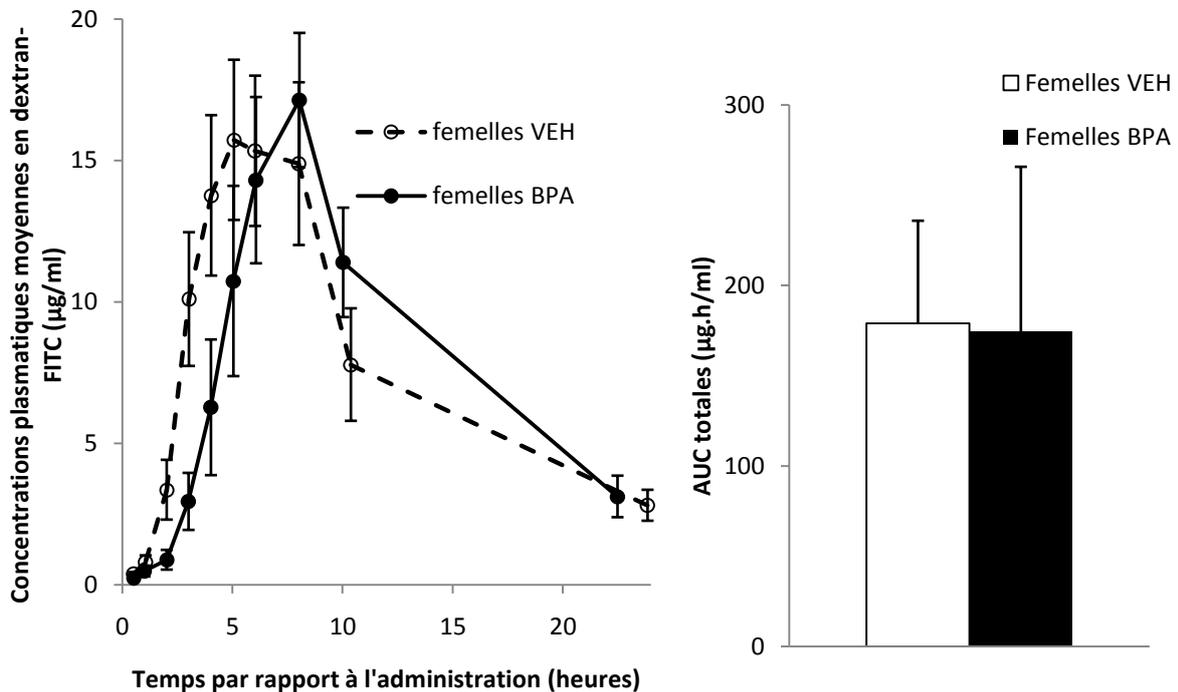


Figure 15: concentration sériques en dextran-FITC (moy  $\pm$  ET) en fonction du temps et aires sous la courbe des concentrations plasmatiques en dextran-FITC (AUC totales) chez des agneaux femelles issues de brebis traitées quotidiennement par injection sous-cutanée de 5mg/kg/j au BPA (BPA, n = 4) ou par une solution solvant (VEH, n= 6)

La concentration plasmatique en dextran-FITC des mâles du lot VEH atteint une concentration maximale de  $10,12 \pm 6,07 \mu\text{g/ml}$  à  $T_{\text{max}} = 6,04 \pm 0,08 \text{ h}$ . La concentration plasmatique des mâles du lot BPA atteint un maximum de  $13,44 \pm 4,80 \mu\text{g/m}$  là  $T_{\text{max}} = 6,08 \pm 0,15 \text{ h}$ .

La concentration plasmatique chez les femelles du lot VEH augmente plus rapidement que la concentration plasmatique chez les femelles du lot BPA. Le pic atteint concernant la concentration plasmatique chez les femelles du lot VEH est de  $15,73 \pm 6,94 \mu\text{g/ml}$  qui est atteinte à  $T_{\text{max}} = 5,06 \text{ h} \pm 0,13 \text{ h}$ . Chez les femelles du lot BPA la concentration maximale de  $17,14 \pm 4,75 \mu\text{g/ml}$  est atteinte à  $T_{\text{max}} = 8,03 \pm 0,3 \text{ h}$ .

Toutefois, l'analyse statistique n'a révélé aucun effet significatif du traitement sur les paramètres,  $T_{\text{max}}$  et  $C_{\text{max}}$ .

*Absorption par voie orale d'antipyrine :*

Les figure 16 et 17 représentent les concentrations plasmatiques moyennes en antipyrine au cours du temps et les AUC associées obtenues suite à une administration orale unique à la naissance respectivement chez les mâles et chez les femelles issus de mères traitées par injection quotidienne sous-cutanée de  $5\text{mg/kg/j}$  de BPA ou par une solution solvant et à droite.

