

# EFFET DU BISPHENOL S SUR LE METABOLISME ENERGETIQUE FŒTAL ET INTERACTION AVEC LE STATUT METABOLIQUE DE LA BREBIS

---

THESE

pour obtenir le titre de  
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

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

*par*

**COLIN Margault**

Née le 10/07/1997 à REIMS (51)

Et

**COMBES Marie-Cerguine**

03/06/1996 à PERPIGNAN (66)

**Directrice de thèse : Mme Nicole HAGEN**

---

**JURY**

PRESIDENT :

**M. Roger LEANDRI**

Professeur à l'Université Paul Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURES :

**Mme Nicole HAGEN**  
**Mme Véronique GAYRARD**

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

**Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation  
ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE**

**Liste des directeurs/assesseurs de thèse de doctorat vétérinaire**

**Directeur : Professeur Pierre SANS**

**PROFESSEURS CLASSE  
EXCEPTIONNELLE**

- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Pharmacologie, thérapeutique*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et industrie des aliments d'origine animale*
- Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, statistiques, modélisation*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la reproduction, endocrinologie*
- Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du bétail et des animaux de basse-cour*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie médicale animale et comparée*

**PROFESSEURS 1<sup>ère</sup> CLASSE**

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et industrie des aliments*
- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, anatomie pathologique*
- Mme **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie vétérinaire*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootéchnie*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Aviculture et pathologie aviaire*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- Mme **LACROUX Caroline**, *Anatomie pathologique, animaux d'élevage*
- Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et thérapeutique*
- M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des ruminants*

**PROFESSEURS 2<sup>ème</sup> CLASSE**

- Mme **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
- M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des équidés et des carnivores*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et toxicologie*
- Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation animale*
- M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, imagerie médicale*
- Mme **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles*
- M. **RABOISSON Didier**, *Médecine de population et économie de la santé animale*

## **MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE**

- M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la reproduction*
- Mme **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et industrie des denrées alimentaires d'origine animale*
- Mme **CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
- M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et toxicologie*
- M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et mathématiques*
- M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
- Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*
- M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et infectiologie*

## **MAITRES DE CONFERENCES CLASSE NORMALE**

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **BRET Lydie**, *Physique et chimie biologiques et médicales*
- Mme **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*
- M. **CARTIAUX Benjamin**, *Anatomie, imagerie médicale*
- M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
- Mme **DANIELS Hélène**, *Immunologie, bactériologie, pathologie infectieuse*
- Mme **DAVID Laure**, *Hygiène et industrie des aliments*
- M. **DIDIMO IMAZAKI Pedro**, *Hygiène et industrie des aliments*
- M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie vétérinaire et comparée*
- Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie*
- Mme **GRANAT Fanny**, *Biologie médicale animale*
- Mme **JOURDAN Géraldine**, *Anesthésie, analgésie*
- M. **JOUSSERAND Nicolas**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
- Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des équidés*
- Mme **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
- M. **LE LOC'H Guillaume**, *Médecine zoologique et santé de la faune sauvage*
- M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **MILA Hanna**, *Elevage des carnivores domestiques*
- M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **VERGNE Timothée**, *Santé publique vétérinaire, maladies animales réglementées*
- Mme **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

## **INGENIEURS DE RECHERCHE**

- M. **AUMANN Marcel**, *Urgences, soins intensifs*
- M. **AUVRAY Frédéric**, *Santé digestive, pathogénie et commensalisme des entérobactéries*
- M. **CASSARD Hervé**, *Pathologie des ruminants*
- M. **CROVILLE Guillaume**, *Virologie et génomique cliniques*
- Mme **DEBREUQUE Maud**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
- Mme **DIDIER Caroline**, *Anesthésie, analgésie*
- Mme **DUPOUY GUIRAUTE Véronique**, *Innovations thérapeutiques et résistances*
- Mme **GAILLARD Elodie**, *Urgences, soins intensifs*
- Mme **GEFFRE Anne**, *Biologie médicale animale et comparée*
- Mme **GRISZ Christelle**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- Mme **JEUNESSE Elisabeth**, *Bonnes pratiques de laboratoire*
- Mme **PRESSANTI Charline**, *Dermatologie vétérinaire*
- M. **RAMON PORTUGAL Félipe**, *Innovations thérapeutiques et résistances*
- M. **REYNOLDS Brice**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
- Mme **ROUCH BUCK Pétra**, *Médecine préventive*

# Remerciements

## **A Monsieur le Professeur Roger LEANDRI**

Du CHU de Toulouse (UFR de médecine Rangueil de l'université Toulouse III),  
*Biologie de la reproduction,*

Pour nous avoir fait l'honneur de présider notre jury de thèse,

Hommages respectueux.

## **A Madame la Professeur Nicole HAGEN-PICARD**

De l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse (ENVT), *Pathologie de la reproduction,*

Pour nous avoir encadrées et guidées tout au long de ce travail,

Pour sa disponibilité et ses conseils,

Qu'elle trouve ici le témoignage de notre reconnaissance et de notre respect le plus sincère.

## **A Madame la Professeur Véronique GAYRARD**

De l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse (ENVT), *Physiologie de la reproduction,*  
*endocrinologie,*

Pour avoir accepté de juger ce travail et de faire partie de ce jury de thèse,

Sincères remerciements.



# Table des matières

Remerciements.....	4
Table des matières .....	6
Liste des abréviations.....	10
Table des tableaux .....	12
Table des figures .....	14
1. Introduction.....	17
2. Matériels et méthodes .....	20
2.1. Hébergement des brebis, allotement et alimentation .....	20
2.2. Suivi des brebis : poids et note d'état corporel (NEC).....	20
2.3. Mise à la reproduction.....	21
2.4. Exposition au BPS .....	22
2.5. Matériels utilisés.....	22
2.6. Prélèvement sanguins maternels au cours de la gestation .....	23
2.7. Chirurgies : cathétérisme artério-veineux foetal .....	23
2.7.1. Anesthésie et antibio-prophylaxie .....	24
2.7.2. Préparation à l'intervention chirurgicale .....	24
2.7.3. Chirurgie .....	24
2.8. Challenge hyperglycémique foetal.....	27
2.9. Dosage des marqueurs métaboliques.....	28
2.10. Euthanasie et prélèvements sanguins et d'organes.....	29
2.11. Dosage du BPS-glucuronide.....	29
2.12. Analyse des données.....	30
3. Résultats.....	32
3.1. Caractéristiques des brebis et des foetus ovins .....	32
3.2. Exposition au BPS et au BPS-glucuronide au cours de la gestation..	33

3.2.1. Evolution temporelle des concentrations plasmatiques maternelles en BPS et BPS-glucuronide .....	33
3.2.2. Exposition fœtale au BPS et BPS-glucuronide .....	33
3.3. Evolution temporelle du poids et de la note d'état corporel des brebis au cours de la gestation.....	34
3.3.1. Poids corporel des brebis avant traitement.....	34
3.3.2. Evolution temporelle du poids corporel des brebis au cours de la gestation	35
3.3.3. Evolution temporelle des GMQ des brebis au cours de la gestation	36
3.3.4. Evolution temporelle des NEC des brebis au cours de la gestation	38
3.4. Suivi des marqueurs métaboliques maternels au cours de la gestation	39
3.4.1. Variation des $\beta$ -OH au cours de la gestation .....	39
3.4.2. Variation des AGNE plasmatiques au cours de la gestation.....	41
3.4.3. Variation de la glycémie au cours de la gestation.....	43
3.4.4. Variation de l'insulinémie au cours de la gestation .....	44
3.5. Analyse des paramètres morphologiques fœtaux.....	46
3.5.1. Effet du cathétérisme fœtal.....	46
3.5.2. Paramètres pondéraux fœtaux .....	46
3.6. Réponse à l'hyperglycémie fœtale.....	49
3.6.1. Analyse de la gazométrie fœtale .....	50
3.6.2. Analyses des réponses glycémique et insulinémique fœtales à un challenge hyperglycémique.....	51
3.6.3. Détermination de la période basale et du plateau hyperglycémique	52
3.6.4. Glycémie et insulinémie basales.....	53
3.6.5. Glycémie et insulinémie fœtales lors du challenge hyperglycémique	54

4. Discussion .....	56
Conclusion .....	62
Références bibliographiques .....	63





## Liste des abréviations

AGNE : Acides gras non estérifiés

ANOVA : analyse de la variance

ANR : Agence nationale de la recherche

BPA : Bisphénol A

BPS : Bisphénol S

BPS-G : Bisphénol S-glucuronide

CO<sub>2</sub> : dioxyde de carbone

DJA : Dose journalière admissible

eCG : Equine chorionic gonadotropin (Gonadotrophine chorionique équine)

ECHA : Agence européenne des produits chimiques

EFSA : Autorité Européenne de Sécurité des Aliments

ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay (technique immuno-enzymatique sur support solide)

ET : écart-type

F : femelle

GD : Gestation day (âge gestationnel)

GMQ : Gain Moyen Quotidien

IM : intramusculaire

IV : intraveineux

LA : liquide amniotique

M : mâle

MAT : Matière azotée totale

NaCl : Chlorure de sodium

NEC : Note d'Etat Corporel

NS : non significatif

O<sub>2</sub> : oxygène

PAF : Para-formaldéhyde

PBS : tampon phosphate salin

PE- : perturbateur endocrinien

PO : Per os (voie orale)

PO<sub>2</sub> : pression partielle en oxygène du sang

PV : poids vif

RL : Ringer lactate

SC : Sous-cutané

tHb: taux d'hémoglobine

UPLC-MS/MS : ultra-high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry - chromatographie liquide ultra performante, associée à la spectrométrie de masse

UI : Unité internationale

$\beta$ -OH : bêta hydroxybutyrate

## Table des tableaux

Tableau 1 : Répartition des brebis gravides en fonction des périodes de mises à la reproduction et des groupes (statut physiologique, maigres ou grasses) ou traitement (solvant, BPS), (ND=Non Déterminé). ..... 21

Tableau 2 : Répartition des brebis gravides et identification du sexe des fœtus cathétérisés en fonction du nombre de fœtus et du statut métabolique des brebis, maigres ou grasses ou du traitement (solvant, BPS). Pour deux brebis mortes lors de l'anesthésie, le nombre de fœtus n'a pas été évalué (ND=Non déterminé). ..... 32

Tableau 3 : Poids corporels (moyennes  $\pm$  ET, [étendue] ; kg) des 43 brebis entre 28 et 36 jours de gestation, au moment de l'inclusion dans les groupes en fonction du traitement et du statut métabolique (BPS (11 maigres, 11 grasses), solvant (11 maigres, 10 grasses)). ..... 34

Tableau 4 : Gains Moyens Quotidiens (moyennes  $\pm$  ET, [étendue] ; g/j) des 43 brebis à différentes périodes de la gestation à GD-14-36j (GMQ1), GD28-92j (GMQ2) et GD83-121j (GMQ3) en fonction du traitement et du statut métabolique (BPS (11 maigres, 11 grasses), solvant (11 maigres, 10 grasses)) et du type de gestation (simple, multiple). ..... 37

Tableau 5 : Gains Moyens Quotidiens (moyennes  $\pm$  ET, [étendue] ; g) des 21 brebis à gestation gémellaire à GD-14-36j (GMQ1), GD28-92j (GMQ2), GD83-121j (GMQ3) en fonction du traitement et du statut métabolique (BPS (5 maigres, 7 grasses), solvant (5 maigres, 4 grasses)). ..... 38

Tableau 6 Notes d'État Corporel (moyennes  $\pm$  ET, [étendue]) des 43 brebis à -16-30j (NEC1), 30-90j (NEC2), 90-126j de gestation (NEC3) en fonction du traitement et du statut métabolique (BPS (11 maigres, 11 grasses), solvant (11 maigres, 10 grasses)) et du type de gestation (simple, multiple). ..... 39

Tableau 7 : Concentrations sanguines en  $\beta$ -OH (moyenne  $\pm$  ET ; mmol/L) des 43 brebis à 49 ( $\beta$ -OH1), 77 ( $\beta$ -OH2) et 104 jours de gestation ( $\beta$ -OH3) en fonction du traitement et du statut métabolique (BPS (11 maigres, 11 grasses), solvant (11 maigres, 10 grasses)). ..... 39

Tableau 8 : Concentrations sanguines en  $\beta$ -OH (moyenne  $\pm$  ET ; mmol/L) des 43 brebis à 49 ( $\beta$ -OH1), 77 ( $\beta$ -OH2) et 104 jours de gestation ( $\beta$ -OH3) en fonction du traitement et du type de gestation (BPS (8 simples, 14 multiples), solvant (7 simples, 14 multiples)). ..... 39

Tableau 9 : Concentrations des AGNE plasmatiques (moyenne $\pm$ ET ; mmol/l) des 43 brebis à 34 (AGNE1), 63 (AGNE2), 90 (AGNE3) et 132 jours de gestation (AGNE4) en fonction du traitement et du statut métabolique (BPS (11 maigres, 11 grasses), solvant (11 maigres, 10 grasses)).....	41
Tableau 10 : Concentrations des AGNE plasmatiques (moyenne $\pm$ ET ; mmol/L) des 43 brebis à 34 (AGNE1), 63 (AGNE2), 90 (AGNE3) et 132 jours de gestation (AGNE4) en fonction du traitement et du type de gestation (BPS (8 simples, 14 multiples), solvant (7 simples, 14 multiples)).....	42
Tableau 11 : Glycémies (moyenne $\pm$ ET ; g/L) des 43 brebis à 118 (Glycémie 2) et 132 jours de gestation (Glycémie 3) en fonction du traitement et du statut métabolique (BPS (11 maigres, 11 grasses), solvant (11 maigres, 10 grasses)).....	43
Tableau 12 : Glycémies (moyenne $\pm$ ET ; g/L) des 43 brebis à 118 (Glycémie 2) et 132 jours (Glycémie 3) de gestation en fonction du traitement et de la portée (BPS (8 simples, 14 multiples), solvant (7 simples, 14 multiples)).....	43
Tableau 13 : Insulinémies (moyenne $\pm$ ET ; ng/mL) des 43 brebis à 29-30j (Insulinémie 1), 61-63j (Insulinémie 2), 90-92j (Insulinémie 3) et au moment de l'abattage à 133-135j de gestation (Insulinémie 4) en fonction du traitement et du statut métabolique (BPS (11 maigres, 11 grasses), solvant (11 maigres, 10 grasses)).....	44
Tableau 14 : Insulinémies (moyenne $\pm$ ET ; ng/mL) des 43 brebis à 29-30j (Insulinémie 1), 61-63j (Insulinémie 2), 90-92j (Insulinémie 3) et au moment de l'abattage à 133-135j (Insulinémie 4) en fonction du traitement et du type de gestation (BPS (8 simples, 14 multiples), solvant (7 simples, 14 multiples)).....	45
Tableau 15 : Répartition des fœtus cathétérisés en fonction de leur sexe et de la taille de portée et des groupes (statut physiologique, maigres ou grasses) ou traitement (solvant, BPS).....	49
Tableau 16 : Gaz du sang (moyenne $\pm$ ET) des 14 fœtus cathétérisés issus de gestation gémellaires et inclus dans l'analyse du test hyperglycémique en fonction du type de traitement et du statut métabolique.....	50

## Table des figures

Figure 1 : Comparaison des structures physico-chimiques de l'œstradiol, du BPA, du BPS et du BPS glucuronide (BPS-G), caractérisée par un groupement phénol. . 18

Figure 2 : Concentrations plasmatiques en BPS-G (moyennes  $\pm$  ET ; ng/mL) des 22 brebis du groupe exposé au BPS, à 49, 77, 105 et 132 jours de gestation, en fonction du statut métabolique (11 maigres ; 11 grasses). ..... 33

Figure 3 : Concentrations plasmatiques (moyenne  $\pm$  ET ; ng/mL) maternelles (n=22), fœtales (Fœtus 1, n=20 ; Fœtus 2, n=13), du liquide amniotique (LA F1, n=21 ; LA F2, n=14) et rapport des concentrations plasmatiques entre le fœtus et sa mère en BPS-G (11 maigres, 11 grasses) ..... 34

Figure 4 : Poids corporels (moyennes  $\pm$  ET ; kg) des 4 » brebis de -28 à -20 jours avant la mise à la reproduction jusqu'à +118 à +121 jours de gestation en fonction du traitement et du statut métabolique (BPS (11 maigres, 11 grasses), solvant (11 maigres, 10 grasses)). ..... 35

Figure 5 : Poids corporels (moyennes  $\pm$  ET ; kg) des 21 brebis de -28 à -20 jours avant la mise à la reproduction jusqu'à +118 à +121 jours de gestation gémellaire, en fonction du traitement et du statut métabolique (BPS (5 maigres, 7 grasses), solvant (5 maigres, 4 grasses)). ..... 36

Figure 6 : Concentrations sanguines en  $\beta$ -OH (moyenne  $\pm$  ET ; mmol/L) des 21 brebis à 49 ( $\beta$ -OH1), 77 ( $\beta$ -OH2) et 104 jours ( $\beta$ -OH3) de gestation gémellaire en fonction du traitement et du statut métabolique (BPS (5 maigres, 7 grasses), solvant (5 maigres, 4 grasses)). ..... 40

Figure 7 : Différences de concentrations sanguines en  $\beta$ -OH (moyenne  $\pm$  ET ; mmol/L) sur les 43 brebis entre le dernier trimestre de gestation ( $\beta$ -OH 3 = GD104) et le début ( $\beta$ -OH 1 = GD49) ou le milieu de la gestation ( $\beta$ -OH 2 = GD77), en fonction du traitement et du statut métabolique (BPS (11 maigres, 11 grasses), solvant (11 maigres, 10 grasses)). ..... 41

Figure 8 : Concentrations des AGNE plasmatiques (moyenne  $\pm$  ET ; mmol/L) des 21 brebis à gestation gémellaire à 34 (AGNE1), 63 (AGNE2), 90 (AGNE3) et 132 jours (AGNE4), en fonction du traitement et du statut métabolique (BPS (5 maigres, 7 grasses), solvant (5 maigres, 4 grasses)). ..... 42

Figure 9 : Glycémies (moyenne  $\pm$  ET ; g/L) des 21 brebis à gestation gémellaire à 118 (Glycémie 2) et 132 jours (Glycémie 3) en fonction du traitement et du statut métabolique (BPS (5 maigres, 7 grasses), solvant (5 maigres, 4 grasses))..... 44

Figure 10 : Insulinémies (moyenne $\pm$ ET ; g/L) des 21 brebis à gestation gémellaire, à 29-30 jours (Ins 1), à 61-63 jours (Ins 2), à 90-92 jours (Ins 3) et au moment de l'abattage à 133-135 jours de gestation (Ins 4) en fonction du traitement et du statut métabolique (BPS (5 maigres, 7 grasses), solvant (5 maigres, 4 grasses)).....	45
Figure 11 : Insulinémies (moyenne $\pm$ ET ; ng/mL) sur 21 brebis à gestation gémellaire à 29-30 jours (Insulinémie 1), 61-63 jours (Insulinémie 2), 90-92 jours (Insulinémie 3) et au moment de l'abattage à 133-135 jours de gestation (Insulinémie 4), en fonction du statut métabolique (11 grasses, 10 maigres).....	46
Figure 12 : Poids fœtaux (moyenne $\pm$ ET ; kg ; n=75) en fonction du traitement et du statut métabolique des mères (BPS (11 maigres, 11 grasses), solvant (11 maigres, 10 grasses)), du sexe fœtal (37 femelles, 38 mâles) et du nombre de fœtus dans la portée (1,2,3). ....	47
Figure 13 : Poids des 42 fœtus issus de gestation gémellaire (moyenne $\pm$ ET ; kg) en fonction du traitement et du statut métabolique des mères (BPS (10 maigres, 14 grasses), solvant (10 maigres, 8 grasses)), du sexe fœtal (24 femelles, 18 mâles). ....	48
Figure 14 : Taux de perfusion de glucose (moyenne $\pm$ ET ; mg/kg/min ; n=14) rapportés au poids du fœtus au cours du challenge hyperglycémique pour les fœtus cathétérisés issus de gestation gémellaire et normoxémiques, en fonction du statut métabolique et du traitement (solvant (2 de mère maigre et 3 de mère grasse), BPS (5 de mère maigre et 4 de mère grasse)).....	51
Figure 15 : Glycémie fœtale (moyenne ; g/L) au cours de l'épreuve hyperglycémique chez 14 fœtus cathétérisés issus de gestation gémellaire et normoxémiques en fonction du statut métabolique et du traitement (solvant (2 maigres, 3 grasses), BPS (5 maigres, 4 grasses)).....	52
Figure 16 : Insulinémie fœtale (moyenne ; ng/mL) au cours de l'épreuve hyperglycémique chez 14 fœtus cathétérisés issus de gestation gémellaire et normoxémiques en fonction du statut métabolique et du traitement (solvant (2 maigres, 3 grasses), BPS (5 maigres, 4 grasses)). ....	53
Figure 17 : Glycémie fœtale (moyenne $\pm$ ET ; g/L) en période basale chez les 14 fœtus cathétérisés issus de gestation gémellaire et normoxémiques en fonction du statut métabolique et du traitement (solvant (2 maigres, 3 grasses), BPS (5 maigres, 4 grasses)).....	53
Figure 18 : Insulinémie fœtale (moyenne $\pm$ ET ; ng/mL) en période basale chez les 14 fœtus cathétérisés issus de gestation gémellaire et normoxémiques en fonction du	

statut métabolique et du traitement (solvant (2 maigres, 3 grasses), BPS (5 maigres, 4 grasses))..... 54

Figure 19 : Glycémie fœtale (moyenne  $\pm$  ET ; g/L) lors du challenge hyperglycémique chez les 14 fœtus cathétérisés issus de gestation gémellaire et normoxémiques en fonction du statut métabolique et du traitement (solvant (2 maigres, 3 grasses), BPS (5 maigres, 4 grasses)). ..... 55

Figure 20 : Insulinémie fœtale (moyenne  $\pm$  ET ; ng/mL) lors du challenge hyperglycémique chez les 14 fœtus cathétérisés issus de gestation gémellaire et normoxémiques en fonction du statut métabolique et du traitement (solvant (2 maigres, 3 grasses), BPS (5 maigres, 4 grasses)) ..... 55



## 1. Introduction

Le Bisphénol A (BPA, (2,2-bis-(4-hydroxyphenyl)-propane, CAS Registry No. 80-05-7) présente une structure chimique incluant deux cycles phénols (Figure 1a); Au XIX<sup>ème</sup> siècle, compte tenu de ses propriétés œstrogénomimétiques, il a fait l'objet de nombreuses études pour son utilisation comme contraceptif. C'est en 1953 qu'il a été utilisé dans l'industrie plasturgique lorsque la société Bayer (H. Schnell, L. Bottenbruch et H. Krimm) a synthétisé, à partir de monomères de BPA, un polymère de plastique appelé polycarbonate (1). Le BPA a par la suite été produit à plus de 3 millions de tonnes par an et utilisé dans la fabrication de nombreux plastiques, contenants alimentaires, équipements médicaux, lentilles de vision, papiers à impression thermique (tickets de caisse), composants électroniques, etc... (2)

En 2006, l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (EFSA) a évalué la dose journalière admissible (DJA) du BPA à 50 µg/kg de poids corporel par jour, sur la base d'études toxicologiques chez les rongeurs, montrant des effets systémiques à la plus petite dose de 5 mg/kg/jour et en prenant en compte un facteur de sécurité de 100. Cependant, de nombreuses études ont démontré des effets néfastes pour une exposition au BPA inférieure à la DJA, sur des modèles animaux. Son utilisation a donc été interdite en Europe, dans les contenants alimentaires. Le BPA a ainsi été reconnu en 2017, comme perturbateur endocrinien (PE) par l'agence européenne des produits chimiques (ECHA) pour ses effets sur la fonction de reproduction et sur l'environnement (5). Des études expérimentales et de biosurveillance ont montré son implication dans le développement de maladies chroniques telles que le diabète de type II, l'asthme, des cancers et des troubles de la fécondité (3). Il a ainsi été observé qu'une exposition prolongée au BPA induit le développement d'une résistance insulinaire à l'origine d'effets obésogènes et reprotoxiques (4).

