

## Mémoire

**Auteur :** Glachet, Chloé

**Promoteur(s) :** Plumier, Jean-Christophe; Parent, Anne-Simone

**Faculté :** Faculté des Sciences

**Diplôme :** Master en biologie des organismes et écologie, à finalité approfondie

**Année académique :** 2021-2022

**URI/URL :** <http://hdl.handle.net/2268.2/16284>

---

### *Avertissement à l'attention des usagers :*

*Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.*

*Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.*

---

Année académique 2021-2022



Université de Liège

Faculté de sciences

Département de Biologie, Ecologie, Evolution

GIGA neurosciences

Unité de Neuroendocrinologie du Développement

A-S. Parent (co-promoteur) ; J. Fudvoye  
(encadrante) ; J-C Plumier (promoteur)



# Marqueurs transcriptionnels placentaires d'une exposition au BPA et BPS

Mémoire présenté par Chloé Glachet dans le cadre du master BOE à finalité  
écotoxicologie

# Marqueurs transcriptionnels placentaires d'une exposition au BPA et BPS

## Résumé

Notre environnement actuel présente de nombreux dangers pour la santé des organismes. L'un d'eux se caractérise par l'altération du système endocrinien des organismes par certaines substances, souvent issues de l'industrie pharmaceutique ou chimique. C'est le cas du bisphénol A. Ce composé chimique, utilisé dans le processus de fabrication de plastiques, se lie aux récepteurs hormonaux et empêche ceux-ci de fonctionner correctement. En conséquence, l'exposition au bisphénol A augmente la prévalence de l'obésité, de cancers et autres maladies. Aujourd'hui interdit dans certains produits de consommation, le bisphénol A compte de nombreux remplaçants, certainement tout aussi néfastes, comme le bisphénol S. Pour autant, peu de recherches portent leur regard sur le possible effet des bisphénols sur le placenta. Lors du développement embryonnaire, cet organe est le seul moyen de communication avec le monde extérieur, la présence de perturbateurs endocriniens pourrait entraîner des conséquences fortes sur le développement embryonnaire.

Nous avons donc étudié la croissance fœtale et cherché à identifier des marqueurs transcriptionnels placentaires après une exposition au BPA et au BPS à faible dose, chez les rats Wistar. Nous avons alors sélectionné quatre gènes impliqués dans la placentation : Wnt7b, Postn, Grem1 et Spp1 et étudié leur expression dans le placenta. Enfin, nous avons évalué les effets d'une exposition périnatale au bisphénol S sur la croissance postnatale et le développement pubertaire.

Cette expérience nous a permis d'identifier des marqueurs transcriptionnels placentaires après une exposition au bisphénol S, avec une différence sexuelle. L'expression des gènes Spp1 et Wnt7b est diminuée chez les animaux exposés au BPS à faible dose par rapport au groupe contrôle, respectivement chez les femelles et les mâles. Cette altération de l'expression des gènes placentaires est associée à un effet délétère du BPS sur la croissance fœtale qui est significatif chez le mâle. Le BPS diminue également la croissance pondérale postnatale chez la femelle, ce qui semble différer de l'effet obésogène connu du BPA. Concernant la puberté, le bisphénol S semble induire un effet semblable à son prédécesseur puisqu'il induit un léger retard de l'ouverture vaginal chez la femelle.

## Remerciements

Tout d'abord, j'aimerais remercier Anne Simone Parent pour sa bienveillance et son soutien sans faille, pour toutes ces corrections envoyées même les dimanches. Et surtout, merci de m'avoir fait confiance en m'intégrant à votre équipe de recherche et de me permettre de tenter de continuer l'aventure ici.

Je voudrai ensuite remercier Julie. Merci de m'avoir laissé voler de mes propres ailes et de m'avoir fait confiance sur ce projet qui est le tien. Cette dynamique de travail m'a permis de prendre confiance en moi et de voir ce dont je suis capable.

Un tout grand merci à Quentin et Delphine de m'avoir plus qu'épaulé au cours de ce stage. Vous avez toujours pris le temps de répondre à mes questions, les plus bêtes soient-elles (et vous savez qu'il y en a eu...) même quand ce n'était pas votre rôle.

Je remercie l'ensemble de l'équipe Parent. Merci à Elena et Charlotte, Delphine, Quentin et Valentina pour votre gentillesse, pour tous ces bons moments. J'ai pris énormément de plaisir à venir travailler tous les matins grâce à vous.

Merci aussi à l'équipe du GIGA neurosciences pour votre aide et votre disponibilité. Plus spécialement, merci à Sofian et Sonia (aka Grosette et Tatie). Vous êtes deux personnes débordantes de gentillesse et de bienveillance et je vous souhaite le meilleur pour la suite.

Merci à Hélène, Rachel et Lucas pour votre soutien au quotidien à la maison. Merci pour toutes ces moments que nous avons passé ensemble, le sergent n'aurait pas pu rêver meilleurs colocataires. Merci aussi à Rachel, je suis très heureuse d'avoir partagé ce stage avec toi.