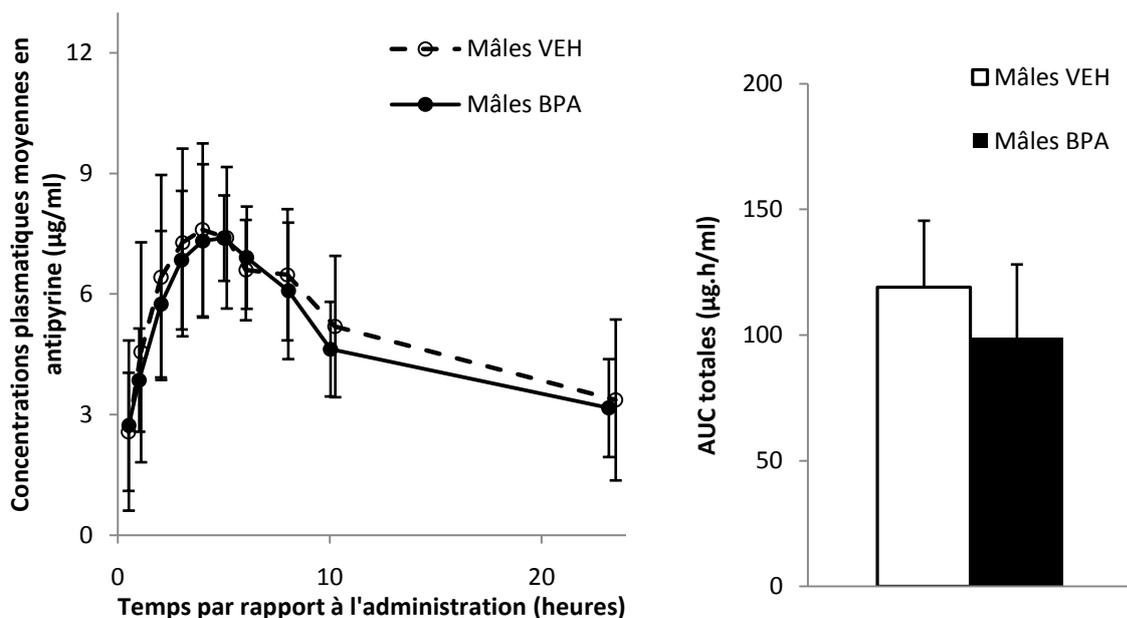


Figure 16 : concentrations plasmatiques moyennes (moy  $\pm$  ET) en antipyrine en fonction du temps et aires sous la courbe des concentrations plasmatiques en antipyrine (AUC totales) chez des agneaux mâles issus de brebis traitées quotidiennement par injection sous-cutanée de 5mg/kg/j au BPA (BPA, n = 8) ou par une solution solvant (VEH, n= 8)

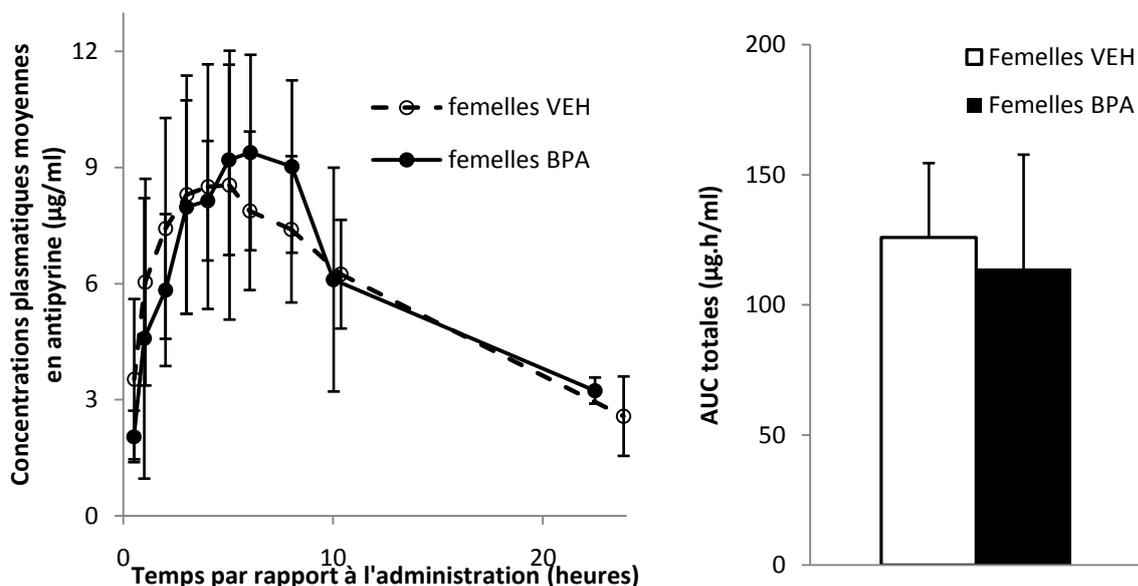
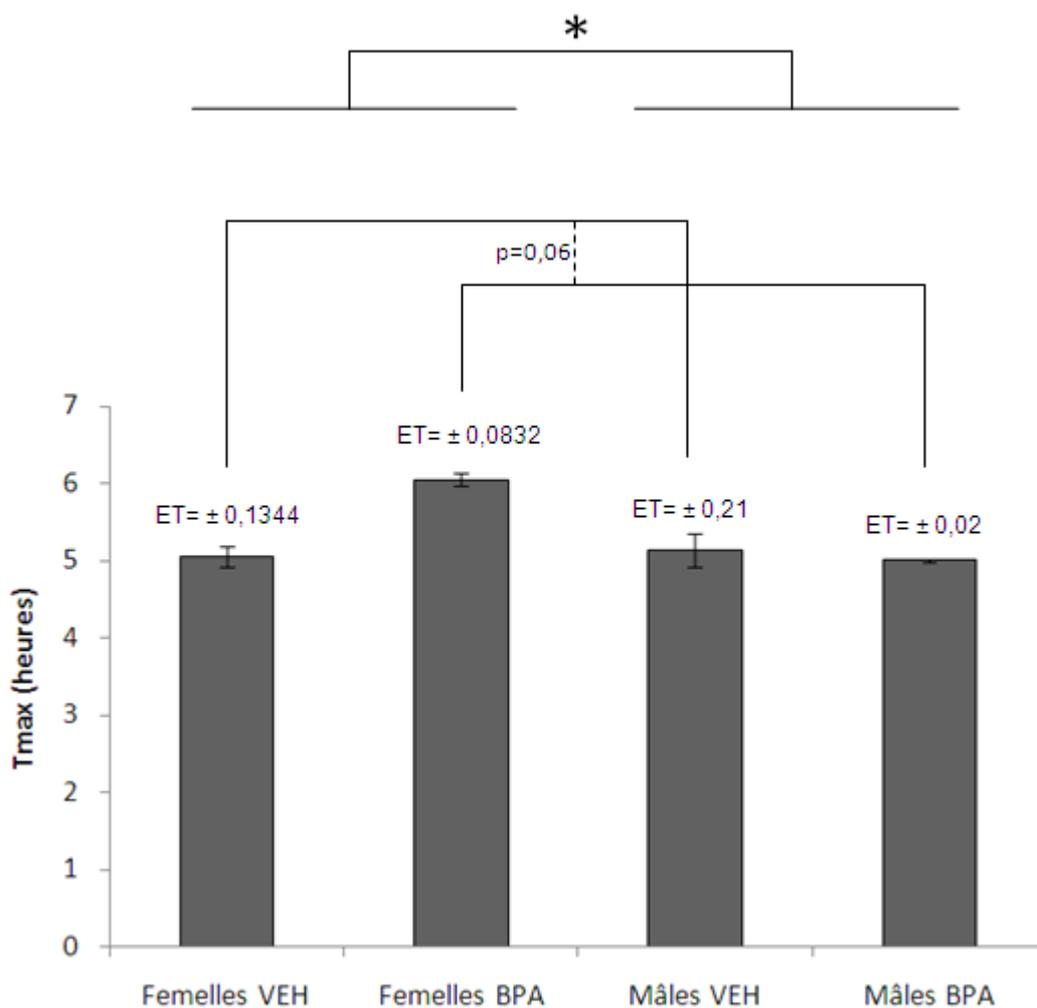