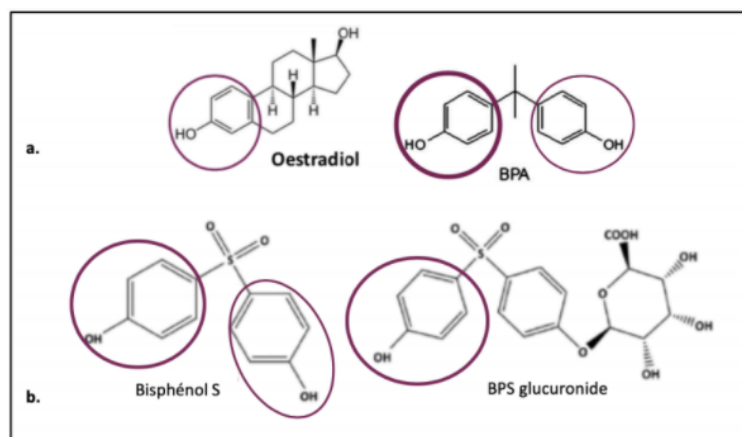


Figure 1 : Comparaison des structures physico-chimiques de l'oestradiol, du BPA, du BPS et du BPS glucuronide (BPS-G), caractérisée par un groupement phénol.

Suite aux restrictions de l'utilisation du BPA dans les contenants alimentaires ou les papiers thermiques, de nouveaux plastiques « BPA-free » ont été produits par l'industrie plasturgique à partir d'analogues du BPA tels que les bisphénols S, F et AF (6).

Le Bisphénol S (BPS, bis-(4-hydroxyphenyl)-sulfone ; CAS Registry No. 80-09-1) se distingue du BPA par un groupement sulfonyle (Figure 1b) qui lui confère une stabilité thermique et une résistance à la lumière plus élevées (7). Il a remplacé partiellement le BPA dans ses applications industrielles et on le retrouve aujourd'hui dans les contenants alimentaires, la vaisselle, les résines époxy, les cosmétiques, le papier thermique, les billets de banque, les journaux, etc (3). La production et/ou l'importation de BPS dans la zone économique européenne est estimée par l'ECHA entre 10 000 et 100 000 tonnes par an. L'exposition quotidienne de l'homme au BPS est donc inévitable et l'alimentation constitue la voie principale, devant l'inhalation et la voie transcutanée (8).

Comme pour le BPA, la voie majoritaire d'élimination du BPS est le métabolisme hépatique. Ces substances sont éliminées essentiellement via leur transformation en BPS-glucuronide (BPS-G, Figure 1b), métabolite inactif excrété majoritairement dans les urines. Aux Etats-Unis, une étude de biosurveillance sur plus de 600 échantillons urinaires humains, recueillis entre 2000 et 2014, a montré une augmentation significative de la fréquence de détection et de la concentration urinaire en BPS-G (9).

Cependant, différentes études in-vitro ont montré que le BPS présente lui aussi une activité oestrogénomimétique et anti-androgénique (5, 7), ce qui suggère que le BPS pourrait ne pas être une alternative sécuritaire à l'utilisation du BPA. En outre, la détection de BPS dans le sang de cordon ombilical de nouveau-nés démontre le passage transplacentaire du BPS (10). Par ailleurs, chez les souris mâles, une

exposition *in utero* au BPS entraîne une altération de la spermatogenèse à l'âge adulte ainsi que des effets transgénérationnels (11). Chez les femelles, l'exposition prénatale au BPS a entraîné un avancement de l'âge de la puberté, une altération de la régularité des cycles hormonaux et de la fertilité. Une exposition *in vitro* des complexes cumulus-ovocyte ovins à de faibles doses de BPS entraîne une altération de la maturation ovocytaire et une diminution du taux de blastocystes (12). Par ailleurs, comme précédemment montré pour le BPA, le BPS induit une altération du métabolisme glucidique et lipidique chez les rongeurs. Ainsi, une exposition périnatale au BPS induit un syndrome de résistance à l'insuline chez les souris, ce qui pourrait expliquer l'effet obésogène du BPS (13–16).

Cependant, il existe peu d'études *in-vivo* concernant les potentiels effets néfastes du BPS sur la santé humaine et ses possibles interactions avec le statut métabolique.

Dans ce contexte, le projet Mambo intitulé « Impact du métabolisme sur les effets ovariens du bisphénol S » (ANR CES coordonné par S. Elis, INRAE, PRC) vise à évaluer les impacts du BPS sur la reproduction de la femme et les interactions avec le statut métabolique. Notre thèse a pour objectif d'évaluer l'effet du BPS à faible dose sur le métabolisme énergétique fœtal, notamment la réponse insulinaire à une hyperglycémie, et ses interactions avec le statut métabolique maternel.

Nous avons émis l'hypothèse selon laquelle **un déséquilibre métabolique maternel pourrait augmenter la sensibilité au BPS et altérer le métabolisme fœtal évalué via sa réponse insulinaire à une hyperglycémie.**

Pour cela, le modèle ovin a été choisi pour sa similitude vis-à-vis de l'homme concernant la physiologie de la gestation. En effet, sur le modèle ovin comme chez l'homme, le foie fœtal présente un métabolisme limité en début de gestation. De plus, la maturation fonctionnelle des cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans du pancréas, responsables de la sécrétion de l'insuline, se fait majoritairement au cours de la gestation, de même que le développement de la réponse insulinaire à l'hyperglycémie. La gestation chez ces deux espèces requiert une production importante de glucose par néoglucogenèse et transport actif jusqu'à l'unité fœtale à travers le placenta. Ovins et humains développent donc naturellement une résistance à l'insuline liée à la gestation afin de créer un gradient de concentration du glucose en faveur du transport transplacentaire vers le fœtus. L'origine de ce glucose constitue la principale différence entre les deux espèces : en effet, il provient majoritairement de l'énergie ingérée chez

l'homme tandis qu'il est issu d'acides gras volatiles produits par la flore ruminale pour l'espèce ovine. Cependant, durant la période périnatale, les fœtus sont considérés comme des mammifères monogastriques plutôt que comme des ruminants (17).

Pour tester notre hypothèse selon laquelle le statut métabolique des mères pourrait interférer avec l'exposition au BPS *in utero*, les statuts métaboliques des mères ont été contrôlés par des régimes alimentaires bas et hauts en énergie. Les brebis gravides ont été exposées quotidiennement de 33 à 135 jours de gestation au BPS à la dose de 50 µg/kg correspondant à la DJA établie par l'EFSA pour le BPA. Au cours de la gestation, différents marqueurs métaboliques maternels ont été évalués régulièrement. Après instrumentation par cathétérisme artériovoineux du fœtus ovin en fin de gestation, le métabolisme glucidique fœtal a été évalué à travers la réponse insulinique fœtale à un challenge hyperglycémique.

## **2. Matériels et méthodes**

Toutes les procédures concernant les animaux ont été effectuées dans le respect du bien-être animal dans le cadre de de l'agrément de la structure expérimentale n°31-2011-142 du ministère de l'Agriculture. Le protocole a été approuvé par le comité régional d'éthique (n°APAFIS 23515-2020010814364558 v4).

### **2.1. Hébergement des brebis, allotement et alimentation**

Quarante-huit brebis primipares de race Ile-de-France, primipares, âgées de 800 jours en moyenne, provenant de l'UEPAO (Unité Expérimentale de Physiologie Animale de l'Orfrasière) de Nouzilly sont arrivées à l'école vétérinaire de Toulouse les 20 et 22 août 2019. Elles ont été réparties dans 4 boxes en fonction de leur état d'engraissement, maigres (NEC = [2 ; 2.5], Russel et al 1969 (21) ou grasses (NEC = [3 ; 3.5]). 28 à 77 jours avant la mise à la reproduction, elles ont reçu un régime alimentaire différencié comprenant un aliment concentré distribué deux fois par jour (matin : de 7h30 à 9h00 ; après-midi : de 15h30 à 18h) : 350 g/j d'un aliment composé de 25% de MAT pour les brebis maigres, 1kg/j d'un aliment à 18% de MAT pour les brebis grasses. Toutes les brebis ont reçu de la paille à volonté et un aliment minéral vitaminé 10/6/6 distribué le matin, adapté pour les femelles gravides (20 g/j).

### **2.2. Suivi des brebis : poids et note d'état corporel (NEC)**

Les brebis gravides ont été pesées (balance Salter Brecknell LS300©) toutes les semaines, pour adapter les régimes alimentaires et la dose de BPS à administrer à l'évolution de leur poids corporel et leur NEC a été évaluée tous les 12 à 23 jours. Les NEC ont été évaluées par le même opérateur selon la grille de notation d'état corporel des brebis de 0 à 5 selon Russel et al (1969) (21).

### 2.3. Mise à la reproduction

Les mises à la reproduction ont été réalisées sur 4 périodes (définissant les 4 lots de, respectivement, 15 brebis, 15 brebis, 12 brebis, 6 brebis + 5 brebis vides de la 1<sup>ère</sup> et 2<sup>ème</sup> période), toutes les 2 à 3 semaines, après une synchronisation des chaleurs avec des éponges d'acétate de fluorogestone (*Synchro-Part*®, CEVA SANTE ANIMALE, 33500 LIBOURNE) et 400 UI d'eCG (CEVA SANTE ANIMALE, 33500 LIBOURNE) puis une lutte naturelle (4 béliers pour chaque lot). Pour chaque lot de mise à la reproduction, les 45 brebis, grasses et maigres, diagnostiquées gravides à 30 jours ont été appariées par statut métabolique et poids et réparties aléatoirement dans les groupes solvant et BPS (Tableau 1). Les brebis ont ensuite été placées dans des boxes (10 à 12 brebis par box) par groupe de régime alimentaire et par traitement : maigres/solvant, maigres/BPS, grasses/solvant, grasses/BPS. Tous les animaux d'un même groupe ont été maintenus ensemble, sans contact direct entre les différents groupes, notamment pour leur accès à l'eau et à l'aliment. Le diagnostic de gestation a été réalisé par échographie entre 30 et 32 jours de gestation. Trois brebis vides ont été réformées.

Période de mise à la reproduction	BPS		Solvant		Total
	Brebis grasses	Brebis maigres	Brebis grasses	Brebis maigres	
Lot 1	3	3	4	3	13
Lot 2	3	3	3	3	12
Lot 3	3	3	3	3	12
Lot 4	2	3	1	2	8
<b>Total</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>11</b>	<b>11</b>	<b>45</b>

Tableau 1 : Répartition des brebis gravides en fonction des périodes de mises à la reproduction et des groupes (statut physiologique, maigres ou grasses) ou traitement (solvant, BPS), (ND=Non Déterminé).

## 2.4. Exposition au BPS

Les brebis gravides ont reçu quotidiennement du 32<sup>ème</sup> au 135<sup>ème</sup> jour de gestation, soit durant 103 jours une administration de BPS à la dose de 0 à 50 µg/kg/j :

- Groupe « traitement BPS » : injection sous-cutanée de 50 µg/kg/j par brebis ;
- Groupe « solvant » : injection sous-cutanée du solvant.

Compte tenu des différences de physiologie digestive entre la brebis (ruminant) et l'homme, la voie sous-cutanée a été choisie. Des données précédentes au laboratoire ont montré qu'avec cette dose administrée quotidiennement à des brebis gravides par voie intramusculaire, des concentrations maximales de BPS (de 0,059 à 0,068 µM (15-17 ng/mL) sont atteintes en 20-60 minutes et les concentrations sont en-dessous de la LLOQ (limite inférieure de quantification) du dosage qui est de 1 ng/mL à partir de 10h post-administration. Les concentrations plasmatiques en BPS-G varient entre 0,0423 µM et 0,401 µM, 24h après l'administration (entre 17 ng/mL et 162 ng/mL).

Une solution mère de BPS (Sigma©, concentration de 14 mg/mL) a été préparée dans de l'éthanol absolu, aliquotée puis stockée à -20°C dans un contenant en verre pour l'ensemble de l'expérimentation. Le dosage de 5 aliquots a indiqué une concentration de  $13,3 \pm 0,72$  mg/mL). Cette solution a été diluée chaque semaine dans de l'huile de maïs (Ethanol-BPS/huile de maïs 1:6 vol:vol) pour obtenir une solution d'administration à la concentration de 2 mg/mL (stockage à 4°C dans un contenant en verre ambré scellé). Les brebis du lot témoin ont reçu un mélange d'éthanol et d'huile de maïs (volume 1:6). Afin d'éviter toute contamination, la préparation des deux solutions d'administration (BPS, solvant) a été réalisée dans deux espaces différents. Toutes les administrations ont d'abord débuté par le groupe contrôle et ensuite par le groupe traité au BPS. Le dos des brebis a été tondu régulièrement des omoplates jusqu'aux lombes. Sept sites d'injection correspondant aux 7 jours de la semaine ont été repérés sur le dos de l'animal afin de limiter les réactions inflammatoires locales. Les administrations ont été réalisées quotidiennement pendant toute la durée de l'expérience, entre 7 et 10 heures du matin. Ces administrations ont été réalisées par voie sous-cutanée, après nettoyage par une compresse imbibée d'alcool puis une compresse imbibée de Vétédine© solution. Le BPS a été administré en bolus à l'aide d'une aiguille 19G. Les éventuels reflux de solution huileuse ont été notés.

## 2.5. Matériels utilisés

Tous les matériaux pour la préparation des solutions, y compris les matériaux utilisés pour l'échantillonnage, le traitement et l'analyse, étaient en verre ou en

plastique sans bisphénols (polypropylène) afin d'éviter toute contamination des échantillons.

## **2.6. Prélèvement sanguins maternels au cours de la gestation**

Pendant toute la durée de l'étude, des prélèvements sanguins maternels ont été réalisés toutes les deux semaines ( $\pm 3$  jours) avant les administrations et avant la distribution de l'aliment dès J29-30 puis à J47-50, J61-63, J76-77, J90-92, J104-106, J118, J131-132 de gestation, soit 8 prélèvements sanguins par brebis. Les prélèvements ont été réalisés par ponction directe de la veine jugulaire avec une aiguille de gauge 23/22G et une seringue de 2,5 mL. Le sang a été transféré immédiatement dans un tube contenant de l'héparinate de lithium et réfrigéré dans de la glace puis centrifugé pendant 10 minutes à 3000 g et à 4°C dans un délai n'excédant pas une heure. Les plasmas ont été conservés à -20°C jusqu'à l'analyse.

Les Beta-hydroxybutyrate ( $\beta$ -OH) sanguins ont été mesurés à 47-50, 76-77 et 104-106 jours de gestation avec l'appareil portable Optium Xceed®, destiné à la surveillance de l'état acido-cétosique chez les personnes diabétiques en médecine humaine, et les bandelettes Optium® beta-cétone (Abbott Diabete Care Ltd, Witney, Royaume-Uni). La corrélation entre la mesure par l'appareil et la mesure en laboratoire, considérée comme Gold standard, est de  $r=0,97$  (Voyvoda, Erdogan, 2010).

Les AGNE sériques ont été mesurés à 32, 62, 90 et 132 jours de gestation par une méthode colorimétrique validée (FUJIFILM NEFA®, FUJIFILM Wako X+Chemicals Europe GmbH, Berlin, Allemagne), selon la procédure du fabricant. La gamme de concentrations mesurées s'étend de 0,01 mmol/L à 4 mmol/L. Le coefficient de variation intra et inter dosage sont inférieurs à 9 et 15% respectivement.

La glycémie a été évaluée à l'aide d'un lecteur de glycémie AccucheckR à 90 jours pour les lots de mise à la reproduction 3 et 4) et à 117-118 et 132 jours de gestation pour les 4 lots.

## **2.7. Chirurgies : cathétérisme artério-veineux fœtal**

L'objectif de ces chirurgies était de réaliser la cathétérisation de la veine jugulaire et de l'artère carotide du fœtus permettant de réaliser des administrations intraveineuses et des prélèvements sanguins artériels répétés sur le fœtus, sur une période de plusieurs semaines. Chaque brebis a subi une chirurgie entre 125 et 130 jours de gestation.

Les brebis mises à jeun avant chirurgie (39h pour les aliments, 15h pour l'eau) ont reçu du propylène glycol per-os (Cétophyton©, CEVA SANTE ANIMALE, 33500 LIBOURNE - 20 mL, deux fois par jour) la veille de l'intervention afin de limiter le risque de toxémie de gestation.

### **2.7.1. Anesthésie et antibio-prophylaxie**

Une antibioprophylaxie avec de l'amoxicilline longue action par voie intramusculaire à 20 mg/kg (Longamox© 150 mg/mL) a été réalisée 24h avant et 24h après la chirurgie.

En pré-opératoire immédiat, une administration systématique à visée antalgique de flunixin méglumine en intra-veineuse à 2,2 mg/kg (Flunixin® 50 mg/mL) a été réalisée. Une prémédication une demi-heure avant l'opération a été effectuée avec de l'acépromazine en intra-musculaire à 0,1 mg/kg (Calmivet® 5 mg/mL). L'induction de l'anesthésie a été réalisée par une administration intraveineuse de Propofol à 3 mg/kg (Vétofol® 10 mg/mL). Les brebis ont été intubées et l'anesthésie a été maintenue par un anesthésique volatil, l'isoflurane à 1,7% associé à de l'oxygène à un débit de 10-15 L/min. De plus, 10 mL de lidocaïne (Lurocaïne® 20 mg/mL) ont été administrés en plusieurs points (0,5 mL en intra-musculaire, 0,5 mL en sous-cutané), en décrivant un L dorsalement et crânialement à l'ouverture chirurgicale. Au cours de la chirurgie, 500 mg d'ampicilline solubilisée extemporanément dans 7 mL de sérum physiologique ont été administrés dans la cavité amniotique. Une perfusion intraveineuse de Ringer Lactate à 5-10 mL/kg/h (soit environ 500 mL/h) a été mise en place durant la chirurgie.

### **2.7.2. Préparation à l'intervention chirurgicale**

La brebis a été placée en décubitus latéral droit sur la table d'opération, les extrémités des membres attachées et coiffées de sacs plastiques. Le flanc gauche de la brebis a été préparé pour l'intervention chirurgicale. Il a été tondu, puis des lavages successifs (minimum 3 minutes) ont été réalisés à l'aide d'une solution savonneuse d'iode (Vétédine savon®) et d'une solution à 60% d'alcool. Une désinfection a ensuite été réalisée avec une solution iodée (Vétédine solution®).

### **2.7.3. Chirurgie**

#### *2.7.3.1. Chirurgie maternelle : incisions et extériorisation de l'utérus*

Après mise en place de champs stériles, une ouverture oblique de 15 à 20 cm en direction crânio-ventrale, du pli du grasset vers la veine mammaire, est réalisée au bistouri, permettant l'incision de la peau et du muscle peaucier. Les muscles obliques



interne, externe et transverse de l'abdomen ont été incisés plan par plan avec des ciseaux de Metzenbaum. Le péritoine a été ponctionné puis incisé avec précaution (utilisation d'une pince à dent de souris et d'une sonde cannelée). Après réclinaison de l'épiploon en chargeant les anses intestinales à l'intérieur, la tête fœtale est identifiée par palpation intra-abdominale puis cette partie de l'utérus est extériorisée. L'hystérotomie est réalisée au niveau de la grande courbure de l'utérus sur une longueur de 8 cm, en limitant les pertes de liquide amniotique. Au niveau de la grande courbure de l'utérus, l'allantoïde est fusionnée avec le chorion, et l'amnios est généralement d'aspect plus blanc que l'allantoïde, en raison de son épaisseur plus importante. Au fur et à mesure de l'incision, des pinces en cœur maintiennent ensemble les différents plans incisés (utérus, allantoïde et amnios) et sont maintenues verticalement pour limiter les pertes de liquide amniotique durant la chirurgie fœtale

### *2.7.3.2. Chirurgie fœtale*

#### *2.7.3.2.1. Incision fœtale et extériorisation de la carotide et de la veine jugulaire*

La tête du fœtus est extériorisée de l'utérus et maintenue en position surélevée. Dès cette étape, la tête du fœtus et l'utérus sont fréquemment et abondamment humidifiés avec du sérum physiologique à 37°C. Au niveau du sillon jugulaire, la peau est incisée sur 2 cm. Après dissection mousse du tissu sous-cutané à l'aide de ciseaux de Metzenbaum, la veine jugulaire est repérée et séparée du tissu conjonctif. Deux ligatures en soie (Soie 3-0 n°2.5, Ethicon®) sont passées sous la veine, qui est alors écartée pour permettre la dissection du muscle sterno-céphalique afin de visualiser l'artère carotide (repérée par son aspect blanc nacré). L'artère carotide peut être intimement liée au nerf vague, si c'est le cas ce dernier est alors séparé avec une pince fine et écarté. Deux ligatures en soie sont passées sous la carotide qui est extériorisée au niveau de la plaie sur 1,5 cm.