Merci à Yanis, le dieu des stats. C'est grâce à toi si j'ai enfin pu comprendre cette discipline. Mais surtout merci pour ton amitié et ta générosité.

Mille mercis à mes parents, c'est grâce à votre soutien et votre confiance en mon travail que j'ai pu en arriver jusque-là. Je vous souhaite maintenant de penser à vous et vous faire plaisir. Merci aussi à Ophélie, Sébastien, Thomas, Lucy et à Arthur. Je suis heureuse de vous avoir auprès de moi et que les quelques kilomètres qui nous séparent ne change rien au fait qu'on sera là les uns pour les autres.

## Liste des abréviations

AR : récepteur androgénique

BAT : graisse brune

BPA : bisphénol A

BPS : bisphénol S

CT : cycle threshold

DDT : dichlorodiphényltrichloroéthane

DES : diéthylstilbestrol

ER : récepteur oestrogénique

ERa : récepteur oestrogénique alpha

ERb : récepteur oestrogénique bêta

FSH : hormone folliculostimulante

GD : jour de gestation

GnRH : gonadotropine releasing hormone

HPG : hypothalamo-hypophyso-gonadique

LH : hormone lutéinisante

MBH : hypothalamus médio-basal

PBDE : polybromodiphényléther

PCB : biphényl polychloré

PCR : réaction en chaine par polymérase

PE : perturbateur endocrinien

POA : aire pré-optique

RT : reverse transcription

WAT : graisse blanche

## Table des matières

Introduction.....	1
Les hormones.....	1
Perturbateurs endocriniens.....	3
Définition.....	3
Origine et fonctionnement.....	4
Effets des perturbateurs endocriniens.....	5
Développement cérébral.....	5
Puberté et reproduction.....	6
Métabolisme.....	6
Exemples écotoxicologiques de perturbation endocrinienne.....	7
Perturbateurs endocriniens : difficultés d'évaluation des effets.....	8
BPA et BPS.....	10
Placenta.....	12
Les effets des bisphénols A et S sur le placenta.....	13
Contexte de travail et objectif.....	14
Matériel & méthode.....	15
Substances.....	15
Animaux et expérimentation.....	15
Sexage.....	19
Extraction d'ARN, reverse transcription (RT) et real-time quantitative PCR (qPCR).....	20
Analyses statistiques.....	22
Résultats.....	23
Effets de l'exposition prénatale au BPA et BPS sur la gestation et la croissance fœtale.....	23
Effets de l'exposition périnatale au BPS 25 sur la croissance pondérale et la puberté de la descendance.....	26
Effets transcriptionnels de l'exposition gestationnelle au BPA et BPS au sein du placenta.....	31
Effets transcriptionnels de l'exposition périnatale au BPS 25 au sein de l'hypothalamus de la descendance.....	33
Discussion.....	37
Effets de l'exposition prénatale au BPA et BPS sur la gestation et la croissance fœtale.....	37
Effets de l'exposition périnatale au BPS 25 sur la croissance pondérale et la puberté de la descendance.....	39
Effets transcriptionnels de l'exposition gestationnelle au BPA et BPS sur les gènes impliqués dans la placentation.....	40
Conclusion.....	41
Références.....	1

# Introduction

## Les hormones

Une hormone est définie comme étant un messager chimique libéré dans le système sanguin afin de pouvoir atteindre toutes les cellules de l'organisme. Ces hormones se lient à des récepteurs qui leurs sont adéquats, la liaison hormone-récepteur a dès lors un caractère spécifique. Elles sont libérées dans le sang par des glandes sans canaux et leur rôle est de modifier les fonctions des cellules ou organes cibles (Andrea C Gore et al. 2014). Parmi les glandes endocrines, on peut notamment citer l'hypothalamus et l'hypophyse, la thyroïde, les glandes surrénales, le pancréas mais aussi les gonades (Figure 1). Leurs fonctions sont nombreuses, notamment dans le contrôle de la balance énergétique et de la reproduction.

Principales glandes endocrines

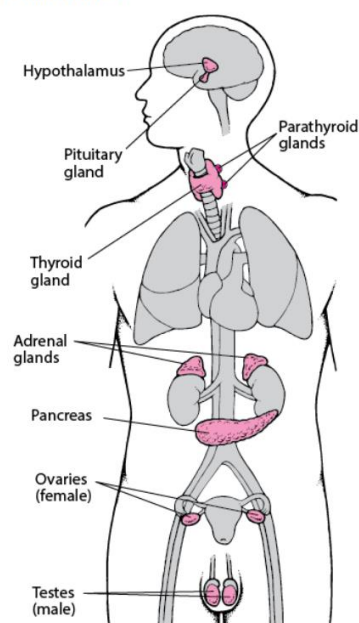


Figure 1 : schéma représentatif des principales glandes endocrines, © www.msmanuals.com