Figure 17 : concentration plasmatique moyenne (moy  $\pm$  ET) en dextran-FITC en fonction du temps et aires sous la courbe des concentrations plasmatiques en antipyrine (AUC totales) chez des agneaux femelles issues de brebis traitées quotidiennement par injection sous-cutanée de 5mg/kg/j au BPA (BPA, n = 4) ou par une solution solvant (VEH, n= 6)

La concentration maximale en antipyrine chez les mâles VEH est sensiblement la même que pour les mâles BPA ( $7,40 \pm 1,76 \mu\text{g/ml}$  à  $5,14 \pm 0,21 \text{ h}$  pour les VEH et  $7,39 \pm 1,06 \mu\text{g/ml}$  à  $5,01 \pm 0,02 \text{ h}$ ). Chez les femelles la concentration maximale des femelles VEH ( $8,54 \mu\text{g/ml} \pm 3,47$ ) est moins importante que celle des femelles BPA ( $9,38 \mu\text{g/ml} \pm 6,06$ ).



**Figure 18 : analyse statistique et effets observés concernant l'antipyrine en fonction du sexe et du groupe sur le Tmax**

L'étude des AUC n'a montré aucun effet significatif du traitement (Figure 16 et 17). Un effet significatif du sexe ( $p = 0,013$ ) avec un Tmax plus faible chez les mâles a été mis en évidence (Figure 18).