#### *2.7.3.2.2. Cathétérisation de la carotide et de la veine jugulaire*

Les deux ligatures en soie passées sous l'artère sont mises sous tension par deux personnes pour limiter le flux sanguin en amont et maintenir l'artère sous tension lors de l'incision à l'aide d'une aiguille recourbée (aiguille 19G courbée pratiquement à angle droit avec le biseau à l'extérieur de la courbure). L'aiguille recourbée doit traverser la paroi artérielle mais sans transpercer l'artère. L'aiguille est légèrement soulevée pour ouvrir l'incision faite dans l'artère par laquelle le cathéter est introduit et obture l'artère. Le cathéter est introduit sur quelques mm avant d'enlever l'aiguille

recourbée. Le cathéter artériel en polyvinyle Tygon® (diamètre intérieur de 0,81 mm et diamètre extérieur de 1,69 mm) est alors introduit sur 8 cm vers le cœur, jusqu'à l'arc aortique si l'incision fœtale est réalisée à gauche, ou bien jusqu'au tronc brachio-céphalique si l'incision est faite à droite. Deux ligatures sont ensuite réalisées (3 nœuds simples inversés) pour maintenir le cathéter en place dans la carotide à 1 cm d'intervalle (utilisation de freins ajoutés sur les cathéters). La même technique est réalisée pour cathétériser la veine jugulaire. Le cathéter veineux en polyvinyle Tygon® (diamètre intérieur de 1,02 mm et diamètre extérieur de 1,78 mm) est introduit jusqu'à la veine cave supérieure.

#### *2.7.3.2.3. Fixation des cathéters sur la peau du fœtus*

La peau du fœtus est suturée par un surjet simple (Vicryl® n°2 résorbable, section d'aiguille ronde), en laissant sortir les deux cathéters hors de la plaie d'incision. Les cathéters sont ensuite fixés sur la peau du fœtus à l'aide du même fil en faisant un point double inversé sur la peau du fœtus puis un nœud de chirurgien englobant le cathéter. Ensuite, la tête du fœtus est replacée dans la cavité amniotique tout en maintenant les bords de l'incision utérine soulevés pour ne pas perdre de liquide amniotique. L'ampicilline est administrée dans la cavité amniotique avant de suturer.

#### *2.7.3.3. Chirurgie maternelle : sutures utérine, musculaire, sous-cutanée et cutanée*

Les lèvres de la plaie (utérus, chorio-allantoïde et amnios) sont rapprochées. La suture est assurée par un surjet simple qui prend à la fois les membranes placentaires et la paroi utérine avec un fil résorbable Vicryl® n°2 allant de l'apex de la corne vers le col. Un deuxième surjet enfouissant non perforant à anses cachées parallèles à la plaie est ensuite réalisé avec le même fil, allant du col vers l'apex de la corne. Ces sutures laissent les cathéters sortir de la plaie, ces derniers sont positionnés dans la cavité abdominale de façon à éviter les tractions sur le cathéter après avoir replacé l'utérus dans la sangle épiploïque. Les plans musculaires incluant le péritoine sont suturés en deux plans avec un fil résorbable Vicryl® n°1 (section d'aiguille triangulaire). Le premier surjet à points passés englobe le péritoine, les muscles obliques et le muscle transverse et le deuxième englobe le muscle peaucier, et le tissu sous-cutané. Avant de suturer la peau, les cathéters ont été tunnelisés sous la peau et extériorisés à travers une petite incision du flanc dans la fosse sous lombaire. Ils ont été remplis d'une solution saline héparinée (100 UI/ml) et scellés. La peau est suturée par un surjet à points passés avec du fil non résorbable (Mersuture® n°1, section d'aiguille

triangulaire). Les parties extériorisées des cathéters sont enveloppées dans une compresse imbibée de povidone iodée (Vétédine solution®) et d'un sac plastique (3 cm sur 5 cm). Elles sont ensuite placées dans un boîtier électrique pris dans l'élastoplasme entourant tout le flanc abdominal de la brebis (18).

#### *2.7.3.4. Période post-opératoire*

Après la chirurgie, les brebis ont été placées dans des box individuels sur de la paille et ont reçu une ration limitée d'aliment concentré (paille et eau à volonté) identique à celle précédant la chirurgie. Elles ont reçu une antibioprofylaxie à base d'amoxicilline longue action en IM à 20 mg/kg (Longamox© 150 mg/mL). Un anti-inflammatoire non stéroïdien, l'acide tolfénamique à 2mg/kg IM (Tolfine®) a été administré si la femelle présentait des signes de douleur ou si elle présentait une perte d'appétit.

Chaque jour, dans des conditions les plus aseptiques possibles, les cathéters ont été rincés avec 1 mL de sérum physiologique stérile (NaCl 0,9%) puis remplis avec 2 ml de solution saline héparinée (100 UI d'héparine/ml) jusqu'à la fin de l'expérience.

## **2.8. Challenge hyperglycémique fœtal**

Le test fonctionnel de réponse insulinique à l'hyperglycémie fœtal a été réalisé entre 132 et 134 jours de gestation, soit au moins 3 jours après les chirurgies. Les prélèvements sanguins fœtaux ont été réalisés via le cathéter mis en place au niveau de l'artère carotidienne du fœtus, puis recueillis dans des tubes en polypropylène héparinés (2 µL d'héparinate de sodium, distribué extemporanément, Héparine CHOAY 25000UI). Avant toute administration de glucose, trois prélèvements de sang artériel fœtal d'un volume de 0,7 mL ont été réalisés à environ 15 minutes d'intervalle. De la même façon, trois prélèvements sanguins de 5 mL ont été faits sur les brebis. Ces prélèvements ont permis de mesurer la glycémie et l'insulinémie basales chez les mères et les fœtus. La mesure des gaz du sang a été réalisée pour tous les fœtus avant le challenge hyperglycémique, pour vérifier leur oxygénation. Pour cela, les prélèvements sanguins fœtaux ont été réalisés sur un des prélèvements avant administration du glucose avec des seringues héparinées (2 mL, safePICO©) et dosés avec un analyseur d'électrolytes et de gaz sanguins vétérinaire (IDEXX VETSTAT© et cassettes à usage unique). Une solution de glucose à 33% (Osalia©) a ensuite été administrée par voie IV au fœtus sous la forme d'un bolus à la dose de 275 mg (0,8 mL, lot 1) et 440 mg (1,33 mL, lots 2, 3 et 4) puis d'une perfusion au taux de 32,5

mg/min (0,1 mL/min, lot 1) et 52 mg/min (0.16 mL/min, lots 2, 3 et 4) pendant 65 minutes. La modification de la dose de glucose pour les lots 2 à 4 est consécutive à une réévaluation du poids estimé des fœtus de 2,5 à 4 kg à l'issue des expériences sur le premier lot. Les administrations IV fœtales ont été effectuées via le cathéter veineux jugulaire du fœtus. La perfusion IV a été réalisée avec des injecteurs portatifs MS32 Sims Graseby® équipées de seringues Luer Lock® de 20ml. Tout au long de la perfusion, du sang fœtal a été prélevé (0,7 mL) aux temps 10, 20, 30, 40, 45, 55 et 65 minutes via le cathéter artériel. Les prélèvements sanguins fœtaux et maternels ont été recueillis dans des tubes contenant de l'héparinate de sodium. Les prélèvements ont été immédiatement centrifugés (2 minutes à 13000 g à 4°C) et stockés à -80°C. Le jour de l'épreuve glycémique, la distribution des concentrés et les administrations de BPS ont été réalisées à la fin des prélèvements.

## **2.9. Dosage des marqueurs métaboliques**

Les Beta-hydroxybutyrate ( $\beta$ -OH) sanguins ont été mesurés chez les mères à 47-50, 76-77 et 104-106 jours de gestation avec l'appareil portable Optium Xceed®, destiné à la surveillance de l'état acido-cétosique chez les personnes diabétiques en médecine humaine, et les bandelettes Optium® beta-cétone (Abbott Diabete Care Ltd, Witney, Royaume-Uni). La corrélation entre la mesure par l'appareil et la mesure en laboratoire, considérée comme Gold standard, est de  $r=0,97$  (Voyvoda, Erdogan, 2010).

Les AGNE sériques ont été mesurés à 29-30, 61-63, 90-92 et 131-132 jours de gestation chez les brebis, par une méthode colorimétrique validée (FUJIFILM NEFA®, FUJIFILM Wako X+Chemicals Europe GmbH, Berlin, Allemagne), selon la procédure du fabricant. La gamme de concentrations mesurées s'étend de 0,01 mmol/L à 4 mmol/L. Les coefficients de variation intra et inter dosage sont inférieurs à 9 et 15% respectivement.

La glycémie a été évaluée directement au pied de l'animal, à l'aide d'un lecteur de glycémie AccucheckR chez les brebis à 90 jours pour les lots de mise à la reproduction 3 et 4) et à 118 et 131-132 jours de gestation pour les 4 lots, et chez les fœtus avant et au cours du challenge hyperglycémique.

L'insuline a été mesurée par un dosage ELISA (Ovine Insuline Mercodia®, UPSALA) selon la procédure du fabricant. La gamme de concentrations mesurées s'étend de 0,05 à 3,0  $\mu$ g/L.

## **2.10. Euthanasie et prélèvements sanguins et d'organes**

À l'issue de l'étude et le lendemain de l'épreuve glycémique, après un prélèvement sanguin jugulaire, les brebis ont été euthanasiées par administration IV de thiopental sodique (Euthasol®, 400 mg/mL ; dose de 140 mg/kg). Un prélèvement de sang fœtal a été réalisé avant euthanasie maternelle pour les fœtus instrumentés et après hystérotomie post-mortem pour les fœtus issus des gestations multiples. Pour les gestations multiples, les prélèvements ont été réalisés sur deux fœtus par brebis, le fœtus cathétérisé et un deuxième fœtus. Les prélèvements (plasmas maternels et fœtaux et liquide amniotique) ont été centrifugés pendant 10 minutes à 3000 g et à 4°C. Les plasmas maternels et les liquides amniotiques ont été répartis chacun en deux fractions aliquotes dans des tubes Eppendorf® et les plasmas fœtaux en cinq fractions afin de conserver des tubes en réserve pour l'évaluation ultérieure de marqueurs d'effet du BPS. L'ensemble des tubes a été conservé à -20°C hormis deux aliquots fœtaux et maternels conservés à -80°C.

Les fœtus ont été extraits, pesés et leur sexe a été enregistré. Ils ont été euthanasiés par administration IV de thiopental sodique (Euthasol®, 400 mg/mL ; dose de 140 mg/kg). Les organes fœtaux (foie, pancréas, tissu adipeux péri-rénal, gonades, hypophyse, hypothalamus, thyroïde) ont été rapidement prélevés et disséqués sur de la glace. Le foie, et le tissu adipeux périrénal ont été pesés (balance OHAUS® NV2101, précision 0,1 g jusqu'à 2100 g et balance OHAUS® JE120 ; précision 0,1 g jusqu'à 120 g). Le foie fœtal a été conservé en totalité dans le but d'évaluer l'expression des gènes qui codent pour les enzymes de la néoglucogénèse. Chez la mère, un échantillon de foie et de tissu adipeux péri-rénal a été conservé. Les tissus (foie, pancréas, tissu adipeux péri-rénal, une gonade) ont été immédiatement plongés dans l'azote liquide puis conservés à -80°C. L'hypophyse, l'hypothalamus ont été conservés dans du sucrose ; la thyroïde et une gonade par fœtus ont été conservées immédiatement dans du para-formaldéhyde (PAF, concentration 4%), rincées 48 heures après dans du tampon phosphate salin (PBS, 0,01M) puis conservées dans de l'éthanol à 70% jusqu'à l'analyse.

## **2.11. Dosage du BPS-glucuronide**

Les concentrations de BPS-glucuronide (BPS-G) ont été mesurées avant le début du traitement (32 jours de gestation) et à 49, 77 et 105 jours de gestation chez les brebis traitées au BPS. Pour les brebis qui ont reçu le solvant, seulement un

échantillon plasmatique maternel a été dosé à 32 jours de gestation pour vérifier l'absence de contamination au cours de l'exposition. Le jour de l'abattage, environ 24 heures après la dernière administration de BPS (131 et 133 jours de gestation), les concentrations de BPS-G ont été mesurées dans le plasma fœtal, le liquide amniotique fœtal et dans le plasma maternel pour toutes les brebis, à la fois du groupe traité au BPS et du groupe contrôle. Pour deux fœtus, les prélèvements ont été réalisés au niveau du cathéter jugulaire.

Les concentrations de BPS et de BPS-glucuronide (BPS-G) ont été déterminées par une méthode de dosage UHPLC/MS/MS (Acquity-2D UPLC® Xevo® TQ, Waters, Milford, MA, USA) en utilisant les méthodes précédemment développées au laboratoire et décrites par Grandin (2018) et Lacroix et al. (2011).

Les limites de quantification ont été validées à 1,5 ng/mL pour les plasmas fœtaux et les liquides amniotiques et à 0,5 ng/mL pour les plasmas maternels. La limite de quantification du BPS-G est fixée à 0,5 ng/mL pour l'ensemble des échantillons.

Les courbes de calibration ont été établies de 0,5 ng à 100 ng/mL, à la fois pour le BPS et le BPS-G.

## 2.12. Analyse des données

L'analyse descriptive des données a été réalisée sur le logiciel Microsoft Excel®. Les tests statistiques ont été effectués sur le logiciel SYSTAT © (version 6, Inc, Evanston, IL). Pour l'ensemble des tests statistiques utilisés, le seuil de signification a été fixé à  $p = 0,05$ .

Compte tenu de la distribution hétérogène et du faible nombre de gestations simples et triples, l'effet du traitement et du statut métabolique sur les différents paramètres métaboliques et pondéraux maternels, ont été évaluées uniquement pour les gestations doubles par une analyse de variance à 3 facteurs selon le modèle suivant (ANOVA, SYSTAT12 version 6, Inc, Evanston, IL) :

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + (\alpha*\beta)_{ij} + (\alpha*\gamma)_{ik} + (\beta*\gamma)_{jk} + (\alpha*\beta*\gamma)_{ijk} + \varepsilon_{ijk}$$

$Y_{ij}$  représente le facteur considéré,  $\mu$  est la moyenne générale,  $\alpha_i$  l'effet du groupe (solvant, BPS),  $\beta_j$  l'effet du statut métabolique (maigre, grasse),  $\gamma_k$ , l'effet période, les 3 interactions doubles, l'interaction triple entre les 3 facteurs et  $\varepsilon$  la valeur résiduelle.

L'effet du cathétérisme sur le poids du fœtus a été évalué par un test t apparié sur 28 gestations multiples et sur 13 gestations simples.

L'effet du traitement (solvant, BPS), du statut métabolique (maigre et grasse), du sexe (F ou M) sur les paramètres pondéraux du fœtus (poids corporel, foie, tissu adipeux et poids du foie/kg ; poids du tissu adipeux/kg) a été évalué par une analyse de variance à 3 facteurs (ANOVA, SYSTAT12 version 6, Inc, Evanston, IL) selon le modèle suivant :

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + (\alpha*\beta)_{ij} + (\alpha*\gamma)_{ik} + (\gamma*\beta)_{kj} + (\alpha*\beta*\gamma)_{ijk} + \delta + \varepsilon_{ijk}$$

$Y_{ij}$  représente le paramètre considéré,  $\mu$  est la moyenne générale,  $\alpha_i$  l'effet du groupe (solvant, BPS),  $\beta_j$  l'effet du statut métabolique (maigre, grasse),  $\gamma_k$ , l'effet du sexe (M ou F),  $(\alpha*\beta)_{ij}$ ,  $(\alpha*\gamma)_{ik}$ ,  $(\gamma*\beta)_{kj}$ , les interactions doubles et  $(\alpha*\beta*\gamma)_{ijk}$  l'interaction triple entre les trois facteurs et  $\varepsilon$  la valeur résiduelle.

Pour les foetus femelles, les effets du traitement (solvant, BPS), du statut métabolique (maigre et grasse) sur les paramètres morphologiques du fœtus (poids corporel, du foie) ont été évalués par une analyse de variance à 2 facteurs (ANOVA, SYSTAT12 version 6, Inc, Evanston, IL) selon le modèle suivant :

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha*\beta)_{ij} + \delta + \varepsilon_{ijk}$$

$Y_{ij}$  représente le paramètre considéré,  $\mu$  est la moyenne générale,  $\alpha_i$  l'effet du groupe (solvant, BPS),  $\beta_j$  l'effet du statut métabolique (maigre, grasse),  $(\alpha*\beta)_{ij}$  l'effet de l'interaction traitement \* statut métabolique et  $\varepsilon$  la valeur résiduelle.

L'effet du traitement (solvant, BPS), du statut métabolique (maigres et grasse), du type de la gestation (simple ou multiple) sur les gaz du sang et les ions a été évalué par une analyse de variance à 3 facteurs (ANOVA, SYSTAT12 version 6, Inc, Evanston, IL) selon le modèle suivant :

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + (\alpha*\beta)_{ij} + (\alpha*\gamma)_{ik} + (\gamma*\beta)_{kj} + (\alpha*\beta*\gamma)_{ijk} + \delta + \varepsilon_{ijk}$$

$Y_{ij}$  représente la concentration sanguine du paramètre considéré,  $\mu$  est la moyenne générale,  $\alpha_i$  l'effet du groupe (solvant, BPS),  $\beta_j$  l'effet du statut métabolique (maigre, grasse),  $\gamma_k$ , l'effet du type de gestation (simple ou multiple),  $(\alpha*\beta)_{ij}$ ,  $(\alpha*\gamma)_{ik}$ ,  $(\gamma*\beta)_{kj}$ , les interactions doubles et  $(\alpha*\beta*\gamma)_{ijk}$  l'interaction triple entre les trois facteurs et  $\varepsilon$  la valeur résiduelle.

### 3. Résultats

#### 3.1. Caractéristiques des brebis et des fœtus ovins

Les caractéristiques des femelles, âge ou délai post-partum sont relativement homogènes entre les groupes, avec un délai moyen depuis la dernière mise-bas de  $214 \pm 20$  jours (étendue : 183-248 jours). L'âge des brebis lors de la mise à la reproduction était en moyenne de  $805 \pm 60$  jours, il est similaire pour les groupes BPS et solvant. Cependant, l'âge moyen des brebis grasses est significativement plus élevé que celui des brebis maigres (830 jours *versus* 780 jours,  $p=0,014$ , ANOVA).

Le Tableau 2 indique la répartition des brebis en fonction du traitement, du statut métabolique et du type de gestation (nombre de fœtus) ainsi que le sexe du fœtus cathétérisé. Pour deux brebis mortes au cours de l'anesthésie, le nombre de fœtus et leur sexe n'ont pas été déterminés. Au total, pour 43 brebis, le nombre total de fœtus était de 78 soit une prolificité de 1,8 fœtus/brebis avec 47% de femelles ( $n=37$ ) et 51% de mâles ( $n=40$ ).

Nombre de fœtus / sexe du fœtus cathétérisé	BPS		Solvant		Total
	Brebis maigres	Brebis grasses	Brebis maigres	Brebis grasses	
<b>1</b>	<b>5</b> 2F et 3M	<b>3</b> 1F et 2M	<b>4</b> 4M	<b>3</b> 3M	<b>15</b> 3F et 12M
<b>2</b>	<b>5</b> 2F et 3M	<b>7</b> 3F et 4M	<b>5</b> 2F et 3M	<b>4</b> 2F et 2M	<b>21</b> 9F et 12M
<b>3</b>	<b>1</b> 1F	<b>1</b> 1M	<b>2</b> 1F et 1M	<b>3</b> 1F et 2M	<b>7</b> 3F et 4M
ND		1		1	2
<b>Total brebis</b>	<b>n=11</b>	<b>n=11</b>	<b>n=11</b>	<b>n=10</b>	<b>n=43</b>
<b>Total fœtus</b>	<b>11F et 7M</b>	<b>8F et 12M</b>	<b>7F et 12M (1ND)</b>	<b>11F et 9M</b>	<b>N=78 37F et 40M</b>

Tableau 2 : Répartition des brebis gravides et identification du sexe des fœtus cathétérisés en fonction du nombre de fœtus et du statut métabolique des brebis, maigres ou grasses ou du traitement (solvant, BPS). Pour deux brebis mortes lors de l'anesthésie, le nombre de fœtus n'a pas été évalué (ND=Non déterminé).



### 3.2. Exposition au BPS et au BPS-glucuronide au cours de la gestation

#### 3.2.1. Evolution temporelle des concentrations plasmatiques maternelles en BPS et BPS-glucuronide

Comme attendu, les concentrations en BPS-G dans les échantillons plasmatiques des brebis appartenant au groupe solvant, évalués à 32 jours de gestation et à 132 jours de gestation (au moment de l'abattage), étaient inférieures à la limite de détection de la méthode, ce qui indique une absence de contamination pendant toute la durée de l'expérience.