Certains récepteurs hormonaux régulent plusieurs mécanismes et comportements reproductifs : c'est le cas des récepteurs aux androgènes (AR) et des récepteurs aux œstrogènes (ER). Les androgènes comme les œstrogènes sont des hormones stéroïdiennes produites principalement par les glandes surrénales, les gonades et le cerveau, et dont les récepteurs se trouvent principalement dans le noyau. Les stéroïdes sexuels proviennent du clivage du cholestérol. Il est à noter que le cholestérol n'active pas

les récepteurs AR et ER. Ce clivage produit une première pro-hormone, la prégnénolone, puis une deuxième qui est la progestérone. Une pro-hormone est définie comme étant une substance qui peut soit agir comme une hormone soit être convertie en une autre hormone avec des propriétés endocrines différentes. A ce stade, les hormones stéroïdiennes sont composées de 21 carbones. Par clivage celles-ci deviennent des androgènes à 19 carbones parmi lesquelles on peut citer la testostérone. Ensuite les androgènes vont être transformés, sous action de l'aromatase, pour produire les œstrogènes dont l'œstradiol et l'œstrone. Ces hormones et leurs récepteurs vont réguler de nombreux phénomènes liés à la reproduction. Une altération de leur expression ou de leur activation peut engendrer des conséquences néfastes sur le contrôle de la reproduction, comme une hypofertilité, la diminution de la quantité de spermatozoïdes, une modification du sex ratio ou des anomalies de développement des gonades (Köllner 2018).

La reproduction est régie par l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique (HPG) (Figure 2). En effet, les hormones stéroïdiennes régulent la sécrétion de la gonadotropine releasing hormone (GnRH), dans l'hypothalamus. Ceci va induire une cascade hormonale permettant de mettre en place les mécanismes de la fertilité grâce l'hormone lutéinisante (LH) et l'hormone folliculostimulante (FSH) qui sont sécrétées par l'hypophyse et stimulent la productions de stéroïdes et la maturation des gamètes au niveau des gonades (Yeo et Colledge 2018).

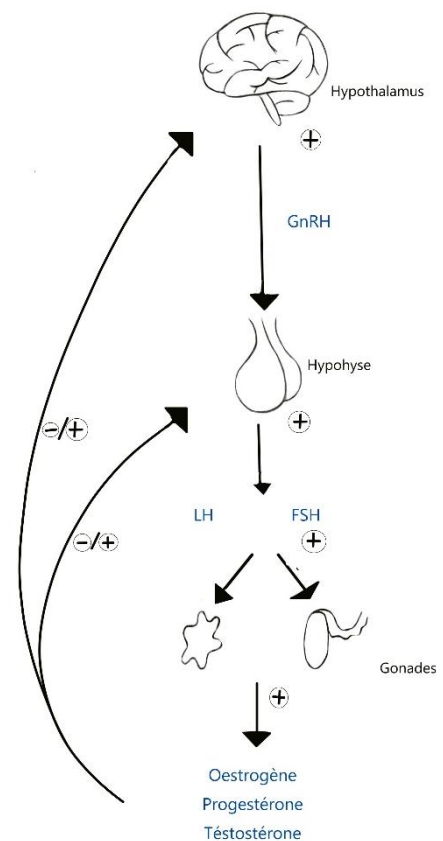


Figure 2 : Modulation de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique



## Perturbateurs endocriniens

### Définition

Les perturbateurs endocriniens sont définis comme étant des composés chimiques exogènes qui interfèrent avec n'importe quel aspect du système endocrinien, selon l'OMS. Une exposition à ces perturbateurs peut alors induire des maladies chez différents types d'organismes.

En 2009, la Endocrine Society a regroupé plusieurs experts afin de faire un point sur l'état des recherches sur le sujet des perturbateurs endocriniens (PEs). Depuis, quatre sujets de recherches sont largement étudiés : les conséquences d'une exposition au PEs sur le développement et la physiologie, les mécanismes sous-jacents aux perturbations endocriniennes, les charges corporelles induites par les PEs et la propension des maladies chez l'humain (A. C. Gore et al. 2015; Andrea C Gore et al. 2014).

Les sources de perturbations endocriniennes sont nombreuses (Fudvoye et al. 2014). Tous les organismes sont en effet constamment exposés à ces composés chimiques, que cela soit par inhalation d'un air pollué ; ingestion de nourriture contenant des pesticides ou composés industriels ; ou encore dans l'eau de rivières ou étangs ayant subis un déversement (Kabir et al. 2015). L'exposition peut aussi être due des accidents chimiques de grande ampleur comme le montre l'exemple de Seveso en Italie ou l'utilisation de l'agent orange lors de la guerre du Vietnam (A. C. Gore et al. 2015; Andrea C Gore et al. 2014)

Les différentes recherches menées ont permis de voir que les PEs sont responsables de nombreux effets délétères et maladies. Les principaux effets touchent le cerveau, entraînant des troubles cognitifs et psychomoteurs, la différenciation sexuelle, le système reproducteur ou encore la balance énergétique. Une exposition à ces PEs augmente alors les probabilités de développer certaines maladies comme le diabète de type II, l'obésité viscérale, une modification du timing pubertaire, des troubles de l'ovulation ou encore des cancers (Fudvoye et al. 2014).