*Absorption par voie orale des immunoglobulines :*

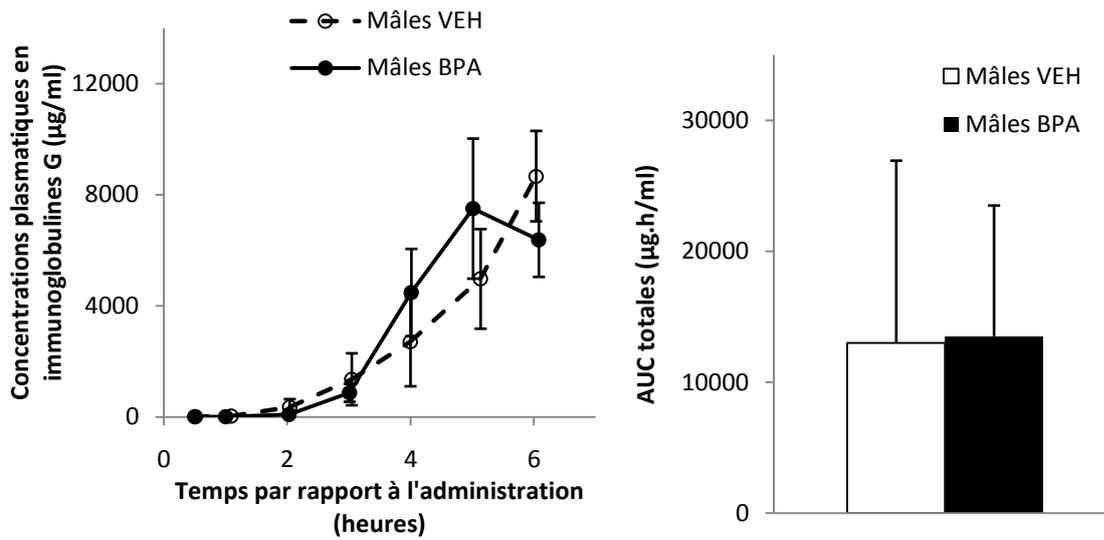


Figure 19 : concentrations plasmatiques moyennes (moy ± ET) en immunoglobulines G en fonction du temps et aires sous la courbe des concentrations plasmatiques en immunoglobulines G (AUC totales) chez des agneaux mâles issus de brebis traitées quotidiennement par injection sous-cutanée de 5mg/kg/j au BPA (BPA, n = 8) ou par une solution solvant (VEH, n= 8)

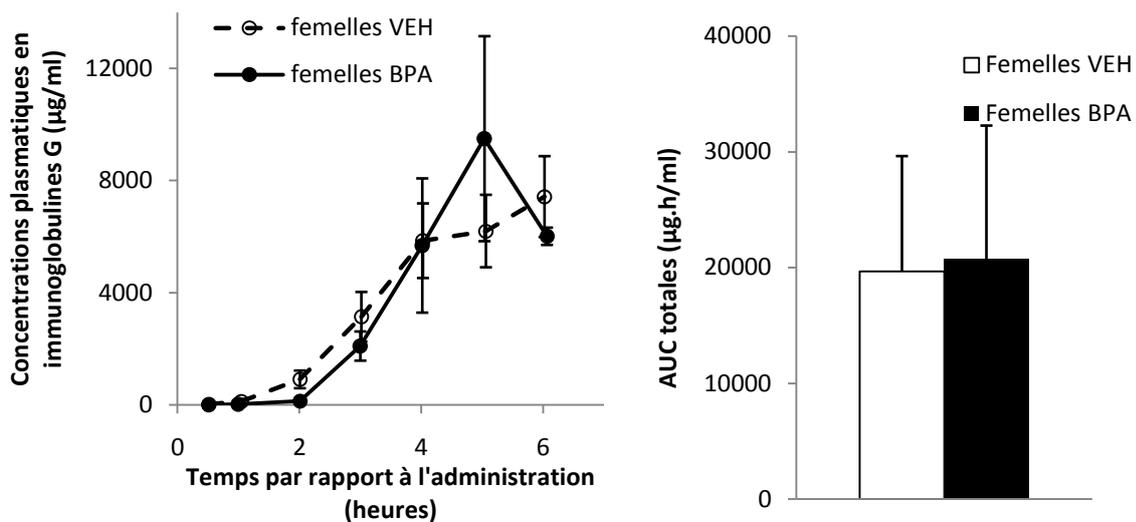


Figure 20 : concentrations plasmatiques moyennes (moy ± ET) en immunoglobulines G en fonction du temps et aires sous la courbe des concentrations plasmatiques en immunoglobulines G (AUC totales) chez des agneaux femelles issues de brebis traitées quotidiennement par injection sous-cutanée de 5mg/kg/j au BPA (BPA, n = 8) ou par une solution solvant (VEH, n= 8)

Aucun effet significatif n'a pu être identifié concernant l'absorption des immunoglobulines.

## **CHAPITRE III – DISCUSSION GENERALE**

### **1. Exposition des mères**

Le rapport entre l'AUC<sub>0-24h</sub> de la 58<sup>ème</sup> injection et l'AUC<sub>0-24h</sub> de la 1<sup>ère</sup> injection est de 0,97 signifiant qu'il n'y a pas d'accumulation de BPA dans le plasma des brebis gravides, ce qui n'est pas en faveur de l'hypothèse d'une surexposition maternelle au BPA pendant la gestation élaborée suite à des études menées sur des femmes enceintes [60-62]. Ce résultat est cohérent avec celui de Corbel et al. (2013) qui a montré que les paramètres pharmacocinétiques du BPA ne varient pas au cours de la gestation de la brebis. Chez la brebis, il n'y a pas de changement de taux de transformation de BPA et BPA-Gluc au cours de la gestation (après la 1<sup>ère</sup> et la 58<sup>ème</sup> injection).

### **2. Exposition materno-fœtale au BPA à la naissance :**

Les concentrations sériques en BPA non conjugué sont très similaires chez les mères et chez les agneaux. Cependant les concentrations sériques en BPA conjugué sont 30 à 50 fois plus importantes, respectivement, dans le sang de cordon et le liquide amniotique que dans le sang maternel à la naissance.

Même si le BPA est transporté de la brebis au fœtus à travers le placenta, le fœtus n'est pas surexposé au BPA non conjugué provenant des traitements des mères. Ceci est en accord avec les études menées sur des cohortes d'humains et nouveau-nés humains qui indiquent que les nouveau-nés montrent des concentrations plasmatiques en BPA non conjugué très similaires à celles de leurs mères [62, 63]. Cependant, on ne peut pas exclure la possibilité d'une surexposition du fœtus dans les premiers mois de gestation alors que l'activité des enzymes de conjugaison hépatique est très limitée en début de gestation.