La Figure 2 présente les concentrations plasmatiques en BPS-G (ng/mL), mesurées à 49, 77, 105 et 132 jours de gestation, des brebis appartenant au groupe BPS.

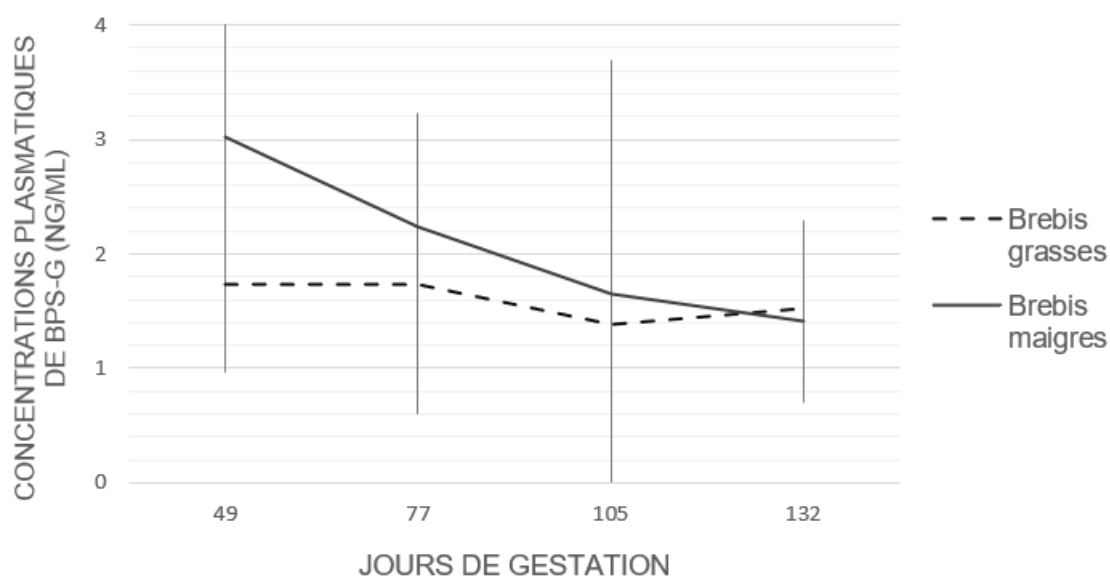


Figure 2 : Concentrations plasmatiques en BPS-G (moyennes  $\pm$  ET ; ng/mL) des 22 brebis du groupe exposé au BPS, à 49, 77, 105 et 132 jours de gestation, en fonction du statut métabolique (11 maigres ; 11 grasses).

L'analyse statistique n'a montré aucun effet du statut métabolique (maigres, grasses) et de la période de gestation sur les concentrations plasmatiques de BPS-G (ANOVA, NS), ce qui signifie que le BPS ne s'accumule pas chez la mère et que la teneur en graisse n'influence pas la toxicocinétique du BPS.

#### 3.2.2. Exposition fœtale au BPS et BPS-glucuronide

La Figure 3 présente les concentrations plasmatiques maternelles, fœtales et amniotiques en BPS-G à 132-133 jours de gestation.

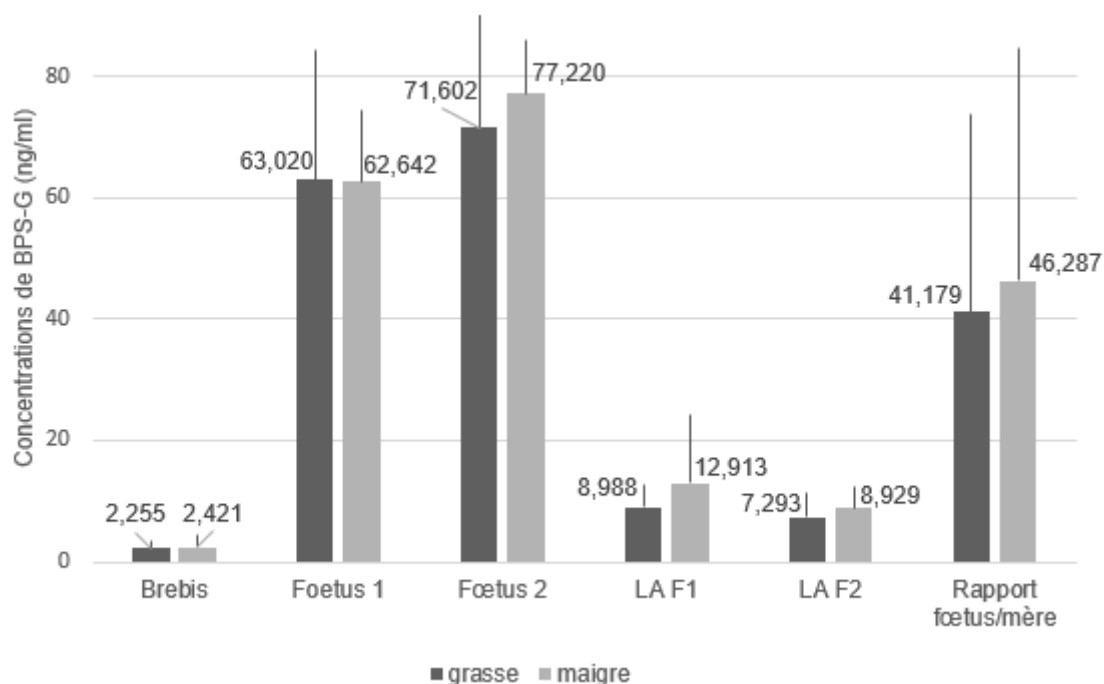


Figure 3 : Concentrations plasmatiques (moyenne  $\pm$  ET ; ng/mL) maternelles (n=22), fœtales (Foetus 1, n=20 ; Foetus 2, n=13), du liquide amniotique (LA F1, n=21 ; LA F2, n=14) et rapport des concentrations plasmatiques entre le fœtus et sa mère en BPS-G (11 maigres, 11 grasses)

Aucun effet du statut métabolique n'a été mis en évidence sur l'exposition fœtale au BPS-G (plasma et liquide amniotique). Mais comme cela a déjà été montré dans une étude précédente (1), les concentrations plasmatiques fœtales sont 10 à 40 fois plus élevées que les concentrations plasmatiques maternelles ou celles du liquide amniotique.

### 3.3. Evolution temporelle du poids et de la note d'état corporel des brebis au cours de la gestation

#### 3.3.1. Poids corporel des brebis avant traitement

Le Tableau 3 décrit le poids des brebis (moyenne  $\pm$  ET ; [étendue]) autour de la période d'inclusion dans le groupe de traitement (entre GD26 et GD36). Les poids ont été mesurés au minimum après 14 jours d'habituement au régime alimentaire.

	Brebis maigres		Brebis grasses	
	Moyenne	ET	Moyenne	ET
<b>Solvant</b>	<b>50,700</b> [38,2 – 60,0]	<b>5,550</b>	<b>67,400</b> [58,4 – 82,6]	<b>6,740</b>
<b>BPS</b>	<b>52,000</b> [37,6 – 63,8]	<b>7,090</b>	<b>65,700</b> [56,8 – 79,6]	<b>5,960</b>

Tableau 3 : Poids corporels (moyennes  $\pm$  ET, [étendue] ; kg) des 43 brebis entre 28 et 36 jours de gestation, au moment de l'inclusion dans les groupes en fonction du traitement et du statut métabolique (BPS (11 maigres, 11 grasses), solvant (11 maigres, 10 grasses)).

Avant l'inclusion des brebis dans les groupes traités et solvant (GD13 et GD36), le poids des brebis grasses était significativement plus élevé (13-17 kg) que celui des brebis maigres ( $p < 0,001$ , ANOVA).

### 3.3.2. Evolution temporelle du poids corporel des brebis au cours de la gestation

La Figure 4 montre l'évolution temporelle des poids corporels des brebis (moyenne  $\pm$  ET), de 20-28 jours avant la mise à la reproduction jusqu'à 118-121 jours de gestation. Les femelles grasses ont un poids significativement plus élevé que les brebis maigres avec une différence de poids allant de 10 à 35 kg selon le stade de gestation.

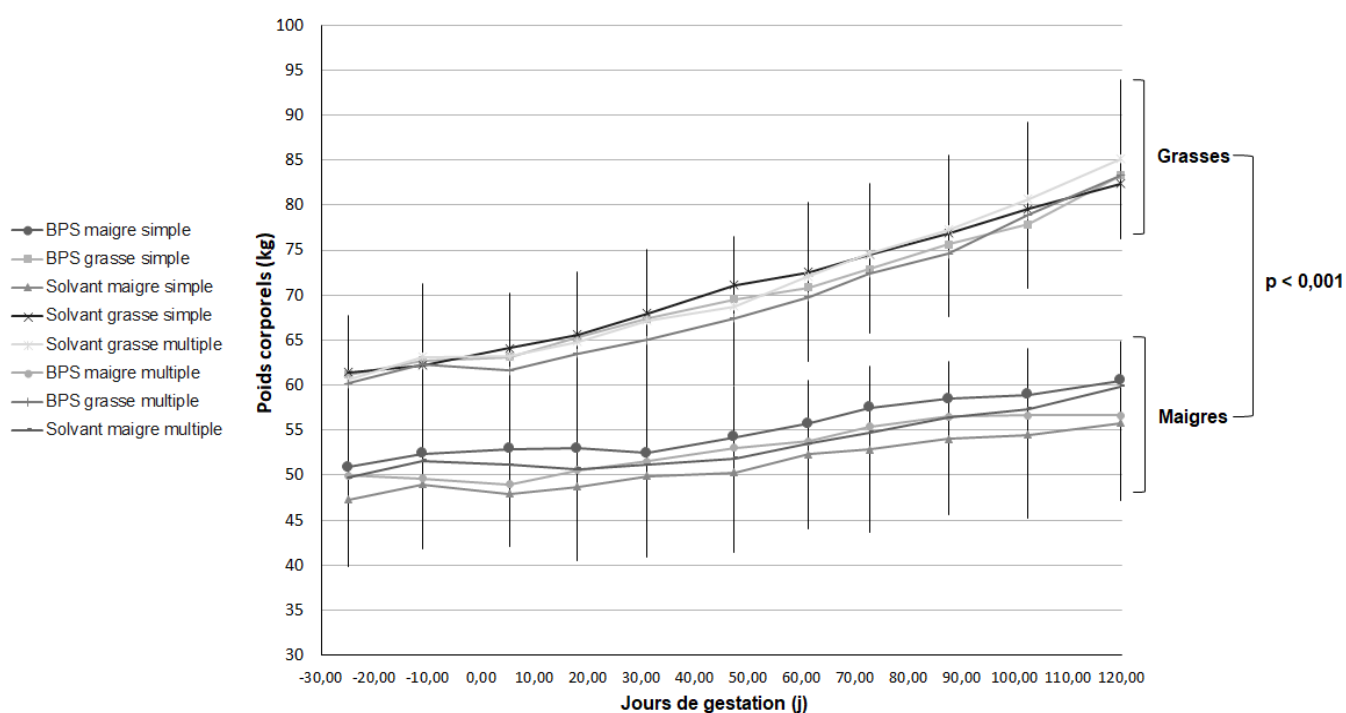


Figure 4 : Poids corporels (moyennes  $\pm$  ET ; kg) des 45 brebis de -28 à -20 jours avant la mise à la reproduction jusqu'à +118 à +121 jours de gestation en fonction du traitement et du statut métabolique (BPS (11 maigres, 11 grasses), solvant (11 maigres, 10 grasses)).

L'analyse de covariance évaluant les effets du statut métabolique, du type de gestation (simple et multiple), du traitement et de la période sur les poids corporels (ANCOVA) n'a pas été interprétable en raison des interactions entre les facteurs.

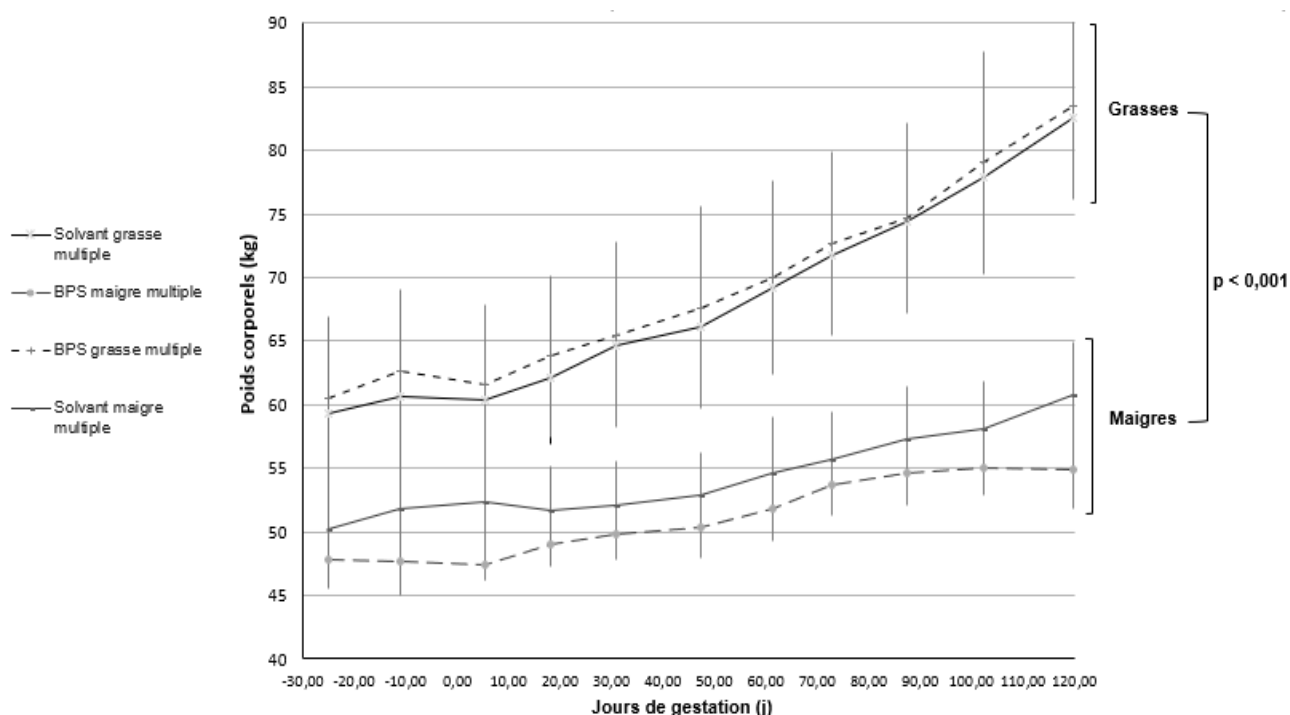


Figure 5 : Poids corporels (moyennes  $\pm$  ET ; kg) des 21 brebis de -28 à -20 jours avant la mise à la reproduction jusqu'à +118 à +121 jours de gestation gémellaire, en fonction du traitement et du statut métabolique (BPS (5 maigres, 7 grasses), solvant (5 maigres, 4 grasses)).

Une analyse de covariance a donc été réalisée en ne prenant en compte que les gestations gémellaires (Figure 5).

L'analyse statistique montre un effet des interactions entre le statut métabolique et la période (ANCOVA,  $p < 0,001$ ), ce qui signifie que le statut métabolique (maigre, grasse) a un effet sur la prise de poids des brebis. En revanche, le traitement (BPS, solvant) n'a pas eu d'effet sur l'évolution temporelle du poids corporel.

### 3.3.3. Evolution temporelle des GMQ des brebis au cours de la gestation

Le Tableau 4 présente l'évolution des GMQ (moyenne  $\pm$  ET, [étendue]) en g/j des brebis au cours de trois périodes de la gestation (-14-36, 28-92 et 83-121 jours).

		Brebis maigres				Brebis grasses			
		Gestation simple		Gestation multiple		Gestation simple		Gestation multiple	
		Moyenne	ET	Moyenne	ET	Moyenne	ET	Moyenne	ET
<b>GMQ1</b>	Solvant	40,1 [19,5 - 91,2]	34,4	27,9 [-49,0 - 68,3]	43,0	120,7 [101,8 - 151,2]	26,7	103,6 [47,3 - 195,1]	51,4
	BPS	49,2 [-16,3 - 97,6]	44,7	26,6 [-7,3 - 59,6]	26,6	115,4 [69,1 - 145,5]	40,7	74,7 [16,3 - 102,4]	27,3
<b>GMQ2</b>	Solvant	87,9 [70,0 - 103,6]	14,0	107,0 [82,1 - 121,4]	12,4	155,2 [120,0 - 185,7]	33,1	187,9 [153,6 - 214,3]	24,0
	BPS	108,4 [82,1 - 142,9]	25,2	88,0 [-5,0 - 125,0]	49,5	154,5 [90,0 - 220]	65,0	174,6 [107,1 - 221,4]	38,6
<b>GMQ3</b>	Solvant	89,0 [13,3 - 150,0]	58,3	172,1 [52,2 - 250,0]	84,8	143,2 [116,7 - 182,6]	34,8	322,4 [200,0 - 385,7]	84,5
	BPS	132,2 [-53,3 - 266,7]	144,0	178,0 [-304,3 - 142,9]	162,6	301,2 [243,5 - 416,7]	100,0	298,0 [57,1 - 45,0]	113,2

Tableau 4 : Gains Moyens Quotidiens (moyennes  $\pm$  ET, [étendue] ; g/j) des 43 brebis à différentes périodes de la gestation à GD-14-36j (GMQ1), GD28-92j (GMQ2) et GD83-121j (GMQ3) en fonction du traitement et du statut métabolique (BPS (11 maigres, 11 grasses), solvant (11 maigres, 10 grasses)) et du type de gestation (simple, multiple).

Comme attendu, le GMQ de chacun des groupes augmente au cours de la gestation. Les brebis grasses ont une prise de poids plus rapide que les brebis maigres sur chacune des 3 périodes évaluées.

L'analyse statistique de l'évolution des poids corporels prenant en compte à la fois le statut métabolique, le type de gestation (simple et multiple), le traitement et la période n'a pas été interprétable en raison des interactions entre les différents facteurs.

Une analyse similaire a été réalisée sur les brebis à gestation gémellaire afin d'avoir un groupe plus homogène (Tableau 5).

		Brebis maigres		Brebis grasses	
		Moyenne	ET	Moyenne	ET
<b>GMQ1</b>	<i>Solvant</i>	37,1 [-49,0 - 68,3]	48,9	76,4 [47,3 - 102,0]	25,4
	<i>BPS</i>	33,4 [-4,1 - 59,6]	23,2	72,9 [16,3 - 102,4]	28,9
<b>GMQ2</b>	<i>Solvant</i>	102,6 [82,1 - 110,0]	11,7	186,8 [153,6 - 210,7]	24,0
	<i>BPS</i>	106,6 [75,0 - 125,0]	21,7	167,9 [107,1 - 220,0]	36,3
<b>GMQ3</b>	<i>Solvant</i>	184,8 [93,3 - 250,0]	78,8	333,9 [200,0 - 385,7]	89,7
	<i>BPS</i>	12,7 [-304,3 - 142,9]	181,2	297,8 [57,1 - 450,0]	122,3

Tableau 5 : Gains Moyens Quotidiens (moyennes  $\pm$  ET, [étendue] ; g/) des 21 brebis à gestation gémellaire à GD-14-36j (GMQ1), GD28-92j (GMQ2), GD83-121j (GMQ3) en fonction du traitement et du statut métabolique (BPS (5 maigres, 7 grasses), solvant (5 maigres, 4 grasses)).

L'analyse statistique montre un effet de l'interaction entre le statut métabolique et la période (ANOVA,  $p=0,003$ ), ce qui signifie que l'évolution du GMQ est différente en fonction du statut métabolique (maigre, grasse). En revanche, le traitement (BPS, solvant) n'a pas eu d'effet sur l'évolution temporelle du poids corporel.

Les brebis grasses ont un GMQ significativement plus élevé que les brebis maigres sur la période 83-121 jours de gestation ( $p<0,001$ ). Les GMQ augmentent significativement au cours du temps chez les brebis grasses, alors qu'ils ne sont pas différents en fonction de la période pour les brebis maigres.

#### 3.3.4. Evolution temporelle des NEC des brebis au cours de la gestation

Le Tableau 6 décrit les NEC (moyenne  $\pm$  ET et [étendue]) des brebis entre -16 et 30 jours, 30 et 90 jours et 90 et 126 jours de gestation. Comme attendu, les brebis maigres ont des NEC inférieures à celles de brebis grasses.

		Brebis maigres				Brebis grasses			
		Gestation simple		Gestation multiple		Gestation simple		Gestation multiple	
		Moyenne	ET	Moyenne	ET	Moyenne	ET	Moyenne	ET
NEC1	Solvant	1,8 [1,7-2,5]	0,3	1,9 [1,5-2,5]	0,3	3,5 [3,0-4,0]	0,4	2,5 [2,5-4,0]	0,4
	BPS	2,0 [1,5-2,5]	0,3	2,0 [1,7-2,2]	0,2	3,8 [3,5-4,0]	0,2	3,7 [3,0-4,0]	0,3
NEC2	Solvant	2,0 [1,7-2,5]	0,2	2,0 [1,5-2,5]	0,3	4,0 [3,5-4,5]	0,4	3,8 [3,5-4,0]	0,2
	BPS	2,0 [1,7-2,5]	0,2	2,0 [1,7-2,2]	0,2	4,0 [3,7-4,5]	0,3	3,9 [3,5-4,5]	0,3
NEC3	Solvant	2,1 [2,0-2,2]	0,1	1,9 [1,5-2,5]	0,3	4,1 [4,0-4,2]	0,1	4,1 [3,7-4,5]	0,3
	BPS	1,9 [1,7-2,2]	0,2	2,1 [2,0-2,5]	0,2	4,2 [4,0-4,5]	0,2	4,0 [3,7-4,5]	0,2

Tableau 6 Notes d'État Corporel (moyennes  $\pm$  ET, [étendue]) des 43 brebis à -16-30j (NEC1), 30-90j (NEC2), 90-126j de gestation (NEC3) en fonction du traitement et du statut métabolique (BPS (11 maigres, 11 grasses), solvant (11 maigres, 10 grasses)) et du type de gestation (simple, multiple).