## Origine et fonctionnement

Les mécanismes d'action potentiels des PE sont étudiés depuis les années 1970. L'impact de l'exposition aux PE sur la santé a été évoqué suite à l'augmentation de l'incidence du cancer du sein et des testicules, des troubles de la fertilité ainsi que les malformations du tractus génital (Andrea C Gore et al. 2014). Le système endocrinien joue un rôle très important dans nombre de processus biologiques et physiologiques, donc une perturbation même minime est susceptible de provoquer des changements menant à des maladies (Andrea C Gore et al. 2014).

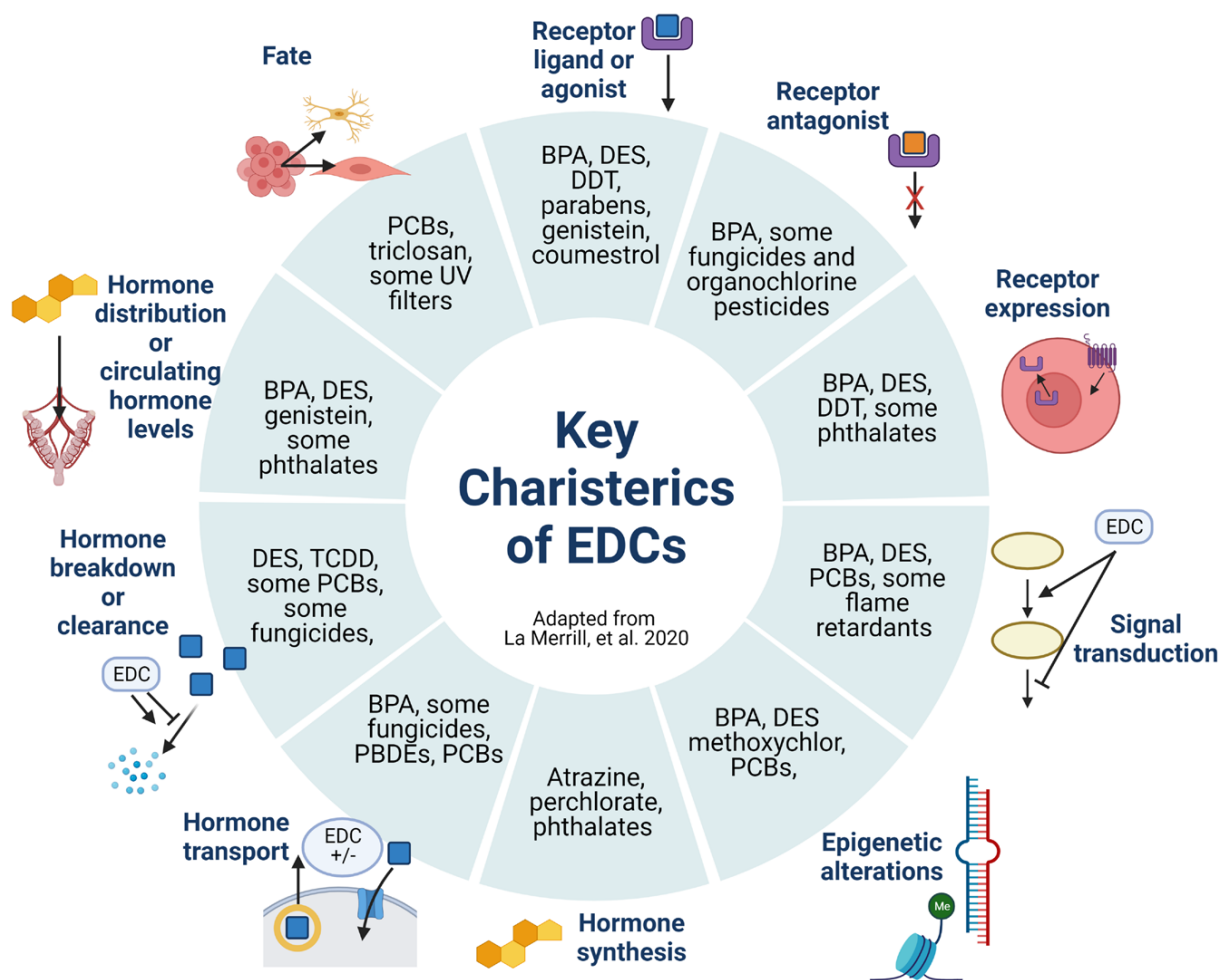


Figure 3 : Résumé de (La Merrill et al. 2020) des dix voies d'action et exemple de PE (Patisaul 2021).