Les concentrations de BPA placentaires sont très largement supérieures aux concentrations en BPA dans le sang maternel. Une étude menée chez des rats [5] a démontré que le placenta et le fœtus expriment une activité de déconjugaison. Ainsi nos résultats peuvent être expliqués par la présence de l'activité de déconjugaison dans le placenta des brebis. Cela voudrait dire que le placenta serait la source primaire de BPA non conjugué pour le fœtus.

Les concentrations sériques en BPA chez les fœtus sont sensiblement les mêmes que celles des mères suggérant que, au moins en fin de gestation, le fœtus peut surmonter partiellement

l'apport continu en BPA en déclenchant des mécanismes de détoxification tels que la conjugaison. Ceci expliquerait les niveaux particulièrement élevés de BPA-Gluc mesurés dans le compartiment fœtal.

Les niveaux importants en BPA-Gluc dans les compartiments fœtaux suggèrent que le BPA-Gluc est piégé dans ces compartiments. Ce résultat est cohérent avec celui de Corbel et al. (2013) qui suggère que la barrière placentaire limite le passage du BPA-Gluc dans le sens foeto-maternel. L'origine, fœtale ou maternelle du BPA-Gluc, reste inconnue. Mais l'UDP-Glucuronosyl-transférase, enzyme hépatique, s'active au cours du développement fœtal et jusqu'à la naissance [64] et pourrait avoir contribué à la production de BPA-Gluc dans le compartiment fœtal en particulier vers la fin de la gestation. De plus, le liquide amniotique pourrait constituer une source non négligeable de BPA-Gluc pour le fœtus par ingestion. En effet le fœtus ingère environ 900ml de liquide amniotique par jour [65] et cela peut être estimé dans notre étude à une ingestion de 100mg de BPA-Gluc par jour à la fin de la période de traitement.

Etant donné la très forte accumulation de BPA-Gluc dans le compartiment fœtal, une question persiste sur la déconjugaison potentielle du BPA-Gluc directement par des tissus cibles du fœtus. Un tel processus pourrait évidemment mener à une réactivation, in situ, du conjugué résultant en une surexposition des tissus cibles sensibles à du BPA libre actif.

### **3. Perméabilité digestive des agneaux:**

L'analyse statistique n'a montré aucun effet probant du traitement au BPA sur les cinétiques des marqueurs de perméabilité (antipyrine et dextran-FITC) et des immunoglobulines sériques.

Cette constatation suggère deux hypothèses. Soit le traitement au BPA n'a pas d'effet sur l'absorption ce qui contrasterait avec ce qui est observé notamment chez le rat adulte en terme de perméabilité paracellulaire colique. Soit il y a un effet du traitement mais cet effet est masqué par un impact du traitement sur les processus d'élimination des marqueurs.

Rappelons également que les études qui ont prouvé que l'administration de BPA diminue la perméabilité paracellulaire colique ont été menées sur des rates ovariectomisées donc non soumises à des hormones sexuelles endogènes et que l'administration a eu lieu par voie orale,

Dans notre étude, les agneaux étaient issus de mères traitées par voie sous-cutanée. Le passage avéré de BPA via la barrière placentaire est donc plus important car le BPA administré ne subit pas de métabolisation au niveau du foie.

A ce stade, le modèle ne permet pas de conclure mais il est clair que du point de vue fonctionnel, le traitement au BPA n'affecte en rien l'exposition des agneaux aux IgG maternelles.

## **Conclusion**

L'objectif de notre étude était d'observer et de caractériser l'exposition maternelle au BPA des brebis et son effet sur la perméabilité digestive des agneaux issus de ces brebis.

Aucun effet significatif n'a été mis en évidence concernant le stade de gestation sur la toxicocinétique du BPA. La gestation n'impliquerait donc pas de surexposition des mères au BPA.

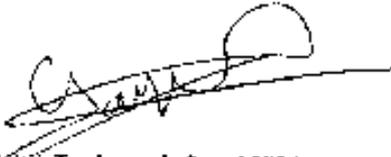
Les concentrations en BPA conjugué retrouvées dans le sang du cordon et le liquide amniotique sont largement supérieures à celles retrouvées dans le sang maternel suggérant une surexposition des agneaux au BPA conjugué et une exposition par voie orale de BPA conjugué (par ingestion de liquide amniotique).

Notre étude n'a pas pu démontrer l'altération de l'absorption d'immunoglobulines par une exposition in utero de BPA. Cependant il reste à déterminer si le traitement n'a effectivement aucun effet sur l'absorption ou s'il y a un effet qui est masqué par une interférence d'élimination.

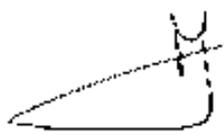
## AGREMENT SCIENTIFIQUE

En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire

Je soussigné, Véronique GAYRARD, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **MONTAGNE Candice** intitulée « **Effets d'une exposition prénatale à un polluant, la bisphénol A sur la transmission de l'immunité colostrale chez l'agneau** » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.