### 3.4. Suivi des marqueurs métaboliques maternels au cours de la gestation

#### 3.4.1. Variation des $\beta$ -OH au cours de la gestation

L'évolution des concentrations sanguines en  $\beta$ -OH à 49, 77 et 104 jours de gestation est présentée dans les Tableaux 7 et 8. Une augmentation des concentrations de  $\beta$ -OH est observée à 104 jours de gestation pour les femelles traitées au BPS.

Traitement/ statut métabolique	$\beta$ -OH 1		$\beta$ -OH 2		$\beta$ -OH 3	
	Moyenne	ET	Moyenne	ET	Moyenne	ET
BPS grasses	0,327	0,047	0,291	0,070	0,391	0,070
BPS maigres	0,225	0,062	0,225	0,075	0,342	0,151
Solvant grasses	0,318	0,108	0,282	0,075	0,318	0,087
Solvant maigres	0,282	0,075	0,305	0,065	0,300	0,089

Tableau 7 : Concentrations sanguines en  $\beta$ -OH (moyenne  $\pm$  ET ; mmol/L) des 43 brebis à 49 ( $\beta$ -OH1), 77 ( $\beta$ -OH2) et 104 jours de gestation ( $\beta$ -OH3) en fonction du traitement et du statut métabolique (BPS (11 maigres, 11 grasses), solvant (11 maigres, 10 grasses)).

Traitement/ type de gestation	$\beta$ -OH 1		$\beta$ -OH 2		$\beta$ -OH 3	
	Moyenne	ET	Moyenne	ET	Moyenne	ET
Solvant simple	0,271	0,076	0,300	0,082	0,257	0,098
BPS simple	0,263	0,119	0,263	0,074	0,288	0,113
Solvant multiple	0,314	0,103	0,289	0,068	0,329	0,073
BPS multiple	0,279	0,043	0,250	0,085	0,407	0,107

Tableau 8 : Concentrations sanguines en  $\beta$ -OH (moyenne  $\pm$  ET ; mmol/L) des 43 brebis à 49 ( $\beta$ -OH1), 77 ( $\beta$ -OH2) et 104 jours de gestation ( $\beta$ -OH3) en fonction du traitement et du type de gestation (BPS (8 simples, 14 multiples), solvant (7 simples, 14 multiples)).

Compte tenu de l'influence du nombre de fœtus sur le statut métabolique des femelles, l'analyse de ce marqueur métabolique a été réalisée sur les gestations gémellaires. Les résultats sont présentés sur la Figure 6.

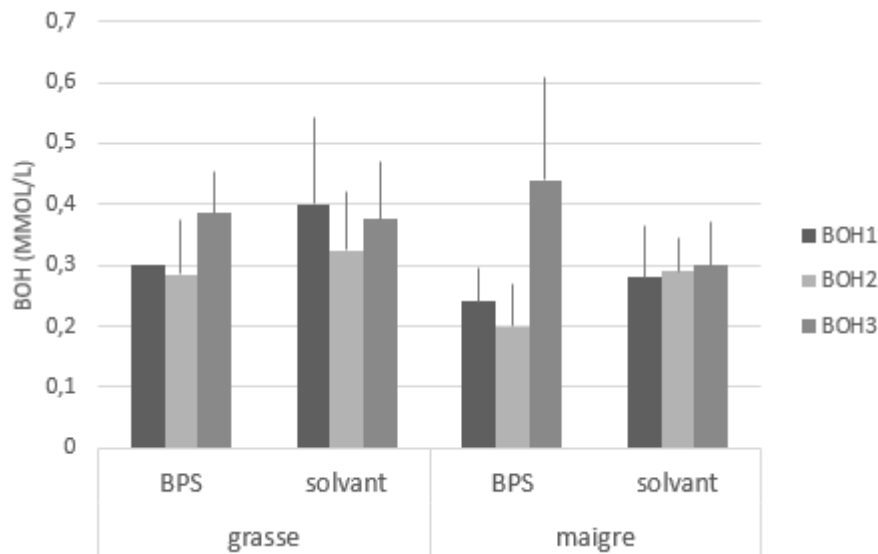


Figure 6 : Concentrations sanguines en  $\beta$ -OH (moyenne  $\pm$  ET ; mmol/L) des 21 brebis à 49 ( $\beta$ -OH1), 77 ( $\beta$ -OH2) et 104 jours ( $\beta$ -OH3) de gestation gémellaire en fonction du traitement et du statut métabolique (BPS (5 maigres, 7 grasses), solvant (5 maigres, 4 grasses)).

L'analyse de variance réalisée sur les gestations gémellaires montre un effet du statut métabolique ( $p=0,026$ ) et une interaction entre la période et le traitement ( $p=0,022$ , ANOVA), indiquant que les  $\beta$ -OH augmentent au cours du dernier tiers de la gestation chez les brebis traitées au BPS, alors que les valeurs restent relativement stables chez les femelles témoins.

La Figure 7 présente les différences de concentrations sanguines en  $\beta$ -OH entre le dernier trimestre de gestation GD104 ( $\beta$ -OH3) et le début GD49 ( $\beta$ -OH1) ou le milieu de la gestation GD77 ( $\beta$ -OH2), en fonction du traitement (solvant, BPS) et du statut métabolique (maigre, grasse) pour les brebis à gestation gémellaire.



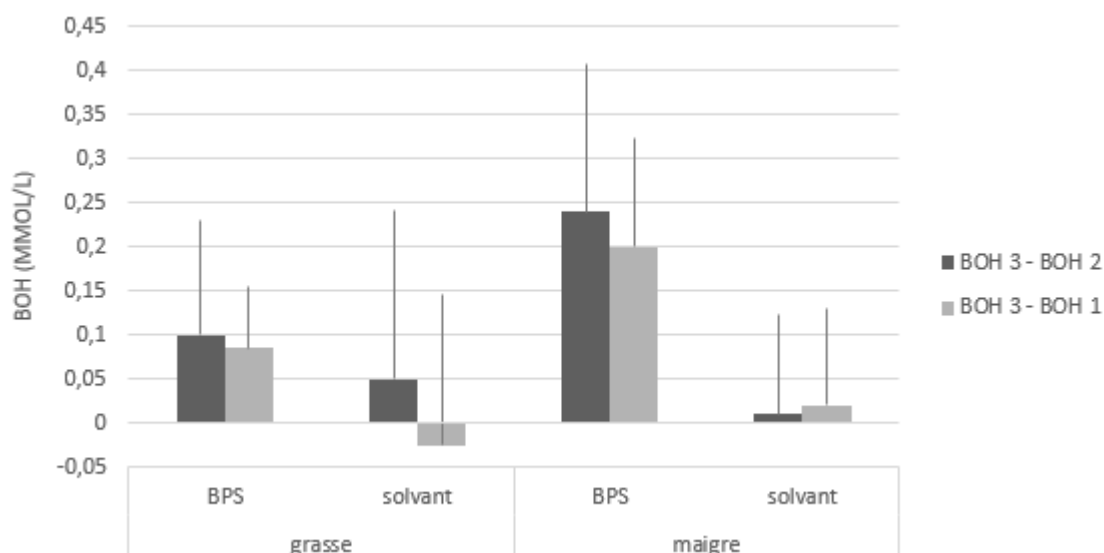


Figure 7 : Différences de concentrations sanguines en  $\beta$ -OH (moyenne  $\pm$  ET ; mmol/L) sur les 43 brebis entre le dernier trimestre de gestation ( $\beta$ -OH 3 = GD104) et le début ( $\beta$ -OH 1 = GD49) ou le milieu de la gestation ( $\beta$ -OH 2 = GD77), en fonction du traitement et du statut métabolique (BPS (11 maigres, 11 grasses), solvant (11 maigres, 10 grasses)).

Les variations de  $\beta$ -OH ne sont pas différentes sur les deux premiers stades de gestation (GD49 et GD77, NS).

En revanche, les femelles traitées au BPS ont une augmentation plus importante des  $\beta$ -OH entre 49 et 104 jours et entre 77 et 104 jours de gestation que les brebis contrôles ( $p < 0,011$  et  $p < 0,049$  respectivement).

### 3.4.2. Variation des AGNE plasmatiques au cours de la gestation

Les Tableaux 9 et 10 présentent l'évolution des concentrations sanguines en AGNE à 34, 63, 90 et 131-133 jours de gestation dans les 8 groupes de brebis.

Traitement/ statut métabolique	AGNE 1		AGNE 2		AGNE 3		AGNE 4	
	Moyenne	ET	Moyenne	ET	Moyenne	ET	Moyenne	ET
BPS grasses	0,079	0,077	0,279	0,173	0,353	0,126	0,890	0,384
BPS maigres	0,064	0,033	0,163	0,066	0,280	0,163	0,514	0,192
Solvant grasses	0,067	0,034	0,206	0,092	0,311	0,153	1,004	0,539
Solvant maigres	0,048	0,024	0,188	0,122	0,281	0,209	0,561	0,331

Tableau 9 : Concentrations des AGNE plasmatiques (moyenne  $\pm$  ET ; mmol/l) des 43 brebis à 34 (AGNE1), 63 (AGNE2), 90 (AGNE3) et 132 jours de gestation (AGNE4) en fonction du traitement et du statut métabolique (BPS (11 maigres, 11 grasses), solvant (11 maigres, 10 grasses)).

Traitement/ type de gestation	AGNE1		AGNE 2		AGNE 3		AGNE 4	
	Moyenne	ET	Moyenne	ET	Moyenne	ET	Moyenne	ET
Solvant simple	0,064	0,038	0,169	0,086	0,251	0,180	0,371	0,187
BPS simple	0,058	0,019	0,180	0,073	0,261	0,097	0,572	0,204
Solvant multiple	0,053	0,026	0,210	0,116	0,318	0,184	0,973	0,467
BPS multiple	0,079	0,071	0,245	0,165	0,349	0,164	0,776	0,403

Tableau 10 : Concentrations des AGNE plasmatiques (moyenne  $\pm$  ET ; mmol/L) des 43 brebis à 34 (AGNE1), 63 (AGNE2), 90 (AGNE3) et 132 jours de gestation (AGNE4) en fonction du traitement et du type de gestation (BPS (8 simples, 14 multiples), solvant (7 simples, 14 multiples)).

Dans chacun des groupes, les concentrations en AGNE augmentent au cours de la gestation, notamment à 131 jours.

Compte tenu de l'effet du nombre de fœtus sur le métabolisme, une analyse a été réalisée en ne prenant en compte que les gestations gémellaires. Les résultats sont présentés sur la Figure 8.

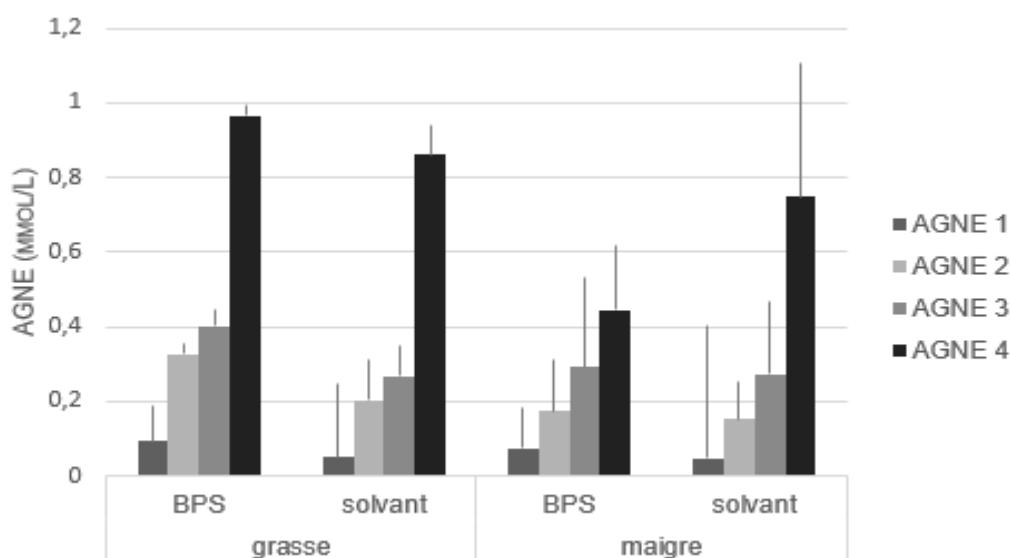


Figure 8 : Concentrations des AGNE plasmatiques (moyenne  $\pm$  ET ; mmol/L) des 21 brebis à gestation gémellaire à 34 (AGNE1), 63 (AGNE2), 90 (AGNE3) et 132 jours (AGNE4), en fonction du traitement et du statut métabolique (BPS (5 maigres, 7 grasses), solvant (5 maigres, 4 grasses)).

Les concentrations d'AGNE augmentent au cours de la gestation, notamment en fin de gestation. L'analyse de covariance montre un effet des interactions entre le statut métabolique et la période, ce qui signifie que l'évolution temporelle des concentrations d'AGNE est différente en fonction du statut métabolique ( $p=0,014$ ), avec une augmentation plus importante des AGNE chez les brebis grasses comparativement aux brebis maigres. En revanche, aucun effet du traitement sur les concentrations d'AGNE n'a été démontré.

### 3.4.3. Variation de la glycémie au cours de la gestation

Les Tableaux 11 et 12 présentent les glycémies à 118 et 132 jours de gestation en fonction du statut métabolique et du type de gestation. Les glycémies mesurées à 90 jours de gestation n'ont pas été prises en compte car mesurées uniquement sur les lots 3 et 4.

Traitement/ statut métabolique	Glycémie 2		Glycémie 3	
	Moyenne	ET	Moyenne	ET
<i>BPS grasse</i>	0,433	0,072	0,549	0,076
<i>BPS maigre</i>	0,346	0,067	0,524	0,059
<i>Solvant grasse</i>	0,435	0,079	0,545	0,013
<i>Solvant maigre</i>	0,336	0,051	0,508	0,066

Tableau 11 : Glycémies (moyenne  $\pm$  ET ; g/L) des 43 brebis à 118 (Glycémie 2) et 132 jours de gestation (Glycémie 3) en fonction du traitement et du statut métabolique (BPS (11 maigres, 11 grasses), solvant (11 maigres, 10 grasses)).

Traitement/ type de gestation	Glycémie 2		Glycémie 3	
	Moyenne	ET	Moyenne	ET
<i>Solvant simple</i>	0,459	0,107	0,598	0,068
<i>BPS simple</i>	0,471	0,117	0,576	0,083
<i>Solvant multiple</i>	0,346	0,111	0,494	0,066
<i>BPS multiple</i>	0,342	0,083	0,514	0,069

Tableau 12 : Glycémies (moyenne  $\pm$  ET ; g/L) des 43 brebis à 118 (Glycémie 2) et 132 jours de gestation (Glycémie 3) de gestation en fonction du traitement et de la portée (BPS (8 simples, 14 multiples), solvant (7 simples, 14 multiples)).

Les brebis à gestation multiple ont des glycémies significativement plus faibles que celles à gestation simple (ANOVA,  $p=0,001$ ). De plus, les brebis maigres ont une glycémie plus faible que les brebis grasses, quel que soit le traitement (ANOVA,  $p<0,001$ ).

En revanche, aucun effet du traitement (BPS ou solvant) n'a été observé.

Compte tenu de l'effet du nombre de fœtus sur le métabolisme, une analyse a été réalisée en ne prenant en compte que les gestations gémellaires. Les résultats sont présentés sur la Figure 9.

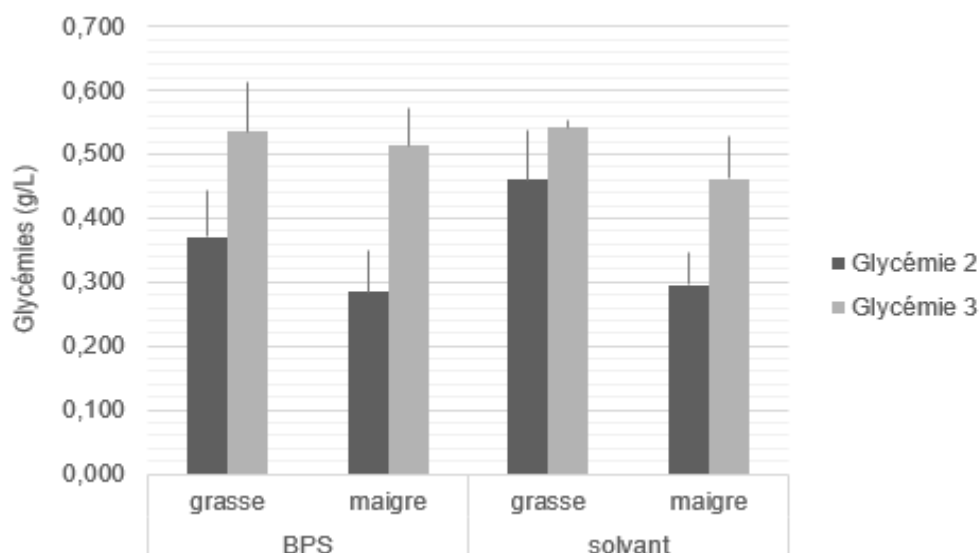


Figure 9 : Glycémies (moyenne  $\pm$  ET ; g/L) des 21 brebis à gestation gémellaire à 118 (Glycémie 2) et 132 jours (Glycémie 3) en fonction du traitement et du statut métabolique (BPS (5 maigres, 7 grasses), solvant (5 maigres, 4 grasses)).

Les glycémies augmentent significativement entre 118 et 132 jours de gestation ( $p < 0,001$ ). L'analyse de variance confirme un effet du statut métabolique avec une augmentation plus importante des glycémies chez les brebis grasses comparativement aux brebis maigres ( $p < 0,001$ ). En revanche, aucun effet du traitement sur les glycémies n'a été observé.

#### 3.4.4. Variation de l'insulinémie au cours de la gestation

Les Tableaux 13 et 14 présentent les insulinémies à 29-30 jours, 61-63 jours, 90-92 jours et à 133-135 j en fonction du statut métabolique (maigre, grasse), du type de gestation (simple, multiple) et du traitement reçu (BPS, solvant).

	Insulinémie 1		Insulinémie 2		Insulinémie 3		Insulinémie 4	
	Moyenne	ET	Moyenne	ET	Moyenne	ET	Moyenne	ET
BPS grasse	0,261 (n=11)	0,139	0,359 (n=11)	0,108	0,299 (n=11)	0,143	0,208 (n=9)	0,143
BPS maigre	0,181 (n=10)	0,068	0,151 (n=11)	0,092	0,126 (n=9)	0,074	0,083 (n=10)	0,059
Solvant grasse	0,311 (n=10)	0,191	0,323 (n=11)	0,187	0,293 (n=11)	0,180	0,213 (n=7)	0,115
Solvant maigre	0,164 (n=11)	0,102	0,196 (n=11)	0,074	0,179 (n=11)	0,078	0,071 (n=8)	0,036

Tableau 13 : Insulinémies (moyenne  $\pm$  ET ; ng/mL) des 43 brebis à 29-30j (Insulinémie 1), 61-63j (Insulinémie 2), 90-92j (Insulinémie 3) et au moment de l'abattage à 133-135j de gestation (Insulinémie 4) en fonction du traitement et du statut métabolique (BPS (11 maigres, 11 grasses), solvant (11 maigres, 11 grasses)).

	Insulinémie 1		Insulinémie 2		Insulinémie 3		Insulinémie 4	
	Moyenne	ET	Moyenne	ET	Moyenne	ET	Moyenne	ET
BPS simple	0,217 (n=8)	0,102	0,127 (n=8)	0,068	0,220 (n=8)	0,210	0,156 (n=5)	0,147
BPS multiple	0,223 (n=14)	0,125	0,227 (n=14)	0,108	0,208 (n=14)	0,095	0,137 (n=14)	0,119
Solvant simple	0,284 (n=7)	0,21	0,276 (n=7)	0,160	0,276 (n=7)	0,218	0,193 (n=5)	0,162
Solvant multiple	0,207 (n=14)	0,135	0,246 (n=14)	0,151	0,212 (n=14)	0,095	0,109 (n=10)	0,066

Tableau 14 : Insulinémies (moyenne  $\pm$  ET ; ng/mL) des 43 brebis à 29-30j (Insulinémie 1), 61-63j (Insulinémie 2), 90-92j (Insulinémie 3) et au moment de l'abattage à 133-135j (Insulinémie 4) en fonction du traitement et du type de gestation (BPS (8 simples, 14 multiples), solvant (7 simples, 14 multiples)).

Aucun effet du traitement (BPS ou solvant) sur l'insulinémie des brebis au cours de la gestation n'a été observé. Les brebis grasses ont une insulinémie significativement plus élevée que les femelles maigres ( $p < 0,001$ ). Le type de gestation a un effet sur l'insulinémie uniquement pour les femelles grasses ( $p = 0,002$ , ANOVA, post-hoc test de Tuckey).

Compte tenu de l'effet du nombre de fœtus sur le métabolisme, une analyse a été réalisée en ne prenant en compte que les gestations gémellaires. Les résultats sont présentés sur la Figure 10.