Les effets des PE s'observent par différents mécanismes (Figure 3). Ils peuvent agir directement sur des protéines spécifiques, influençant alors la production ou le métabolisme de l'hormone (Kabir et al. 2015). Il est également possible qu'ils engendrent

des effets épigénétiques. Concernant les effets épigénétiques des PE, ceux-ci sont définis comme étant un changement héritable de l'expression du gène non lié à une mutation de l'ADN. Les mécanismes étudiés, induits par ces changements sont en majorité lié à la méthylation des résidus de cytosine dans l'ADN mais de plus en plus d'études se penchent sur la modification des histones et aussi de l'expression altérée des microRNA (A. C. Gore et al. 2015). Enfin, les PE peuvent aussi provoquer une altération de la liaison hormone-récepteur. En effet, un PE peut avoir une action de bloqueur de récepteur, d'activateur ou d'inhibiteur : ils ont une action d'agoniste ou d'antagoniste envers les hormones et leurs récepteurs (Barcelo et Kettrup 2004). C'est-à-dire qu'ils vont se lier aux récepteurs hormonaux et avoir le même effet qu'une hormone en l'activant (agoniste) ou ne pas enclencher un changement de conformation du récepteur et empêcher l'activation par l'hormone (antagoniste).

Les effets des PE sont principalement étudiés sur des hormones oestrogéniques et androgéniques qui sont des hormones stéroïdiennes qui interviennent dans la maturation sexuelle, ce qui peut influencer le timing pubertaire puisque la période périnatale est très sensible aux perturbations endocriniennes, mais également influencer le développement du cortex et des fonctions cérébrales (Fudvoye et al. 2014). Les PE n'ont pas nécessairement besoin d'avoir une ressemblance structurelle avec l'hormone qu'ils vont perturber mais vont avoir un effet liant avec son récepteur. De plus un PE peut avoir un effet pléiotropique et donc perturber à la fois, par exemple, les hormones androgéniques et oestrogéniques comme c'est le cas pour le DDT (Barcelo et Kettrup 2004). Tous les perturbateurs endocriniens, même s'ils sont agonistes d'un même récepteur, par exemple les ERs, n'ont pas le même effet : ainsi, le PCB est impliqué dans la formation du cancer du sein mais ce n'est pas le cas du BPA (bisphénol A) ou des phtalates (Morgan et al. 2017).

## Effets des perturbateurs endocriniens

### Développement cérébral

Les perturbateurs endocriniens sont capables d'affecter le développement cérébral et principalement celui de l'hypothalamus en altérant la formation et la croissance

neuronale (Bouret 2017). Ceci engendre, par exemple, des modifications dans la formation et la maturation de l'axe HPG, induisant des difficultés de développement ou de fonctionnement lors de la puberté, de la reproduction mais aussi concernant la différenciation sexuelle (Patisaul 2021).

### Puberté et reproduction

Deux autres points importants des effets des perturbateurs endocriniens sur les organismes, sont la puberté et la capacité de reproduction. Dans un premier temps, on peut voir une avancée de la période de puberté chez les femelles. Cet effet est moins visible chez les mâles. Mais la reproduction est bel et bien impactée chez les deux sexes. Lors des 50 dernières années, la quantité de spermatozoïdes chez les hommes de population occidentale a été divisée de moitié. Ceci est maintenant valable également chez les populations africaines. On observe aussi une augmentation flagrante de cas de cancers des testicules, de cryptorchidies et d'hypospadias, surtout dans les pays du nord. Concernant les femmes, le nombre de naissances prématurées n'a cessé d'augmenter jusqu'à atteindre 10% des grossesses aux Etats Unis en 2018. La prévalence du cancer du sein a également augmenté et touche maintenant 1/8 personne aux Etats Unis et devient donc le deuxième cancer le plus répandu dans cette population (Patisaul 2021).

### Métabolisme

Le métabolisme n'est pas en reste de l'effet des perturbateurs endocriniens. Au cours des dernières décennies, les cas de diabète de type 2 et d'obésité ont largement augmenté. En effet les cas d'obésité sont passés de 5% chez les hommes et 8% chez les femmes en 1980 à 10% et 14% respectivement en 2008. Ces maladies touchent également de plus en plus les enfants et adolescents (A. C. Gore et al. 2015). Les perturbateurs endocriniens pourraient influencer le métabolisme par plusieurs voies. En prenant le cas de l'hypothalamus, celui-ci permet la régulation de l'appétit et aussi de la balance énergétique. L'impact des PE peut avoir lieu à la fois lors de la neurogénèse hypothalamique ce qui induira une altération de ces fonctions de contrôle des hormones comme la leptine, la ghréline ou l'insuline. Mais les PE peuvent aussi directement impacter les voies de régulations hypothalamiques de ces hormones, même si la circuiterie neurologique est correctement formée (Bouret 2017).