Fait à Toulouse, le 2 mai 2014  
Professeur Véronique GAYRARD  
Enseignant chercheur  
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse



Vu :  
Le Directeur de l'Ecole Nationale  
Vétérinaire de Toulouse  
Professeur Alain MILON

Vu :  
Le Président du jury :  
Professeur Jean-Marc SOULAT



Professeur Jean-Marc SOULAT  
Coordonnateur interrégional  
DES de Médecine du Travail  
SMPE - Pavillon Turial  
CHU TOULOUSE - HOPITAL PURPAN  
TSA 4003f - 31059 TOULOUSE Cedex

Vu et autorisation de l'impression :  
Le Président de l'Université  
Paul Sabatier



Professeur Bertrand MONTUBERT  
Par délégation, la Vice-Présidente de l'CVU  
Madame Régine ANDRÉ OBRUCHI

Conformément à l'Arrêté du 20 avril 2007, article 6, la soutenance de la thèse ne peut être autorisée qu'après validation de l'année d'approfondissement.

## Bibliographie

1. Geneva, S., World Health Organization, International Programme on Chemical Safety., *Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors*. 2002.
2. 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 U S A, 2010. **107**(1): p. 448-53.
3. Toxicocinétique comparée du BPA chez 5 espèces et extrapolation de l'animal à l'Homme, 2012, Farbos
4. Kang, J.H., Y. Katayama, and F. Kondo, *Biodegradation or metabolism of bisphenol A: from microorganisms to mammals*. Toxicology, 2006. **217**(2-3): p. 81-90.
5. Nishikawa, M., et al., *Placental transfer of conjugated bisphenol A and subsequent reactivation in the rat fetus*. Environ Health Perspect, 2010. **118**(9): p. 1196-203.
6. Corbel, T., et al., *Bisphenol A disposition in the sheep maternal-placental-fetal unit: mechanisms determining fetal internal exposure*. Biol Reprod, 2013. **89**(1): p. 11.
7. Rubin, B.S. and A.M. Soto, *Bisphenol A: Perinatal exposure and body weight*. Mol Cell Endocrinol, 2009. **304**(1-2): p. 55-62.
8. Nagel, S.C., et al., *Relative binding affinity-serum modified access (RBA-SMA) assay predicts the relative in vivo bioactivity of the xenoestrogens bisphenol A and octylphenol*. Environ Health Perspect, 1997. **105**(1): p. 70-6.
9. OECD, *Test No. 440: Uterotrophic Bioassay in Rodents*: OECD Publishing.
10. Okuda, K., M. Takiguchi, and S. Yoshihara, *In vivo estrogenic potential of 4-methyl-2,4-bis(4-hydroxyphenyl)pent-1-ene, an active metabolite of bisphenol A, in uterus of ovariectomized rat*. Toxicol Lett, 2010. **197**(1): p. 7-11.
11. Collet, S.H., et al., *Estrogenicity of bisphenol a: a concentration-effect relationship on luteinizing hormone secretion in a sensitive model of prepubertal lamb*. Toxicol Sci, 2010. **117**(1): p. 54-62.
12. Gupta, C., *Reproductive malformation of the male offspring following maternal exposure to estrogenic chemicals*. Proc Soc Exp Biol Med, 2000. **224**(2): p. 61-8.
13. vom Saal, F.S., et al., *A physiologically based approach to the study of bisphenol A and other estrogenic chemicals on the size of reproductive organs, daily sperm production, and behavior*. Toxicol Ind Health, 1998. **14**(1-2): p. 239-60.
14. Ohsako, S., et al., *Maternal exposure to a low dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) suppressed the development of reproductive organs of male rats: dose-dependent increase of mRNA levels of 5alpha-reductase type 2 in contrast to decrease of androgen receptor in the pubertal ventral prostate*. Toxicol Sci, 2001. **60**(1): p. 132-43.
15. Ashby, J., et al., *The effect on sperm production in adult Sprague-Dawley rats exposed by gavage to bisphenol A between postnatal days 91-97*. Toxicol Sci, 2003. **74**(1): p. 129-38.
16. Mok-Lin, E., et al., *Urinary bisphenol A concentrations and ovarian response among women undergoing IVF*. Int J Androl, 2010. **33**(2): p. 385-93.
17. Howdeshell, K.L., et al., *Exposure to bisphenol A advances puberty*. Nature, 1999. **401**(6755): p. 763-4.
18. Markey, C.M., et al., *In utero exposure to bisphenol A alters the development and tissue organization of the mouse mammary gland*. Biol Reprod, 2001. **65**(4): p. 1215-23.
19. Rubin, B.S., et al., *Perinatal exposure to low doses of bisphenol A affects body weight, patterns of estrous cyclicity, and plasma LH levels*. Environ Health Perspect, 2001. **109**(7): p. 675-80.