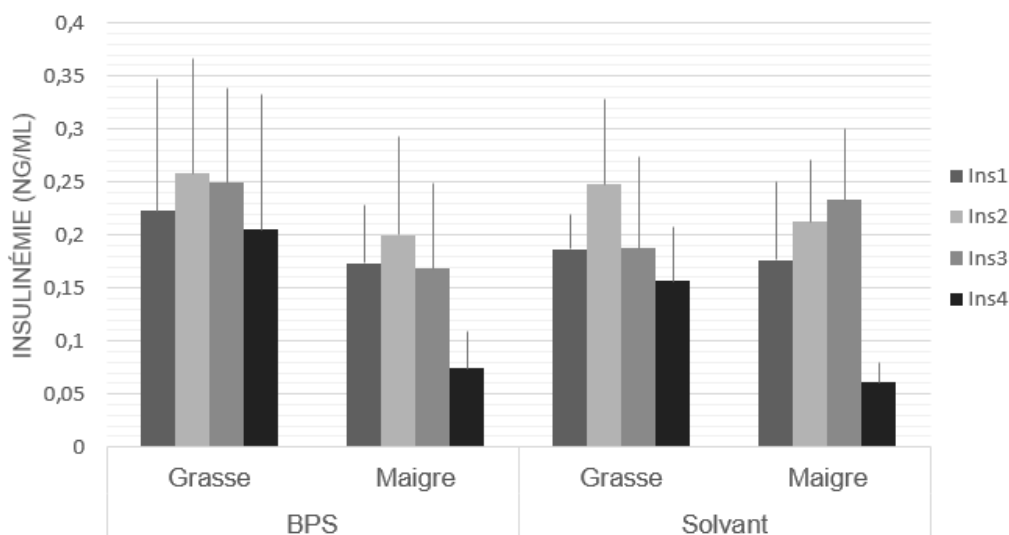


Figure 10 : Insulinémies (moyenne  $\pm$  ET ; g/L) des 21 brebis à gestation gémellaire, à 29-30 jours (Ins 1), à 61-63 jours (Ins 2), à 90-92 jours (Ins 3) et au moment de l'abattage à 133-135 jours de gestation (Ins 4) en fonction du traitement et du statut métabolique (BPS (5 maigres, 7 grasses), solvant (5 maigres, 4 grasses)).

Aucun effet du traitement sur l'évolution de l'insulinémie maternelle n'a été mis en évidence.

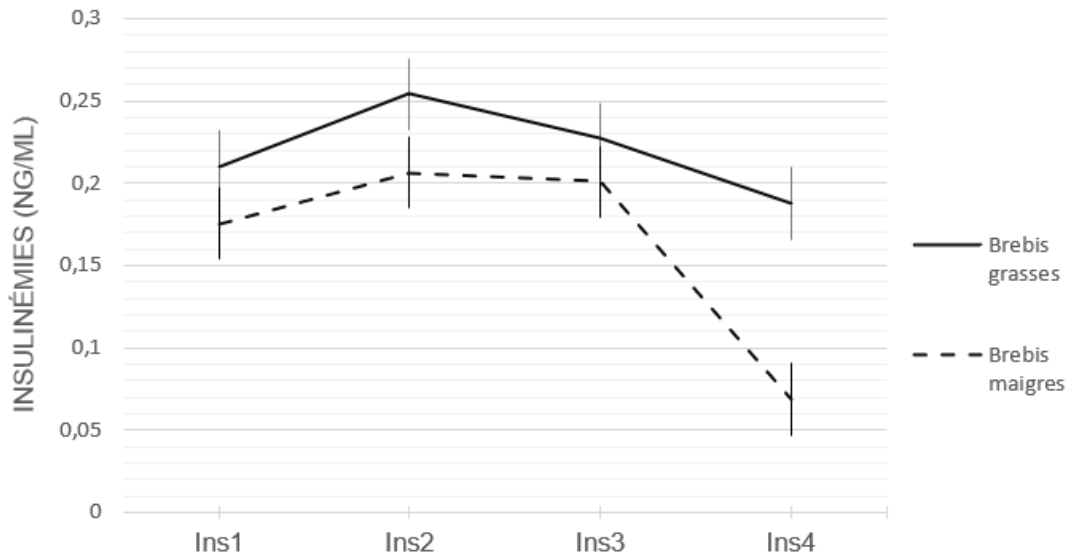


Figure 11 : Insulinémies (moyenne  $\pm$  ET ; ng/mL) sur 21 brebis à gestation gémellaire à 29-30 jours (Insulinémie 1), 61-63 jours (Insulinémie 2), 90-92 jours (Insulinémie 3) et au moment de l'abattage à 133-135 jours de gestation (Insulinémie 4), en fonction du statut métabolique (11 grasses, 10 maigres).

L'insulinémie des brebis grasses est plus élevée que celle des brebis maigres tout au long de la gestation ( $p=0,022$ ). De plus, dans les deux lots, l'insulinémie diminue de 30 à 50% entre 90-92 jours et 133-135 jours de gestation ( $p=0,004$ ).

### 3.5. Analyse des paramètres morphologiques fœtaux

#### 3.5.1. Effet du cathétérisme fœtal

Dans un premier temps, pour 28 gestations doubles ou triples (fœtus 1 et 2, quel que soit leur sexe), l'effet du cathétérisme sur les paramètres pondéraux (fœtus, foie et tissu adipeux) a été évalué par un test t apparié. Ces paramètres pondéraux n'ont pas été influencés par la chirurgie fœtale ( $p=0,763$  pour le poids du fœtus ;  $p=0,467$  pour le foie fœtal ; et  $p=0,497$  pour le tissu adipeux fœtal).

L'effet du cathétérisme a été évalué sur 13 gestations multiples en prenant en compte les fœtus de même sexe (mâle ou femelle). Les paramètres pondéraux (fœtus, foie et tissu adipeux) n'ont pas été influencés par la chirurgie fœtale (t-test apparié) ce qui signifie que la chirurgie fœtale en fin de gestation n'a pas eu d'influence sur la croissance terminale du fœtus.

#### 3.5.2. Paramètres pondéraux fœtaux

La Figure 12 décrit les poids des fœtus en fonction du traitement, du statut métabolique des mères, du sexe du fœtus et du nombre de fœtus de la portée.

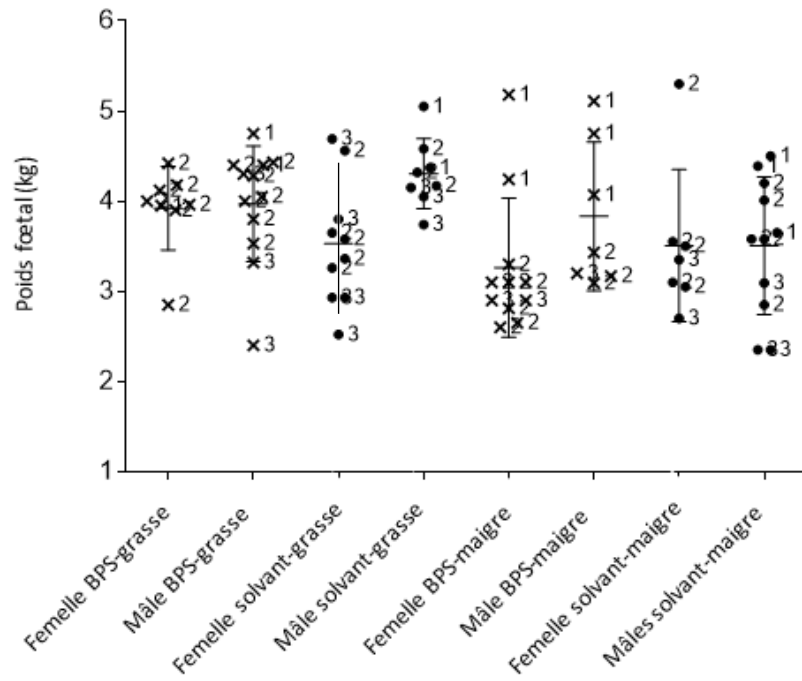


Figure 12 : Poids fœtaux (moyenne  $\pm$  ET ; kg ; n=75) en fonction du traitement et du statut métabolique des mères (BPS (11 maigres, 11 grasses), solvant (11 maigres, 10 grasses)), du sexe fœtal (37 femelles, 38 mâles) et du nombre de fœtus dans la portée (1,2,3).

L'inspection visuelle de la figure 12 montre que le poids des fœtus dépend du nombre de fœtus de la portée, les fœtus les plus légers correspondant aux portées doubles ou triples.

Pour évaluer l'effet du traitement et du statut métabolique sur des groupes homogènes, les fœtus issus de gestations simples et triples ont été exclus. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 13.

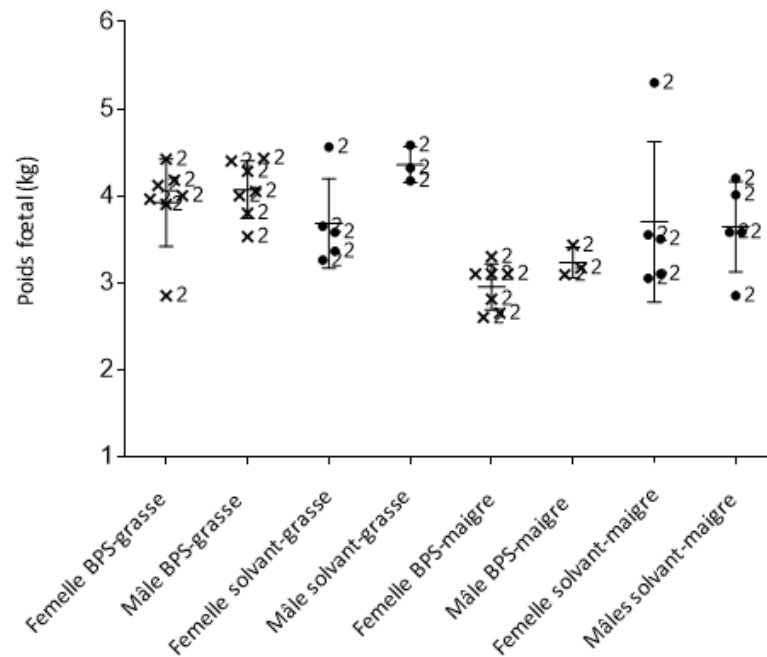


Figure 13 : Poids des 42 fœtus issus de gestation gémellaire (moyenne  $\pm$  ET ; kg) en fonction du traitement et du statut métabolique des mères (BPS (10 maigres, 14 grasses), solvant (10 maigres, 8 grasses)), du sexe fœtal (24 femelles, 18 mâles).

L'analyse ne prenant en compte que les gestations gémellaires, montre que les fœtus des brebis grasses ont un poids corporel significativement plus élevé que celui des brebis maigres ( $p=0,002$ ). Les fœtus mâles ont tendance à être plus gros que les fœtus femelles ( $p=0,082$ ). Les fœtus des brebis grasses ont un poids du foie significativement augmenté par rapport à ceux des brebis maigres, cet effet n'est toutefois plus observé quand la masse du foie est exprimée par kg de poids corporel, ce qui signifie que l'augmentation de la masse du foie est surtout liée à l'augmentation du poids corporel. Le foie des fœtus mâles est significativement plus gros que celui des femelles ( $p=0,003$ ) et cet effet tend à être significatif si le poids du foie est rapporté au poids corporel ( $p=0,053$ ). Le traitement BPS n'a pas eu d'effet sur la masse corporelle, du foie ou du tissu adipeux des fœtus.

Des analyses ont également été réalisées séparément pour les fœtus mâles et femelles. Chez les fœtus mâles et sur l'ensemble des gestations, la distance ano-génitale (anus-prépuce) diminue significativement avec le nombre d'agneaux de la portée ( $p=0,03$ ). Cet effet est lié à la diminution du poids corporel des fœtus mâles pour les portées multiples (ANOVA,  $p<0.001$ ).

En raison du biais lié à la répartition des fœtus femelles dans les groupes, seules les gestations gémellaires ont été prises en compte. Sur les fœtus femelles, ni le



traitement, ni le statut métabolique des mères n'ont eu de répercussion sur la distance anogénitale (clitoris-anus).

### 3.6. Réponse à l'hyperglycémie fœtale

La répartition des fœtus avec un cathéter fonctionnel au moment du test hyperglycémique, en fonction de la taille de la portée et du sexe, du traitement et du statut métabolique des mères est indiquée dans le Tableau 15. Les cathéters de deux fœtus n'étaient plus fonctionnels au moment du test de réponse à l'hyperglycémie. Ces fœtus issus de gestations triples ont donc été exclus des analyses.

Nombre de fœtus / sexe du fœtus cathétérisé	BPS		Solvant		Total
	Brebis maigres	Brebis grasses	Brebis maigres	Brebis grasses	
1	4 2F et 2M	2 1F et 1M	3 3M	2 2M	11 3F et 8M
2	5 2F et 3M	7 3F et 4M	5 2F et 3M	4 2F et 2M	21 9F et 12M
3	1 1F	1 1M	2 1F et 1M	3 1F et 2M	7 3F et 4M
<b>Total fœtus</b>	<b>n=10</b>	<b>n=10</b>	<b>n=10</b>	<b>n=9</b>	<b>n=39</b>

Tableau 15 : Répartition des fœtus cathétérisés en fonction de leur sexe et de la taille de portée et des groupes (statut physiologique, maigres ou grasses) ou traitement (solvant, BPS).

Le test fonctionnel de réponse insulinique à l'hyperglycémie fœtale a été réalisé avec un taux de perfusion de glucose différent selon les lots, de 32,5 mg/min pour le lot 1 *versus* 52 mg/min pour les lots 2,3,4. Cette modification est liée à une sous-estimation des poids fœtaux et à un réajustement du protocole après l'extraction des fœtus du lot 1.

De plus, en raison de l'hétérogénéité des poids des fœtus (influence du statut métabolique de la mère, du type de gestation et du sexe du fœtus ; confère partie 3.5.2), le taux de perfusion de glucose rapporté au poids du fœtus varie fortement d'un fœtus à l'autre (moyenne de  $12,59 \pm 4,06$  mg/kg/min pour des valeurs extrêmes allant de 6,1mg/kg/min à 22,1mg/kg/min). Les fœtus issus de gestations simples ont reçu en moyenne  $10,08 \pm 2,75$  mg de glucose par kg/min, ceux issus de

gestations doubles,  $13,27 \pm 3,89$  mg/kg/min et ceux issus de gestation triples,  $15,23 \pm 4,59$  mg/kg/min.

Pour pallier à ce biais, les analyses de glycémie et d'insulinémie fœtales n'ont été réalisées que sur les gestations gémellaires pour lesquelles les taux de perfusion de glucose étaient suffisamment homogènes (entre 10 et 20 mg/kg/min) excluant 5 fœtus des analyses.

### 3.6.1. Analyse de la gazométrie fœtale

Avant la réalisation du test fonctionnel de réponse à l'hyperglycémie, du sang fœtal a été prélevé pour évaluer les gaz du sang, et en particulier la PO<sub>2</sub>, les concentrations ioniques et le taux d'hémoglobine. La mesure des gaz du sang fœtal a permis de sélectionner les fœtus normoxémiques pour l'analyse de l'épreuve d'hyperglycémie.

L'évaluation de la PO<sub>2</sub> a permis d'identifier 5 fœtus en hypoxie (PO<sub>2</sub> <20mmHg) qui ont été exclus des analyses, dont un issu d'une gestation gémellaire. Deux autres fœtus ont été exclus en raison d'apnée prolongée des brebis au cours de la chirurgie de cathétérisation (en raison des conséquences possibles sur la physiologie fœtale).

Le Tableau 16 présente les valeurs de gaz du sang des 14 fœtus cathétérisés issus de gestation gémellaire et inclus dans les analyses du test fonctionnel hyperglycémique, en fonction du traitement et du statut métabolique.

Nombre de fœtus cathétérisés	BPS		SOLVANT		Total
	Brebis maigres	Brebis grasses	Brebis maigres	Brebis grasses	
	5 2F et 3M	4 1F et 3M	2 1F et 1M	3 2F et 1M	
<b>pH</b>	7,396±0,023	7,430±0,026	7,4±0,014	7,41±0,030	
<b>PO<sub>2</sub> (mmHg)</b>	25,400±2,881	25,500±2,082	27,000±4,243	20,667±0,577	
<b>PCO<sub>2</sub> (mmHg)</b>	43,400±1,949	43,500 ±3,416	44,000±1,414	43,000±1,000	
<b>tCO<sub>2</sub> (mmol/L)</b>	25,340±1,993	27,350±1,808	25,950±0,071	25,900±1,873	
<b>HCO<sub>3</sub> (mmol/L)</b>	24,140±1,939	26,125±1,717	24,7±0,141	24,700±1,873	
<b>tHb (g/dL)</b>	10,080±0,581	11,650±1,694	11,55±1,202	13,100±0,693	

Tableau 16 : Gaz du sang (moyenne ± ET) des 14 fœtus cathétérisés issus de gestation gémellaires et inclus dans l'analyse du test hyperglycémique en fonction du type de traitement et du statut métabolique.

L'analyse de variance montre qu'il n'y a pas d'effet du traitement, du statut métabolique ou de leurs interactions sur le pH, le TCO<sub>2</sub>, la pO<sub>2</sub> et les concentrations sanguines en potassium et en chlorure.

Le taux d'hémoglobine est significativement plus élevé chez les fœtus de brebis grasses ( $p=0,033$ ) comparativement aux maigres, et chez les brebis n'ayant reçu que du solvant ( $p=0,043$ , ANOVA) comparativement aux brebis traitées.

### 3.6.2. Analyses des réponses glycémique et insulinémique fœtales à un challenge hyperglycémique

N'ont été pris en compte pour le challenge hyperglycémique que les fœtus normoxémiques, avec un cathéter fonctionnel au moment du test et ayant reçu du glucose à un taux de perfusion entre 10 et 20 mg/kg/min.

Les moyennes des taux de perfusion de glucose administrées aux fœtus cathétérisés pour les quatre groupes de l'étude (« grasses BPS », « grasses solvant », « maigres BPS », « maigres solvant ») au cours du challenge hyperglycémique sont présentées sur la figure 14.

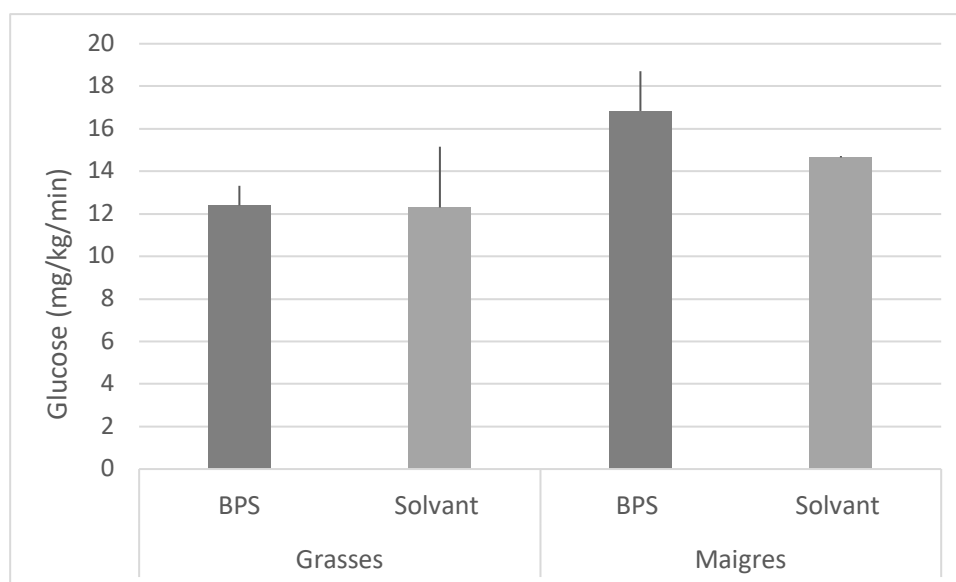


Figure 14 : Taux de perfusion de glucose (moyenne  $\pm$  ET ; mg/kg/min ;  $n=14$ ) rapportés au poids du fœtus au cours du challenge hyperglycémique pour les fœtus cathétérisés issus de gestation gémellaire et normoxémiques, en fonction du statut métabolique et du traitement (solvant (2 de mère maigre et 3 de mère grasse), BPS (5 de mère maigre et 4 de mère grasse)).

Le groupe de fœtus issus des brebis maigres a reçu un taux de perfusion de glucose rapporté au poids du fœtus significativement plus important que ceux issus des

femelles grasses ( $p=0,008$ ). Cela s'explique par le fait que les fœtus issus de mères maigres ont un poids significativement plus faible que ceux issus de mères grasses (confère partie 3.5.2).

### 3.6.3. Détermination de la période basale et du plateau hyperglycémique

Les figures 15 et 16 présentent l'évolution moyenne de la glycémie et de l'insulinémie au cours du challenge hyperglycémique dans les différents groupes de fœtus.

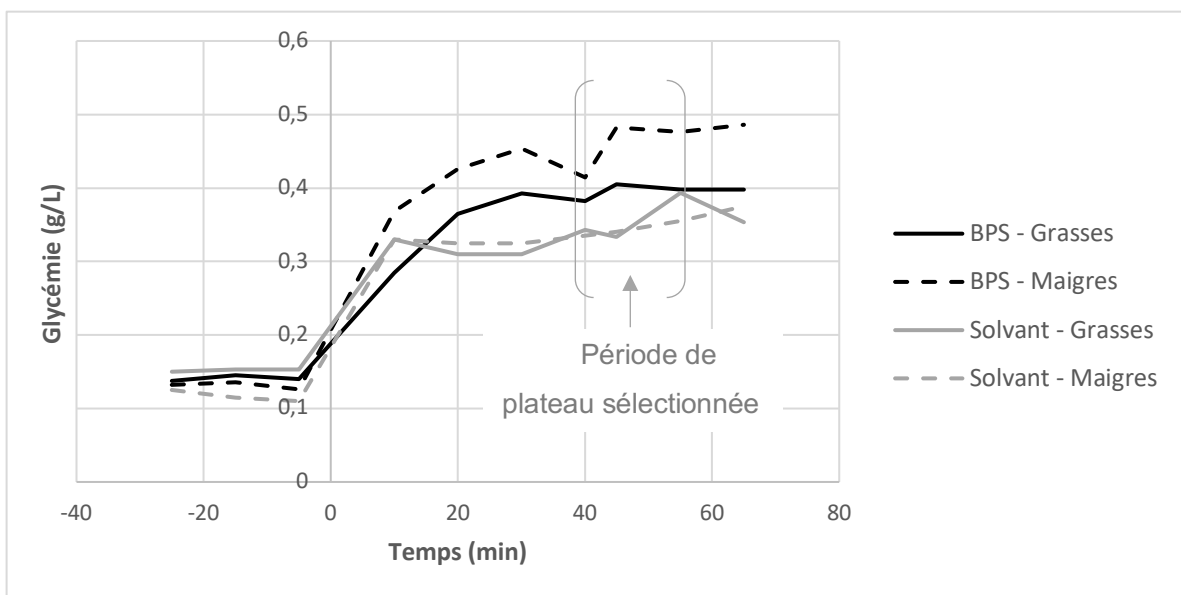


Figure 15 : Glycémie fœtale (moyenne ; g/L) au cours de l'épreuve hyperglycémique chez 14 fœtus cathétérisés issus de gestation gémellaire et normoxémiques en fonction du statut métabolique et du traitement (solvant (2 maigres, 3 grasses), BPS (5 maigres, 4 grasses)).