## Exemples écotoxicologiques de perturbation endocrinienne

L'écotoxicologie est l'étude des effets toxiques des agents physiques et chimiques sur les organismes vivants et les communautés qui constituent les écosystèmes. Elle comprend les voies de transfert et les interactions de ces agents avec l'environnement. Un contaminant émis dans l'environnement va subir une dilution, un transport ou un transfert entre compartiments par bioconcentration et bioaccumulation. Ces mécanismes dépendent des propriétés physico-chimiques du polluant : on va alors se renseigner sur sa solubilité dans l'eau, le coefficient octanol-eau afin de savoir s'il aura une tendance lipophile, la pression de vapeur pour connaître sa capacité de sédimentation et son taux de dégradation, mais également sa masse molaire qui influencera la bioaccumulation.

On appelle ces composés des xénobiotiques. Leurs effets sur la santé des mammifères sont largement montrés par une forte augmentation de cas de cancers, d'obésité ou de maladie reproductives. Par exemple, l'augmentation de la prévalence des cancers du sein durant les 60 dernières années semble partiellement due à l'exposition aux xénoœstrogènes (Safe 2004). De manière générale, les effets des PE ont un impact, au niveau physiologique mais aussi comportemental.

L'implication possible des perturbateurs endocriniens dans des catastrophes environnementales a été illustré notamment par le cas des alligators du lac Apopka (Semenza et Jackson 1997). En effet, après déversement de deux composés utilisés comme pesticides (DDT et Dicofol) dans le lac, les alligators mâles ont présenté des signes de démasculinisation. Sous l'effet de l'induction de l'aromatase, une enzyme responsable de la transformation des androgènes en œstrogènes, le taux d'œstrogènes a doublé, à la fois chez les femelles et les mâles. Dans la descendance, on a mis en évidence une diminution de la taille du pénis chez les mâles ne permettant pas l'intromission lors de l'accouplement et les femelles n'étaient alors pas fécondées. Un autre exemple serait celui des phoques communs dont la population a chuté entre 1950 et 1975, passant de 3000 à 500 individus. Leur zone de chasse a été polluée par des polychlorobiphényles (PCBs) donc les poissons, dont ces animaux se nourrissaient, étaient aussi contaminés aux PCBs. Ceux-ci étant fortement bioaccumulables, ils se sont retrouvés en grande quantité dans l'organisme des phoques ce qui a causé une baisse de la capacité de reproduction chez

les femelles (Helle et al. 1976; Cullon et al. 2012). Enfin il est à noter que les contraceptions hormonales humaines sont également la cause de changement physiologiques chez de nombreux organismes vivants mais principalement chez les « poissons ». Les contraceptifs hormonaux sont métabolisés, chez l'humain, par le foie mais pas dans leur totalité, ainsi une partie est excrétée via l'urine. De cette manière, les pro estrogènes et estradiols synthétiques passent par le système de traitement des eaux usées dont les stations d'épuration relarguent le produit nettoyé dans les eaux de surfaces. Une fois dans l'environnement, les hormones synthétiques, comme l'éthinyl estradiol, vont perturber le système endocrinien des téléostéens. Les conséquences de cette exposition sont une féminisation voir un changement de sexe chez les mâles allant jusqu'à la production d'œufs dans les testicules avec le vitellogène résultant de la présence de protéines codant pour la formation du sac vitellus qui sont normalement présentes uniquement chez les femelles fertiles. Ces changements entraînent le déclin des populations de poissons mais sont réversibles si l'exposition est arrêtée (Williams et al. 2021).

### Perturbateurs endocriniens : difficultés d'évaluation des effets

Définir le seuil de toxicité pour un perturbateur endocrinien reste un défi. Dans le cas d'un polluant classique, on détermine la courbe effet-dose, mais dans le cas des perturbateurs endocriniens, cette courbe représente généralement une forme de U inversé (Figure 4). C'est ce qu'on appelle des courbes dose-réponse non monotone, pour lesquels l'effet le plus néfaste n'est pas forcément atteint par les doses les plus fortes. Le système endocrinien est régulé par deux mécanismes importants : la connectivité ligand-récepteur et les caractéristiques du récepteur. L'abondance, l'isoforme ainsi que le signal de transduction peuvent empêcher le fonctionnement correct du système hormonal. Les hormones ont une forte affinité de liaison envers leurs récepteurs et fonctionnent alors en faible concentration. La présence de PEs peut alors engendrer une réponse biologique plus forte que nécessaire à un stimulus. La concentration en récepteur est tout aussi importante, elle peut varier selon la présence de PEs et une forte concentration en récepteurs induit un besoin en hormone liante moins important pour un même résultat biologique (A. C. Gore et al. 2015).