20. Melzer, D., et al., *Association of urinary bisphenol a concentration with heart disease: evidence from NHANES 2003/06*. PLoS One, 2010. **5**(1): p. e8673.
21. Somm, E., et al., *Perinatal exposure to bisphenol a alters early adipogenesis in the rat*. Environ Health Perspect, 2009. **117**(10): p. 1549-55.
22. Zoeller, R.T., R. Bansal, and C. Parris, *Bisphenol-A, an environmental contaminant that acts as a thyroid hormone receptor antagonist in vitro, increases serum thyroxine, and alters RC3/neurogranin expression in the developing rat brain*. Endocrinology, 2005. **146**(2): p. 607-12.
23. Xu, X., et al., *Perinatal bisphenol A affects the behavior and SRC-1 expression of male pups but does not influence on the thyroid hormone receptors and its responsive gene*. Neurosci Res, 2007. **58**(2): p. 149-55.
24. Viguie, C., et al., *Maternal and fetal exposure to bisphenol a is associated with alterations of thyroid function in pregnant ewes and their newborn lambs*. Endocrinology, 2013. **154**(1): p. 521-8.
25. F. Rollin, *Troubles et management du nouveau-né chez les ruminants* Service de Médecine Interne des Grands Animaux Département des Sciences Cliniques des Grands Animaux Faculté de Médecine Vétérinaire Université de Liège
26. BYWATER (R.J.)-Aspects physiopathologiques des flux d'eau, du glucose et des ions dans l'intestin du veau. Journées G.T.V. le Donjon du 14 octobre 1977, Document Beecham, 35-39.
27. Toofanian, F., *Histological observations on the developing intestine of the bovine fetus*. Res Vet Sci, 1976. **21**(1): p. 36-40.
28. R. Zabielski, P. C. Gregory, B. Weström, *Biology of intestine in growing animals* Elsevier, 2002
29. Toofanian, F., F.W. Hill, and D.E. Kidder, *The development of the intestinal disaccharidase activities in the fetal and newborn calf*. Res Vet Sci, 1974. **16**(3): p. 375-81.
30. Guilloteau, P., et al., *Enzyme potentialities of the abomasum and pancreas of the calf. I.--Effect of age in the preruminant*. Reprod Nutr Dev, 1984. **24**(3): p. 315-25.
31. Pang, S.H. and C.A. Ernstrom, *Milk clotting activity in bovine fetal abomasa*. J Dairy Sci, 1986. **69**(12): p. 3005-7.
32. Guilloteau, P., et al., *Effects of age and weaning on enzyme activities of abomasum and pancreas of the lamb*. J Dairy Sci, 1983. **66**(11): p. 2373-85.
33. Le Huerou-Luron, I., et al., *Gastric and pancreatic enzyme activities and their relationship with some gut regulatory peptides during postnatal development and weaning in calves*. J Nutr, 1992. **122**(7): p. 1434-45.
34. Guilloteau, *Effect of age and weaning on development of digestive tract of lambs*. 1998
35. Hill KJ, *Gastric development and antibody transference in the lamb with some observations on the rat and guinea pig*, E. & S. Livingstone 1956
36. Baintner, *Vacuolation in the young*, 2003
37. Baintner, *Intestinal absorption of macromolecules and immune transmission from mother to young*, 1986
38. Guilloteau, P., R. Zabielski, and J.W. Blum, *Gastrointestinal tract and digestion in the young ruminant: ontogenesis, adaptations, consequences and manipulations*. J Physiol Pharmacol, 2009. **60 Suppl 3**: p. 37-46.
39. Brown, H.H. and H.W. Moon, *Localization and activities of lysosomal enzymes in jejunal and ileal epithelial cells of the young pig*. Am J Vet Res, 1979. **40**(11): p. 1573-7.

40. Stott, G.H. and A. Fellah, *Colostrum immunoglobulin absorption linearly related to concentration for calves*. J Dairy Sci, 1983. **66**(6): p. 1319-28.
41. EL-NAGEH, Siège de l'absorption intestinale des gammaglobulines du colostrum chez le veau nouveau né, 1967
42. LEVIEUX, The distribution of immunoglobulines in the intestine of the neonatal calf, 1978
43. Staley, T.E. and L.J. Bush, *Receptor mechanisms of the neonatal intestine and their relationship to immunoglobulin absorption and disease*. J Dairy Sci, 1985. **68**(1): p. 184-205.
44. EL NAGEH, Voies d'absorption des gammaglobulines du colostrum au niveau de l'intestin grêle du veau nouveau-né, 1967
45. Simister, N.E. and K.E. Mostov, *An Fc receptor structurally related to MHC class I antigens*. Nature, 1989. **337**(6203): p. 184-7.
46. Rodewald, R., *pH-dependent binding of immunoglobulins to intestinal cells of the neonatal rat*. J Cell Biol, 1976. **71**(2): p. 666-9.
47. Israel, E.J., et al., *Expression of the neonatal Fc receptor, FcRn, on human intestinal epithelial cells*. Immunology, 1997. **92**(1): p. 69-74.
48. Mayer, B., et al., *Redistribution of the sheep neonatal Fc receptor in the mammary gland around the time of parturition in ewes and its localization in the small intestine of neonatal lambs*. Immunology, 2002. **107**(3): p. 288-96.
49. Porter, P., *Structural and functional characteristics of immunoglobulins of the common domestic species*. Adv Vet Sci Comp Med, 1979. **23**: p. 1-21.
50. SALMON, Colostrum et immunité passive du jeune ruminant 1999
51. Wada-Hiraike, O., et al., *Role of estrogen receptor beta in colonic epithelium*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(8): p. 2959-64.
52. Wada-Hiraike, O., M. Warner, and J.A. Gustafsson, *New developments in oestrogen signalling in colonic epithelium*. Biochem Soc Trans, 2006. **34**(Pt 6): p. 1114-6.
53. Homma, H., et al., *The female intestine is more resistant than the male intestine to gut injury and inflammation when subjected to conditions associated with shock states*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2005. **288**(3): p. G466-72.
54. Braniste, V., et al., *Oestradiol decreases colonic permeability through oestrogen receptor beta-mediated up-regulation of occludin and junctional adhesion molecule-A in epithelial cells*. J Physiol, 2009. **587**(Pt 13): p. 3317-28.
55. O'Mahony, F. and B.J. Harvey, *Sex and estrous cycle-dependent rapid protein kinase signaling actions of estrogen in distal colonic cells*. Steroids, 2008. **73**(9-10): p. 889-94.
56. Bakker, J., et al., *Alpha-fetoprotein protects the developing female mouse brain from masculinization and defeminization by estrogens*. Nat Neurosci, 2006. **9**(2): p. 220-6.
57. Grumbach, M.M., *The neuroendocrinology of human puberty revisited*. Horm Res, 2002. **57 Suppl 2**: p. 2-14.
58. Lai, P.C., et al., *Fetal-maternal distribution of ovine alpha-fetoprotein*. Am J Physiol, 1978. **235**(1): p. E27-31.
59. Milligan, S.R., O. Khan, and M. Nash, *Competitive binding of xenobiotic oestrogens to rat alpha-fetoprotein and to sex steroid binding proteins in human and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) plasma*. Gen Comp Endocrinol, 1998. **112**(1): p. 89-95.
60. Lee, Y.J., et al., *Maternal and fetal exposure to bisphenol A in Korea*. Reprod Toxicol, 2008. **25**(4): p. 413-9.
61. Padmanabhan, V., et al., *Maternal bisphenol-A levels at delivery: a looming problem?* J Perinatol, 2008. **28**(4): p. 258-63.