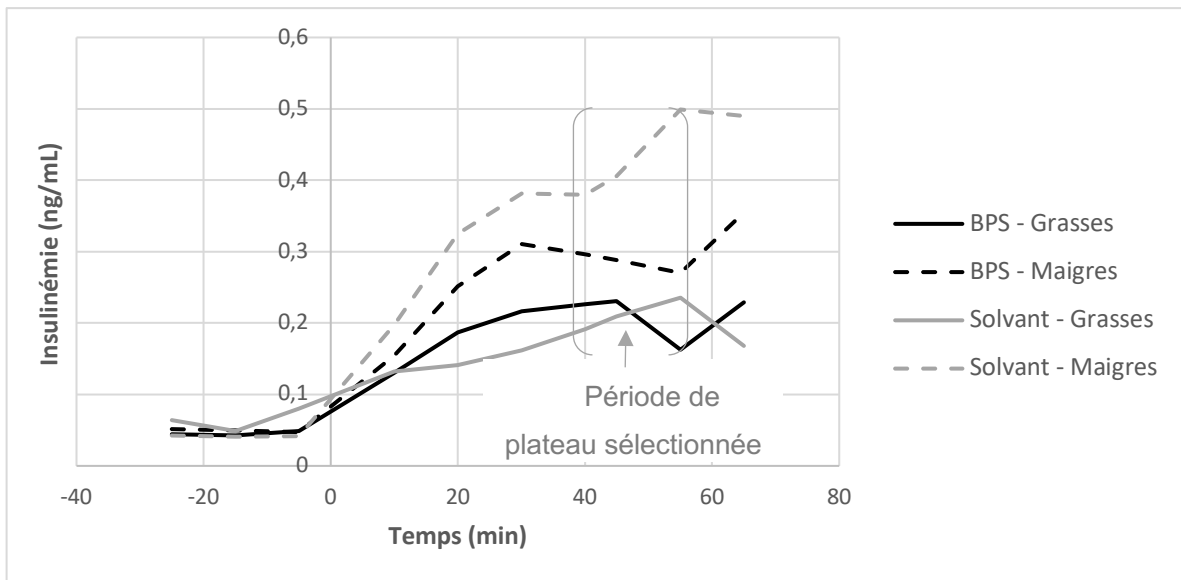


Figure 16 : Insulinémie fœtale (moyenne ; ng/mL) au cours de l'épreuve hyperglycémique chez 14 fœtus cathétérés issus de gestation gémellaire et normoxémiques en fonction du statut métabolique et du traitement (solvant (2 maigres, 3 grasses), BPS (5 maigres, 4 grasses)).

L'observation de ces figures nous a permis de définir deux périodes : (1) basale (3 prélèvements juste avant la perfusion de glucose), (2) plateau hyperglycémique (40, 45, 55 minutes après le début de la perfusion).

#### 3.6.4. Glycémie et insulinémie basales

Les Figures 17 et 18 présentent les moyennes de glycémie et d'insulinémie basales pour chaque groupe de fœtus.

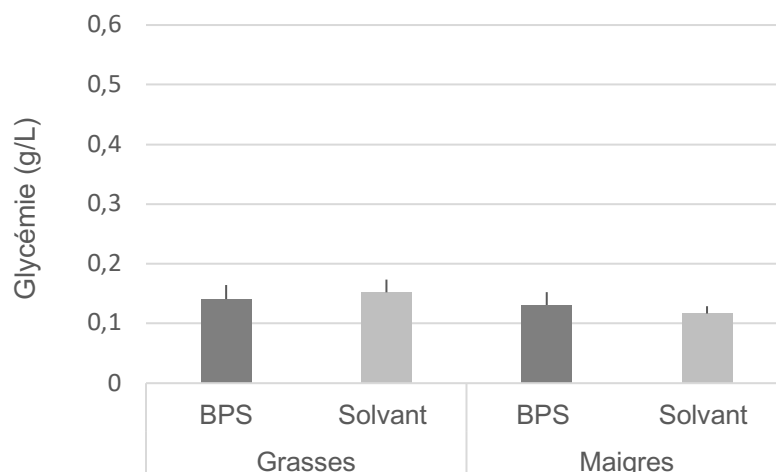


Figure 17 : Glycémie fœtale (moyenne  $\pm$  ET ; g/L) en période basale chez les 14 fœtus cathétérés issus de gestation gémellaire et normoxémiques en fonction du statut métabolique et du traitement (solvant (2 maigres, 3 grasses), BPS (5 maigres, 4 grasses)).

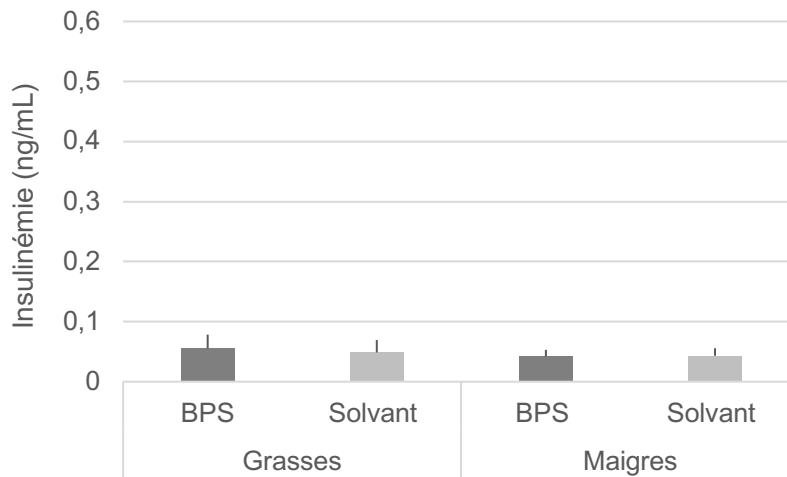


Figure 18 : Insulinémie fœtale (moyenne  $\pm$  ET ; ng/mL) en période basale chez les 14 fœtus cathétérisés issus de gestation gémellaire et normoxémiques en fonction du statut métabolique et du traitement (solvant (2 maigres, 3 grasses), BPS (5 maigres, 4 grasses))

La glycémie basale des fœtus issus de mères grasses tend à être supérieure à celle des fœtus de brebis maigres ( $0,146 \pm 0,021$ g/L,  $n=7$  versus  $0,127 \pm 0,018$ g/L,  $n=7$ ,  $p = 0,06$ ).

L'insulinémie basale des fœtus issus des brebis grasses n'est pas significativement différente de celles du groupe des brebis maigres (respectivement  $0,052 \pm 0,021$ ng/mL ( $n=11$ ) versus  $0,038 \pm 0,012$ ng/mL ( $n=11$ ), NS). Le traitement BPS n'a pas eu d'effet significatif sur la glycémie et l'insulinémie basales fœtales (ANOVA).

### 3.6.5. Glycémie et insulinémie fœtales lors du challenge hyperglycémique

Les Figures 19 et 20 présentent les moyennes de glycémie et d'insulinémie en réponse au challenge hyperglycémique, pour chaque groupe de fœtus.

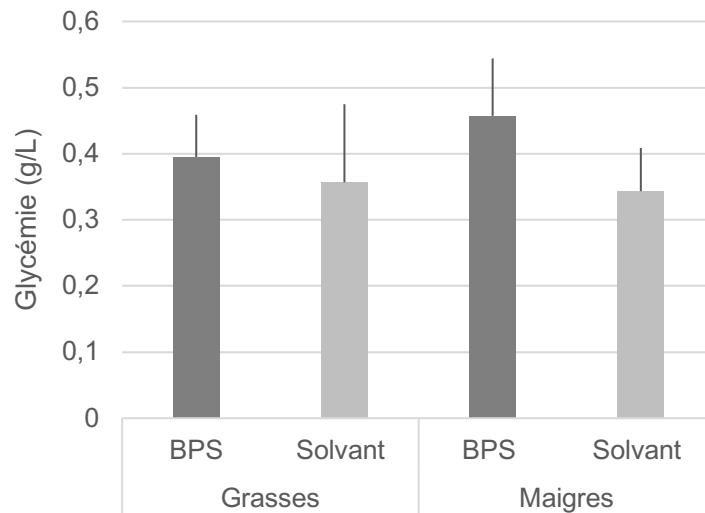


Figure 19 : Glycémie fœtale (moyenne  $\pm$  ET ; g/L) lors du challenge hyperglycémique chez les 14 fœtus cathétérisés issus de gestation gémellaire et normoxémiques en fonction du statut métabolique et du traitement (solvant (2 maigres, 3 grasses), BPS (5 maigres, 4 grasses)).

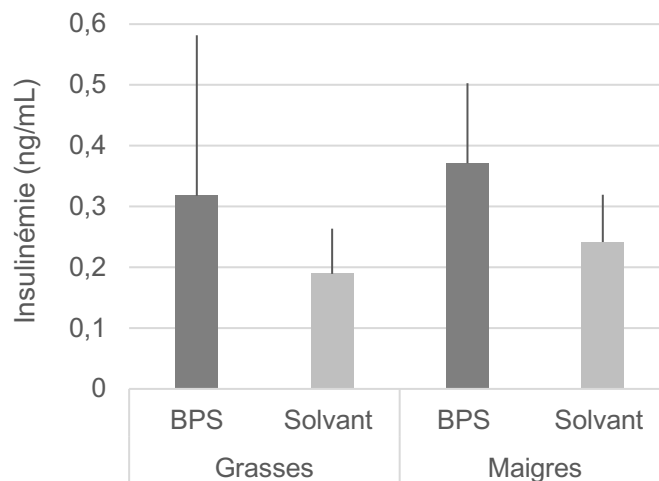


Figure 20 : Insulinémie fœtale (moyenne  $\pm$  ET ; ng/mL) lors du challenge hyperglycémique chez les 14 fœtus cathétérisés issus de gestation gémellaire et normoxémiques en fonction du statut métabolique et du traitement (solvant (2 maigres, 3 grasses), BPS (5 maigres, 4 grasses))

L'analyse statistique des glycémies fœtales au plateau n'a pas montré d'effet significatif ni du traitement, ni du statut métabolique. Ainsi, malgré les différences de taux de perfusion de glucose entre les groupes « grasses » et « maigres » (confère partie 3.6.2.), les glycémies durant la période de plateau sont similaires, ce qui permet de comparer la réponse insulinémique à l'hyperglycémie entre les groupes.

La réponse insulinique à l'hyperglycémie est plus faible chez les fœtus issus de brebis grasses que pour ceux issus des brebis maigres ( $0,288 \pm 0,225$ ng/mL,  $n=11$  versus  $0,352 \pm 0,115$ ng/mL  $p=0,047$ ).

L'insulinémie au plateau n'est pas influencée par le traitement ( $0,361 \pm 0,203$ ng/mL pour le lot traité au BPS,  $n=10$  versus  $0,247 \pm 0,079$ ng/mL pour le lot témoin,  $p=0,741$ ).

## 4. Discussion

Malgré son utilisation largement répandue dans divers produits du quotidien et l'exposition ubiquitaire au BPS, peu d'études *in vivo* ont évalué son impact sur la santé humaine, notamment au cours de la période critique de la grossesse. Pourtant, les études *in vitro* et les quelques études *in vivo* indiquent qu'il présente un potentiel de perturbateur endocrinien similaire à celui du BPA (13–16). Dans ce contexte, nous avons évalué **la réponse métabolique fœtale à une exposition chronique *in utero* au BPS à faible dose en fonction du statut métabolique des brebis (maigres ou grasses)**, afin de déterminer si la substitution du BPA par le BPS est une alternative acceptable en termes de santé humaine.

Les 4 groupes de 11 à 12 brebis primipares étaient âgées d'environ 800 jours au moment de la mise à la reproduction. Au moment de leur mise à la reproduction, les brebis grasses étaient âgées de 50 jours de plus que les femelles maigres, mais cette différence n'a pas de signification biologique et les groupes sont considérés comme homogènes.

Le traitement au BPS a été réalisé quotidiennement pendant 103 jours par voie sous-cutanée. Le choix d'une voie extravasculaire est justifié pour plusieurs raisons : [1] elle entraîne des variations temporelles de concentrations plasmatiques moins importantes que la voie intraveineuse en raison de l'impact du processus d'absorption sur les cinétiques temporelles de concentration (1). [2] la voie orale chez les ruminants n'est pas pertinente vis-à-vis de l'homme. Par ailleurs, ce schéma d'administration, pendant presque toute la durée de la gestation, permet de reproduire une exposition fœtale environ 2000 fois supérieure à une exposition humaine environnementale (36).

Aucun effet du statut métabolique et de la période de gestation n'a été mis en évidence sur les concentrations plasmatiques de BPS-G, ce qui permet de conclure que le BPS ne s'accumule pas chez la mère et que la teneur en graisse n'influence pas la toxicocinétique du BPS. De même, aucun effet du statut métabolique de la mère sur l'exposition fœtale au BPS-G n'a été démontré, à la fois dans le sang fœtal et dans le liquide amniotique.

Comme attendu, les concentrations plasmatiques fœtales en BPS-G sont 30 fois plus élevées que les concentrations maternelles ou amniotiques, ce qui montre son accumulation dans le compartiment fœtal. Cette accumulation est due au passage fœto-maternel du BPS-G quasi-inexistant. Ainsi, l'élimination du BPS-G du



compartiment fœtal nécessite sa réactivation en BPS. Une activité glucuronidase est en effet présente dans le compartiment fœtal, notamment dans le liquide amniotique (34). Par ailleurs, compte tenu du transfert materno-fœtal du BPS-G très limité, le BPS-G du compartiment fœtal provient du métabolisme fœtal du BPS, comme cela a été démontré précédemment sur ce modèle de la brebis gravide en fin de gestation (1).

Les régimes alimentaires différenciés en termes d'énergie ont permis d'obtenir deux groupes de brebis avec une différence de poids corporel moyen de 15 kg au moment de la mise à la reproduction et de 25 kg en fin de gestation. De plus, les NEC ont été évaluées autour de 2/5 chez les brebis maigres et autour de 4/5 chez les brebis grasses. D'une façon générale, l'état corporel des brebis grasses a continué d'augmenter au cours de la gestation, alors que celui des femelles maigres est resté stable. Il a été montré dans des études précédentes que l'augmentation de 30 à 50% des besoins énergétiques maternels au cours de la gestation peut être compensée soit par un apport exogène plus important, soit par des adaptations métaboliques (19). Nous n'avons pas augmenté les apports alimentaires exogènes des brebis maigres. En effet, aucune perte de poids corporel supérieure à 4 kg ni chute de plus de 0,75/5 points de NEC n'ont été observées, signant un niveau de nutrition suffisant pour toutes les brebis (20). Au contraire, une augmentation individuelle des poids corporels a été observée pour tous les lots, notamment en fin de gestation.

Nous n'avons pas pu évaluer l'effet du type de gestation (simple ou multiple) sur l'évolution du poids des brebis en raison de l'hétérogénéité de la répartition du nombre de fœtus entre les lots. Lors de gestations multiples et malgré le poids supplémentaire du deuxième voire troisième *conceptus*, les brebis à gestation multiple ont généralement une prise de poids limitée en raison de leur capacité d'ingestion diminuée comparativement à celles ne portant qu'un seul fœtus (21). Cependant, dans notre étude, les apports énergétiques de la ration provenaient principalement de l'aliment composé dont la distribution au cornadis garantissait une ingestion individuelle similaire pour toutes les brebis.

Par ailleurs, pour les gestations gémellaires, aucun effet du traitement sur l'évolution des poids corporels des brebis n'a été mis en évidence, ce qui permet de considérer le statut métabolique des deux lots maigres et grasses, comme indépendant du traitement.

Différents marqueurs métaboliques maternels, AGNE,  $\beta$ -OH, glycémie, insulïnémie, ont été évalués régulièrement au cours de la gestation.

Les AGNE proviennent essentiellement de l'hydrolyse de triglycérides du tissu adipeux par la lipase hormono-sensible. La régulation de cette lipase et par voie de conséquence la libération d'AGNE sériques, sont activées en réponse à un bilan énergétique négatif. Ainsi, les AGNE constituent de bons marqueurs de l'état nutritionnel énergétique des ruminants d'élevage dont l'utilisation est très répandue (22). Lors d'un processus de lipomobilisation, AGNE et triglycérides entrent dans une chaîne de réaction de  $\beta$ -oxydation par le foie. En cas de déficit de précurseurs glucogéniques (acides gras volatils produits par la rumination), l'oxydation est partielle et produit des corps cétoniques dont les  $\beta$ -hydroxybutyrates ( $\beta$ -OH) (24).

Les AGNE sont les marqueurs précoces de déficit énergétique, suivis des  $\beta$ -OH, et leur évaluation quantitative est plus objective que le poids corporel et l'évolution des NEC.

Compte tenu de l'influence de la taille des portées sur les variations de ces marqueurs (23) et de la répartition non homogène des gestations simples, gémellaires et triples dans les différents lots, l'analyse a été limitée aux gestations gémellaires, ce qui a réduit considérablement la taille des lots (de 43 à 21).

L'augmentation des concentrations de  $\beta$ -OH, AGNE en fin de gestation est physiologique et n'indique pas nécessairement un défaut d'apport énergétique (19). Les valeurs des deux marqueurs sont plus élevées chez les brebis grasses, ce qui reflète une lipomobilisation plus importante que chez les brebis maigres dont les réserves adipeuses sont très limitées. Ces deux résultats sont cohérents avec les données de la littérature (23). Aucun effet du traitement au BPS sur les AGNE n'a été mis en évidence, contrairement aux  $\beta$ -OH. En effet, les concentrations sanguines en  $\beta$ -OH augmentent en fin de gestation chez les brebis traitées au BPS, tandis qu'elles restent stables chez les femelles témoins. Ces résultats indiquent que le BPS pourrait induire une modification de l'homéostasie lipidique, comme cela a été démontré chez le rongeur (25). Cependant, la production de  $\beta$ -OH résulte de l'oxydation hépatique des AGNE. Ainsi, l'absence d'effet du traitement BPS sur les concentrations d'AGNE sériques et l'évolution des NEC interroge sur la signification biologique de l'effet du BPS sur les  $\beta$ -OH.

L'insulinémie et la glycémie chez les brebis ont été mesurées à quatre reprises au cours de la gestation (29-30 jours, 61-63 jours, 90-92 jours et 133-135 jours de gestation). Les glycémies et insulinémies des brebis grasses sont significativement supérieures à celles des brebis maigres. Ce résultat est en accord avec ceux de Rumball, H et al., 2008 (21), qui ont mis en évidence une diminution de ces marqueurs

chez des brebis subissant une période de malnutrition, comparativement à des brebis dont les besoins énergétiques sont entièrement couverts. Les femmes enceintes présentant de l'obésité ont un taux plus élevé d'insulinorésistance, en particulier en début de grossesse (26). Ainsi, pour compenser la plus faible réponse cellulaire à l'insuline, l'organisme produit une quantité plus importante de cette molécule, ce qui conduit à une augmentation des concentrations plasmatiques en insuline. Ce mécanisme d'insulinorésistance pourrait être responsable de l'augmentation de l'insulinémie chez les brebis grasses.

Le nombre de fœtus modifie également le statut métabolique des femelles. Dans notre étude, les brebis à gestation multiple ont des glycémies significativement plus faibles que les brebis à gestation simple, ce qui est en accord avec les données de la littérature (21, 23).

Les profils d'insulinémie montrent une augmentation de l'insulinémie jusqu'à 60 jours de gestation environ, suivie d'une diminution au-delà de 90 jours de gestation. Des profils similaires ont été observés sur des brebis croisées Finn × dorset, avec une augmentation des concentrations d'insuline entre 70 et 100 jours de gestation, puis une diminution à partir du 105<sup>ème</sup> jour de gestation (27). Ces modifications sont liées à la variation des besoins énergétiques au cours de la gestation. En effet, l'organisme stocke des graisses en début de gestation, période pendant laquelle la croissance du fœtus ne nécessite pas trop d'énergie et que la capacité d'ingestion de la mère n'est pas limitée par l'encombrement utérin, lui-même dépendant du nombre de fœtus. En fin de gestation, les besoins énergétiques ne peuvent pas être couverts intégralement par l'apport alimentaire. La mobilisation des graisses (néoglucogenèse) constitue une source importante de substrats énergétiques, les acides aminés et le glucose étant dirigés préférentiellement vers le fœtus (21).

Aucun effet du traitement (BPS ou solvant) n'a été observé sur les variations de glycémie et d'insulinémie au cours de la gestation.