### Inverted-U dose-response curve for some endocrine disrupting chemicals

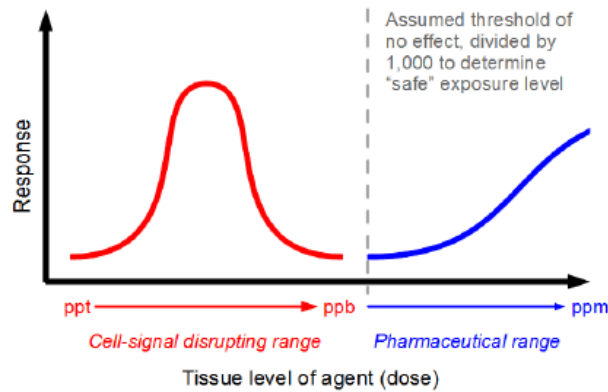


Figure 4 : courbe dose-réponse d'un perturbateur endocrinien

Les PE peuvent avoir des effets à des doses très faibles, dites low-doses, que l'on définit comme étant inférieures à celles testées habituellement en toxicologie (Vandenberg 2014). Ils peuvent aussi induire une influence après une exposition à forte dose mais l'effet toxicologique n'est pas toujours le même qu'avec une exposition à faible dose. Par exemple, une exposition au DES faible dose entraîne une obésité morbide alors qu'une exposition à forte dose entraîne une perte de poids (Newbold et al. 2009). Il est important de noter que les doses auxquels les organismes sont couramment soumis sont des doses faibles que l'on va retrouver dans notre environnement et non pas une exposition aiguë.

En effet, l'impact d'une exposition dépend du type de celle-ci : une exposition aiguë se fait sur une période courte, les effets sont visibles sous 24h, elle se fait de manière accidentelle et ses effets sont irréversibles. Une exposition chronique, à laquelle on peut se référer pour les doses environnementales, se fait sur le long terme et montre des effets irréversibles également mais qui s'expriment sur un temps long après l'exposition. Ceci est particulièrement vrai lors de la phase précoce du développement du fœtus mais aussi du juvénile. En effet, dans les stades précoces de la vie, les voies de métabolisation ne sont pas matures et ne sont alors pas encore capable d'excréter correctement les composés néfastes. On peut citer l'exemple d'une exposition alimentaire au PCB chez les phoques de la mer Baltique dont une partie des PCBs bioaccumulés dans les graisses est transmise à la descendance via le lait maternel, et dont l'effet est encore plus toxique du fait de l'immaturation du système métabolique des petits (Wolkers et al. 2004). De plus cette fenêtre de développement est critique pour le bon fitness de la descendance. Une exposition aux

PEs au cours de cette période peut alors induire une altération du développement pubertaire (Fudvoye et al. 2014). Enfin, de nombreuses études se penchent sur les effets cocktails des perturbateurs endocriniens. En effet, dans notre environnement nous ne sommes pas soumis seulement à l'exposition d'un seul polluant mais plutôt à une multitude d'entre eux. Leurs effets peuvent donc s'additionner, se multiplier ou encore s'inhiber (Rajapakse et al. 2002). Tous ceci explique pourquoi il est si difficile d'établir une dose seuil d'exposition toxique à un PE.

## BPA et BPS

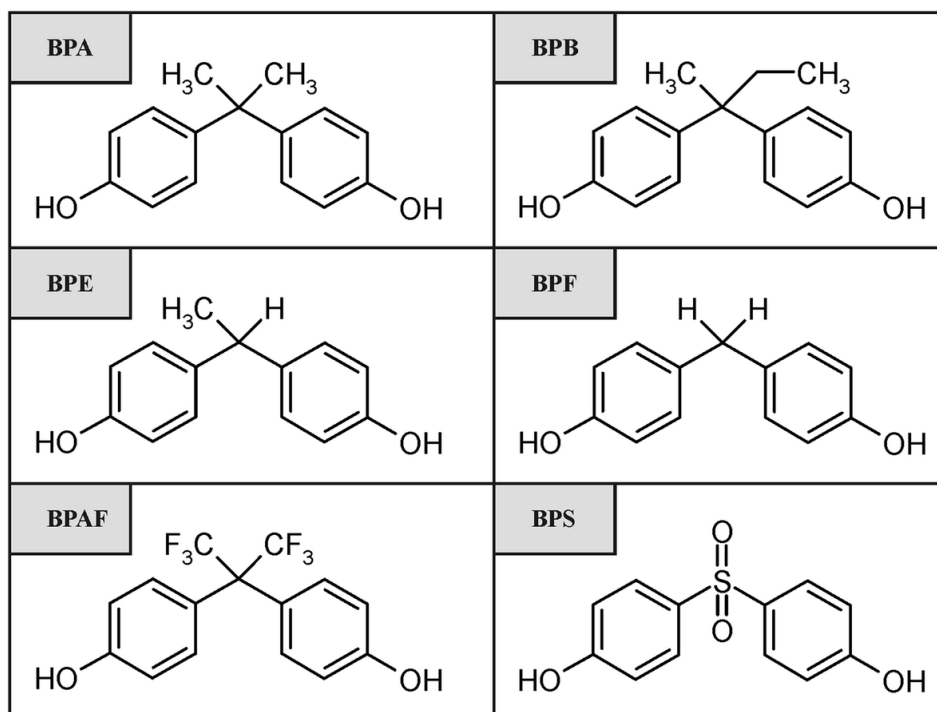


Figure 5 : représentation du Bisphénol A, du Bisphénol S et d'autres congénères, Robert Frankowski et al.