62. Schonfelder, G., et al., *Parent bisphenol A accumulation in the human maternal-fetal-placental unit*. Environ Health Perspect, 2002. **110**(11): p. A703-7.
63. Wan, Y., et al., *Hydroxylated polybrominated diphenyl ethers and bisphenol A in pregnant women and their matching fetuses: placental transfer and potential risks*. Environ Sci Technol, 2010. **44**(13): p. 5233-9.
64. Pretheeban, M., et al., *Ontogenesis of UDP-glucuronosyltransferase enzymes in sheep*. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 2011. **159**(2): p. 159-66.
65. Tomoda, S., R.A. Brace, and L.D. Longo, *Amniotic fluid volume and fetal swallowing rate in sheep*. Am J Physiol, 1985. **249**(1 Pt 2): p. R133-8.

Toulouse, 2014

**NOM** : MONTAGNE

**PRENOM** : CANDICE

**TITRE** : EFFETS D'UNE EXPOSITION PRENATALE A UN POLLUANT, LE BISPHENOL A, SUR LA TRANSMISSION DE L'IMMUNITE COLOSTRALE CHEZ L'AGNEAU

**RESUME**: A faibles doses le BPA, contaminant alimentaire, peut agir sur les ER $\beta$  et altérer la perméabilité colique passive paracellulaire chez l'adulte. Notre hypothèse est qu'une exposition *in utero* aurait un impact sur la fonctionnalité de la barrière digestive dans les premières heures de vie. Pour répondre à cette question, nous avons utilisé le modèle ovin qui par sa placentation est peu compatible avec un passage transplacentaire de macromolécule type immunoglobulines. Il sera donc aisé de caractériser l'absorption des immunoglobulines dans les premières heures de vie de l'agneau et d'estimer s'il y a une altération de la barrière digestive. Chez l'Homme le phénomène d'acquisition de l'immunité passive est présent essentiellement chez les enfants prématurés.

L'exposition *in utero* de BPA n'a pas eu d'effets sur l'acquisition de l'immunité passive chez l'agneau. Cependant il reste encore à déterminer si le traitement n'a vraiment aucun effet sur la barrière digestive ou bien s'il y a un effet du traitement qui est masqué par le processus d'élimination.

**MOTS-CLES**: BISPHENOL A, BPA, AGNEAU, IMMUNITE PASSIVE

---

**ENGLISH TITLE**: EFFECTS OF PRENATAL EXPOSURE AT A POLLUANT, THE BISPHENOL A, ON THE TRANSFERT OF THE COLOSTRAL IMMUNITY ON LAMB

**ABSTRACT**: A low-dose BPA, a food contaminants, may act on ER $\beta$  and altered passive colonic paracellular permeability in adults. Our hypothesis is that an exposition *in utero* may have an impact on the functionality of the digestive barrier in the first hours of life. To answer this question, we used the sheep model which by its placentation does not allow placental transfer of macromolecule such as immunoglobulins. It will be easy to characterize the absorption of immunoglobulins in the first hours of life of the lamb and estimate whether there is an alteration of the digestive barrier. In humans the acquisition of passive immunity is present primarily in premature infants.

*In utero* exposure to BPA had no effect on the acquisition of passive immunity in lambs. However, it remains to determine whether the treatment has really no effect on the digestive barrier or if there is an effect masked by the process of elimination.

**KEYWORDS**: BISPHENOL A, BPA, LAMB, PASSIVE IMMUNITY