L'état métabolique des femelles peut également influencer la croissance du fœtus. Notre étude a montré que les fœtus issus de mères grasses sont plus lourds que ceux issus de mères maigres et les fœtus issus de gestation simple sont plus lourds que ceux issus de gestation multiple. Ces données sont en accord avec les études précédentes (Pesantez-Pacheco, 2019) (24). En revanche, le traitement BPS n'a pas affecté le poids des fœtus ovins. En accord avec ce résultat, une méta-analyse évaluant l'effet du BPA sur le poids à la naissance du nouveau-né dans l'espèce

humaine a conclu qu'il n'était pas possible d'affirmer que le BPA influençait négativement le poids de naissance (35). Ainsi, l'absence d'effet du BPS dans notre étude expérimentale, sur un nombre limité de brebis, avec différents facteurs de variation, dont le statut métabolique des mères et la taille de la portée, n'est pas étonnant.

De la même façon, aucun effet du traitement BPS n'a été observé à la fois sur les glycémies et les insulinémies basales et sur la réponse insulinémique à l'hyperglycémie. En revanche, le statut métabolique de mères modifie le statut métabolique des fœtus. Ainsi, les fœtus issus de mères grasses ont une glycémie qui tend à être significativement plus élevée que ceux issus de mères maigres. Ce résultat est en accord avec une étude de Romball et al., 2008 (19).

Le passage du glucose de la mère au fœtus se fait par diffusion facilitée et nécessite la présence de transporteurs placentaires spécifiques saturables, Glut-1 et Glut-3, présents dans les cellules endothéliales fœtales et dans les membranes du syncytiotrophoblaste chez les ovins (37).

Pour la réalisation du test hyperglycémique, seuls les fœtus qui ont reçu un taux de perfusion de glucose entre 10 et 20 mg/kg/min ont été sélectionnés pour les analyses. Cependant, compte tenu du plus faible poids des fœtus issus de brebis maigres, comparativement à ceux issus de brebis grasses, le taux de perfusion de glucose est significativement plus élevé chez les fœtus issus de brebis maigres. Ces différences de taux de perfusion n'ont pas eu de répercussion sur les glycémies mesurées au cours de la période de plateau du challenge hyperglycémique. Ce résultat peut être expliqué par le fait que les fœtus issus des brebis grasses avaient déjà des glycémies plus élevées que ceux issus de brebis maigres en période basale. Une autre hypothèse est que les fœtus issus de brebis grasses développent un syndrome de résistance à l'insuline, caractérisé notamment par une diminution de la captation du glucose, ce qui conduirait *in fine* à un niveau de glycémie similaire à celui des fœtus issus des brebis maigres.

En effet, lors d'élévation de la glycémie, différents mécanismes sont mis en œuvre pour la diminuer. Les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans du pancréas sont sensibles à l'élévation de la glycémie, qui provoque la libération d'insuline. L'insuline en retour favorise la pénétration du glucose dans toutes les cellules de l'organisme en augmentant la perméabilité de leur membrane plasmique. Ce mécanisme, très rapide, pourrait survenir dans notre challenge hyperglycémique. Il est surtout observé dans les tissus adipeux et musculaires. Le mécanisme d'entrée du glucose dans les cellules

fait intervenir un transporteur de type GluT (transporteur du glucose). Les deux principaux transporteurs de glucose sont :

- GluT2 localisé dans l'intestin, le foie, le rein et les cellules  $\beta$  du pancréas. Il possède une activité proportionnelle à la glycémie.
- GluT4 localisé dans les muscles, le cœur et le tissu adipeux.

En outre, l'insuline agit sur le métabolisme des glucides en favorisant la mise en réserve de glucose sous forme de glycogène dans le foie, par amplification de la glycogénèse et inhibition de la néoglucogénèse. Ce mécanisme ne peut pas être évalué dans notre challenge hyperglycémique sur plusieurs dizaines de minutes.

Dans notre étude, les fœtus issus de brebis grasses ont une glycémie plus élevée que ceux issus de brebis maigres, et leur réponse insulinaire à une hyperglycémie est plus faible. Ce tableau traduit une dérégulation du métabolisme glucidique fœtal induit par l'état de subcétose des mères.

Toutefois, notre stratégie expérimentale présente certaines limites. En effet, cette étude évalue l'effet du BPS sur un groupe de brebis maigres et un groupe de brebis grasses mais elle n'a pas inclus de groupe témoin avec un niveau alimentaire adapté, ce qui limite l'interprétation des résultats par rapport à un statut métabolique normal.

La principale limite de notre étude est la variabilité du nombre de fœtus par portée et l'hétérogénéité de leur répartition dans les groupes, ce qui nous a obligées à réaliser la plupart des analyses sur les gestations gémellaires. En outre, nous avons dû écarter quelques fœtus en raison d'un taux de perfusion de glucose inadapté et seulement deux fœtus pour des problèmes de perméabilité des cathéters. Ces conditions ont réduit la puissance de nos observations, notamment pour le test fonctionnel réalisé uniquement sur les fœtus cathétérisés.

## Conclusion

Notre étude n'a pas mis en évidence d'effet du bisphénol S sur les métabolismes glucidiques foetal et maternel après une exposition sur des brebis gravides pendant une durée de 103 jours. Cependant, les résultats suggèrent une influence du BPS sur l'homéostasie lipidique des mères en fin de gestation, avec une mobilisation lipidique plus importante chez les femelles traitées.

Cela signifie que le BPS ne présente pas d'effet perturbateur endocrinien sur le fœtus, contrairement au BPA. En effet, le BPA modifie la production d'adipokines qui jouent un rôle important dans la résistance à l'insuline, ce qui explique son effet obésogène.

Notre étude pourrait être poursuivie sur un nombre plus important d'animaux, en sélectionnant auparavant les brebis à gestation gémellaire. Des études supplémentaires pourraient être réalisées sur le pancréas pour évaluer l'expression des facteurs qui régulent la sécrétion d'insuline.

Enfin, notre étude a mis en évidence l'impact du statut métabolique maternel (maigre/gras) sur le métabolisme énergétique foetal et les caractéristiques pondérales foetales.

## Références bibliographiques

- (1) GRANDIN, Flore, 2018. Développement d'une approche intégrative pour évaluer l'exposition interne foetale au Bisphénol S. Doctorat de l'université de Toulouse. INP Toulouse UMR 1331 Toxalim.
- (2) VANDENBERG, Laura N., HAUSER, Russ, MARCUS, Michele, OLEA, Nicolas et WELSHONS, Wade V, 2007. Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reproductive Toxicology*. Vol. 24, n° 2, pp. 139-177.
- (3) VIÑAS, René et WATSON, Cheryl, 2013. Bisphenol S Disrupts Estradiol-Induced Nongenomic Signaling in a Rat Pituitary Cell Line: Effects on Cell Functions. *Environmental Health Perspectives*. Vol. 121, n° 3, pp. 352-358.
- (4) LE MAGUERESSE-BATTISTONI, Brigitte, MULTIGNER, Luc, BEAUSOLEIL, Claire, ROUSSELLE, Christophe, 2018. Effects of bisphenol A on metabolism and evidences of a mode of action mediated through endocrine disruption. *Molecular and Cellular Endocrinology*. Vol. 475, pp. 74-91.
- (5) GRIGNARD, Elise, LAPENNA, Silvia et BREMER, Susanne, 2012 Weak estrogenic transcriptional activities of Bisphenol A and Bisphenol S. *Toxicology in Vitro*. Vol. 26, n° 5, pp. 727-731.
- (6) LOI n° 2012-1442 du 24 décembre 2012 visant à la suspension de la fabrication, de l'importation, de l'exportation et de la mise sur le marché de tout conditionnement à vocation alimentaire contenant du bisphénol A. 2012.
- (7) KURUTO-NIWA, Ryoko, NOZAWA, Ryushi, MIYAKOSHI, Takashi, SHIOZAWA, Tatsushi et TERAQ, Yoshiyasu. 2005. Estrogenic activity of alkylphenols, bisphenol S, and their chlorinated derivatives using a GFP expression system. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. Vol. 19, n° 1, pp. 121-130.
- (8) WU, Liu-Hong, ZHANG, Xue-Mei, WANG, Fei, GAO, Chong-Jing, CHEN, Da, PALUMBO, Jillian R., GUO, Ying et ZENG, Eddy Y, 2018. Occurrence of bisphenol S in the environment and implications for human exposure: A short review. *Science of The Total Environment*. Vol. 615, pp. 87-98.
- (9) YE, Xiaoyun, WONG, Lee-Yang, KRAMER, Josh, ZHOU, Xiaoliu, JIA, Tao et CALAFAT, Antonia M. Urinary Concentrations of Bisphenol A and Three Other Bisphenols in Convenience Samples of U.S. Adults during 2000–2014. *Environmental Science & Technology*. 6 octobre 2015. Vol. 49, n° 19, pp. 11834-11839.
- (10) LIU, Jiaying, LI, Jingguang, WU, Yongning, ZHAO, Yunfeng, LUO, Fengji, LI, Shuming, YANG, Lin, MOEZ, Elham K., DINU, Irina et MARTIN, Jonathan W. Bisphenol A Metabolites and Bisphenol S in Paired Maternal and Cord Serum. *Environmental Science & Technology*. 21 février 2017. Vol. 51, n° 4, pp. 2456-2463.
- (11) SHI, Mingxin, WHORTON, Allison E, SEKULOVSKI, Nikola, MACLEAN, James A et HAYASHI, Kanako. Prenatal Exposure to Bisphenol A, E, and S Induces Transgenerational Effects on Female Reproductive Functions in Mice. *Toxicological Sciences*. 1 août 2019. Vol. 170, n° 2, pp. 320-329.
- (12) DESMARCHAIS, Alice, TÉTEAU, Ophélie, PAPILLIER, Pascal, JAUBERT, Manon, DRUART, Xavier, BINET, Aurélien, MAILLARD, Virginie et ELIS, Sebastien. Bisphenol S Impaired In Vitro Ovine Early Developmental Oocyte Competence. *International Journal of Molecular Sciences*. 12 février 2020. Vol. 21, n° 4, pp. 1238.

- (13) BRULPORT, Axelle, VAIMAN, Daniel, CHAGNON, Marie-Christine et LE CORRE, Ludovic. Obesogen effect of bisphenol S alters mRNA expression and DNA methylation profiling in male mouse liver. *Chemosphere*. Février 2020. Vol. 241, pp. 125092.
- (14) REZG, Raja, ABOT, Anne, MORNAGUI, Bessem et KNAUF, Claude. Bisphenol S exposure affects gene expression related to intestinal glucose absorption and glucose metabolism in mice. *Environmental Science and Pollution Research*. février 2019. Vol. 26, n° 4, pp. 3636-3642.
- (15) MENG, Zhiyuan, WANG, Dezhen, LIU, Wan, LI, Ruisheng, YAN, Sen, JIA, Ming, ZHANG, Luyao, ZHOU, Zhiqiang et ZHU, Wentao. Perinatal exposure to Bisphenol S (BPS) promotes obesity development by interfering with lipid and glucose metabolism in male mouse offspring. *Environmental Research*. juin 2019. Vol. 173, pp. 189-198.
- (16) AZEVEDO, Lara Ferreira, PORTO DECHANDT, Carlos Roberto, CRISTINA DE SOUZA ROCHA, Cecília, HORNOS CARNEIRO, Maria Fernanda, ALBERICI, Luciane Carla et BARBOSA, Fernando. Long-term exposure to bisphenol A or S promotes glucose intolerance and changes hepatic mitochondrial metabolism in male Wistar rats. *Food and Chemical Toxicology*. octobre 2019. Vol. 132, pp. 110694.
- (17) MORRISON, Janna L., BERRY, Mary J., BOTTING, Kimberley J., DARBY, Jack R. T., FRASCH, Martin G., GATFORD, Kathryn L., GIUSSANI, Dino A., GRAY, Clint L., HARDING, Richard, HERRERA, Emilio A., KEMP, Matthew W., LOCK, Mitchell C., MCMILLEN, I. Caroline, MOSS, Timothy J., MUSK, Gabrielle C., OLIVER, Mark H., REGNAULT, Timothy R. H., ROBERTS, Claire T., SOO, Jia Yin et TELLAM, Ross L. Improving pregnancy outcomes in humans through studies in sheep. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 1 décembre 2018. Vol. 315, n° 6, pp. R1123-R1153.
- (18) CORBEL, Tanguy, GAYRARD, Véronique, VIGUIÉ, Catherine, PUEL, Sylvie, LACROIX, Marlène Z., TOUTAIN, Pierre-Louis et PICARD-HAGEN, Nicole. Bisphenol A Disposition in the Sheep Maternal-Placental-Fetal Unit: Mechanisms Determining Fetal Internal Exposure<sup>1</sup>. *Biology of Reproduction*. 1 juillet 2013. Vol. 89, n° 1.
- (19) RUMBALL, C. W. H., HARDING, J. E., OLIVER, M. H. et BLOOMFIELD, F. H. Effects of twin pregnancy and periconceptional undernutrition on maternal metabolism, fetal growth and glucose-insulin axis function in ovine pregnancy: Effects of twinning and undernutrition on ovine pregnancies. *The Journal of Physiology*. 1 mars 2008. Vol. 586, n° 5, pp. 1399-1411.
- (20) BELL, A W. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *Journal of Animal Science*. 1995. Vol. 73, n° 9, pp. 2804.
- (21) RUSSEL, A.J.F. Means of assessing the adequacy of nutrition of pregnant ewes. *Livestock Production Science*. Juillet 1984. Vol. 11, n° 4, pp. 429-436.
- (22) RUSSEL, A. J. F., DONEY, J. M. et REID, R. L. The use of biochemical parameters in controlling nutritional state in pregnant ewes, and the effect of undernourishment during pregnancy on lamb birth-weight. *The Journal of Agricultural Science*. juin 1967. Vol. 68, n° 3, pp. 351-358.
- (23) TERRAL, Hélène, 2019. Impact du déficit énergétique sur les performances de reproduction de troupeaux allaitants suivis dans le cadre d'une clientèle vétérinaire. Thèse de Doctorat Vétérinaire. Toulouse : Toulouse 3.
- (24) PESÁNTEZ-PACHECO, Jose, HERAS-MOLINA, Ana, TORRES-ROVIRA, Laura, SANZ-FERNÁNDEZ, María, GARCÍA-CONTRERAS, Consolación, VÁZQUEZ-GÓMEZ, Marta, FEYJOO, Pablo, CÁCERES, Elisa, FRÍAS-MATEO, Millán, HERNÁNDEZ, Fernando, MARTÍNEZ-ROS, Paula, GONZÁLEZ-MARTIN, Juan, GONZÁLEZ-BULNES, Antonio et



ASTIZ, Susana. Influence of Maternal Factors (Weight, Body Condition, Parity, and Pregnancy Rank) on Plasma Metabolites of Dairy Ewes and Their Lambs. *Animals*. 28 mars 2019. Vol. 9, n° 4, pp. 122.

(25) IVRY DEL MORAL, L., LE CORRE, L., POIRIER, H., NIOT, I., TRUNTZER, T., MERLIN, J.-F., ROUIMI, P., BESNARD, P., RAHMANI, R. et CHAGNON, M.C. Obesogen effects after perinatal exposure of 4,4'-sulfonyldiphenol (Bisphenol S) in C57BL/6 mice. *Toxicology*. mai 2016. Vol. 357-358, pp. 11-20.

(26) CATALANO, Patrick M et SHANKAR, Kartik. Obesity and pregnancy: mechanisms of short term and long term adverse consequences for mother and child. *BMJ*. 8 février 2017. *BMJ* 356 j1.

(27) Richard G. VERNON, Roger A. CLEGG and David J. FLINT, 1981. Metabolism of sheep adipose tissue during pregnancy and lactation Adaptation and regulation. Hannah Research Institute, Ayr KA6 SHL, U.K. Vol. 200, n° 2, pp. 307-314.

(28) Clarke L, Firth K, Heasman L, Juniper DT, Budge H, Stephenson T, Symonds ME, 2000. Influence of relative size at birth on growth and glucose homeostasis in twin lambs during juvenile life. *Reprod Fertil Dev*. pp. 69-73.

(29) Mericq V, Ong KK, Bazaes R, Peña V, Avila A, Salazar T, Soto N, Iñiguez G, Dunger DB. Longitudinal changes in insulin sensitivity and secretion from birth to age three years in small- and appropriate-for-gestational-age children. *Diabetologia*. 28 décembre 2005 .

(30) Poore KR, Cleal JK, Newman JP, Boullin JP, Noakes DE, Hanson MA, Green LR. Nutritional challenges during development induce sex-specific changes in glucose homeostasis in the adult sheep. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007 Jan.

(31) Kalhan S, Parimi P, 2000. Gluconeogenesis in the fetus and neonate. *Seminars in Perinatology*. Vol n°24, n°2, Pp 94-106

(32) Green AS, Macko AR, Rozance PJ, Yates DT, Chen X, Hay WW Jr, Limesand SW. Characterization of glucose-insulin responsiveness and impact of fetal number and sex difference on insulin response in the sheep fetus. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2013 Feb 15; 304(4): E352-E362.

(33) Akash MSH, Sabir S, Rehman K. Bisphenol A-induced metabolic disorders: From exposure to mechanism of action. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2020 Jul. Vol 2, n°4, pp. 119-126.

(34) Kamarýt J, Matýsek P. Beta-Glucuronidase activity in amniotic fluid. *Environment International*. 1980 Oct. 18. 18(10):611-4

(35) Hu CY, Li FL, Hua XG, Jiang W, Mao C, Zhang XJ. The association between prenatal bisphenol A exposure and birth weight: a meta-analysis. *Reprod Toxicol*. 2018 Aug;79:21-31. doi: 10.1016/j.reprotox.2018.04.013. Epub 2018 Apr 27. PMID: 29709518.

(36) Zhang B, He Y, Zhu H, Huang X, Bai X, Kannan K, Zhang T. Concentrations of bisphenol A and its alternatives in paired maternal-fetal urine, serum and amniotic fluid from an e-waste dismantling area in China. *Environ Int*. 2020 Mar;136:105407. doi: 10.1016/j.envint.2019.105407. Epub 2020 Jan 16. PMID: 31955035.

(37) Barry JS, Anthony RV. The pregnant sheep as a model for human pregnancy. *Theriogenology*. 2008 Jan 1;69(1):55-67. doi: 10.1016/j.theriogenology.2007.09.021. Epub 2007 Nov 5. PMID: 17976713; PMCID: PMC2262949.

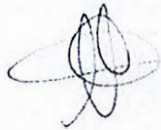
**AGREMENT SCIENTIFIQUE**

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


Je soussignée, Nicole HAGEN, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directrice de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **COLIN Margault et COMBES Marie-Cerguine** intitulée « **EFFET DU BISPHENOL S SUR LE METABOLISME ENERGETIQUE FÉTAL ET INTERACTION AVEC LE STATUT METABOLIQUE DE LA BREBIS** » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

**Fait à Toulouse, le 03/11/2021**

**Enseignant-chercheur de l'Ecole Nationale  
Vétérinaire de Toulouse  
Professeure Nicole HAGEN**



**Vu :  
Le Président du jury  
Professeur Roger LEANDRI**



**Vu :  
Le Directeur de l'Ecole Nationale  
Vétérinaire de Toulouse  
M. Pierre SANS**



**Vu et autorisation de l'impression :  
Le Président de l'Université Paul Sabatier  
Monsieur Jean-Marc BROTO  
Par délégation, le Doyen de la faculté de  
Médecine de Toulouse-Rangueil  
Monsieur Elie SERRANO**



Mme COLIN Margault et COMBES Marie-Cerguine  
ont été admises sur concours en : 2016  
ont obtenu leur diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 06/07/2020  
ont validé leur année d'approfondissement respectivement les : 01/07/2021 et 15/07/2021  
n'ont plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.



## **Effet du Bisphénol S sur le métabolisme énergétique foetal et interaction avec le statut métabolique de la brebis**

### **Résumé :**

Depuis la classification du bisphénol A comme perturbateur endocrinien et son interdiction, l'exposition humaine à des analogues structuraux comme le bisphénol S est ubiquitaire. De nombreuses études alertent sur ses effets œstrogénomimétiques et son passage transplacentaire a été démontré chez l'homme. Notre étude vise à évaluer l'effet du BPS sur le métabolisme énergétique foetal et ses éventuelles interactions avec le statut métabolique maternel. 45 brebis gravides, dont 23 maigres et 22 grasses ont été exposées quotidiennement de 32 à 135 jours de gestation à du BPS (50 µg/kg/j) ou à un solvant par voie sous-cutanée. Les résultats montrent une mobilisation lipidique plus importante en fin de gestation chez les femelles traitées au BPS. Après instrumentation par cathétérisme du foetus ovin en fin de gestation, le métabolisme foetal a été évalué à travers un challenge hyperglycémique. Aucun effet significatif du BPS sur la réponse insulinique foetale à un challenge hyperglycémique n'est observé. Cependant, l'état subscétosique chez les brebis grasses a entraîné une augmentation de la glycémie basale foetale, ainsi qu'une diminution de la réponse insulinique à l'hyperglycémie.

**Mots-clés :** Bisphénol S, foetus, métabolisme énergétique, ovin, perturbateur endocrinien

### **Summary :**

Since the classification of bisphenol A as an endocrine disruptor and its ban, human exposure to structural analogues such as bisphenol S is ubiquitous. Numerous studies warn about its estrogenomimetic effects and its transplacental passage was demonstrated in human. Our study aims to assess the effect of BPS on fetal energy metabolism and its possible interactions with maternal nutritional status. 45 pregnant ewes, of which 23 were thin and 22 were fat, were exposed subcutaneously and daily from 32 to 135 days of gestation to BPS (50 µg / kg / day) or to a solvent. The results show greater lipid mobilization at the end of gestation in ewes treated with BPS. After instrumentation of the ovine fetus at the end of gestation, the fetal metabolism was evaluated through a hyperglycemic challenge. No significant effect of BPS on the fetal insulin response to hyperglycemic challenge was observed. However, the subketosis state in fat ewes resulted in an increase in twins fetal basal glycemia, as well as a decrease in the insulin response to hyperglycemia.

**Key words :** Bisphenol S, foetus, energy metabolism, sheep, endocrine disruptor