Les bisphénols (Figure 5) sont des polluants organiques, c'est-à-dire qu'ils sont composés de carbones, de dioxygène et de dihydrogène. A l'origine, les composés organiques ne sont pas toxiques mais l'agencement des atomes peut provoquer une toxicité. C'est le cas des hydrocarbures qui sont caractérisés par des cycles aromatiques générés par la combustion incomplète de combustibles fossiles. C'est dans ce cadre que les bisphénols ont été établis : la production de plastiques et résines résulte de la combustion de pétrole raffiné. Aujourd'hui, de nombreux composés industriels sur le



marché sont soumis à une réglementation d'utilisation comme les polybromodiphényléthers (PBDEs) ou les PCBs.

Le bisphénol A était utilisé dans la fabrication des plastiques polycarbonates et des résines époxydes. On le trouvait notamment dans les biberons et le revêtement des boîtes de conserve. Il n'est pas persistant mais une exposition constante mène à des niveaux constamment détectables chez l'humain. En effet, 95,7% des américains présentent du BPA dans leur urine et le BPS (bisphénol S) est détecté chez 89,4% de cette population entre 2013 et 2014 (Lehmler et al. 2018). Après ingestion, le bisphénol A subit une biotransformation par glucuroconjugaison et sulfatation, c'est-à-dire que les bisphénols, A comme S, se conjuguent avec le glucoronide ou le sulfate. Ces métabolites étant fortement hydrophiles, ils sont rapidement excrétés (W. Mao et al. 2022) ce qui explique la détection de BPA et BPS dans les urines chez l'humain. La principale source d'exposition se fait par l'alimentation car le composé migre du contenant vers la nourriture, cette contamination dépend de la température et de l'âge du contenant. En effet, plus le contenant est vieux et plus il est chauffé, plus le risque de migration est fort. Les concentrations sont les plus élevées chez les enfants et les adolescents que chez les adultes de par les mécanismes de glucoronidation et sulfination (Mielke et al. 2009). Il existe d'autres sources d'exposition comme le contact cutané ou par inhalation de poussière (W. Mao et al. 2022).

Le BPA est un composé agoniste : il est capable de se lier à la fois aux récepteurs oestrogéniques mais aussi androgéniques. Il a alors les mêmes effets que les ligands naturels des récepteurs AR et ER. Concernant les conséquences sur des modèles animaux, il a pu être constaté que le BPA peut moduler la prolifération des cellules de la prostate et augmenter la sensibilité de celle-ci à une carcinogénèse hormonale. Il est également décrit que les effets toxiques du BPA sont plus forts à faibles doses qu'à fortes doses (vom Saal et Hughes 2005). Ce propos est illustré par les précédents travaux du laboratoire d'Anne-Simone Parent au sein duquel a été montré un effet à faible dose du BPA sur la maturation sexuelle (Franssen et al. 2016), la folliculogénèse et la cyclicité chez le rat (López-Rodríguez et al. 2019). De plus, une exposition au BPA engendre une augmentation de la production d'hormones comme la leptine et l'insuline, une augmentation du stress oxydatif et de l'adipogénèse (Kabir et al. 2015).

Le BPS, qui est un substitut du BPA a sensiblement les mêmes origines que son prédécesseur (J. Mao et al. 2020). On peut alors en imaginer que les effets sont semblables mais il existe à l'heure actuelle peu d'étude concernant ses potentiels effets néfastes. Il n'existe donc actuellement pas encore de législations concernant les mesures d'utilisation de ce composé.

Les propriétés physico-chimiques de ces deux composés sont sensiblement les mêmes selon les fiches toxicologiques de l'INRS : ils ne sont pas persistants et le point de pression de vapeur ne montrent pas de danger pour les sols étant donné leur faible volatilité ( $5.3 \times 10^{-9}$  kPa pour le BPA et  $6.29 \times 10^{-11}$  kPa pour le BPS). Le caractère lipophile et donc bioaccumulable du polluant est montré par le coefficient de partition octanol-eau ( $\log K_{ow}$ ). Pour le BPS sa valeur est de 1.65 alors que pour le BPA la valeur est de 3.4. On dit d'un polluant qu'il est lipophile si son  $\log K_{ow}$  est supérieur à 3, le BPA est donc lipophile mais ceci est une tendance. Le BPA peut donc être bioaccumulé mais le risque est moindre.

## Placenta

Le placenta est un organe très important puisqu'il est la première source de nutrition d'un fœtus. Ce rôle commence 10 semaines après la conception et permet le passage de l'oxygène, de l'eau, des nutriments mais aussi des substances toxiques. Sa capacité à s'adapter de manière rapide aux menaces environnementales est alors primordiale afin de servir de tampon. Mais cette capacité peut dépendre du sexe du fœtus et alors induire un dimorphisme sexuel dans le comportement ou la physiologie de la descendance (C. Rosenfeld 2012).

L'exposition aux PEs durant cette phase de programmation fœtale peut avoir un impact sur la santé d'un individu à long terme (C. Rosenfeld 2012), et plus largement du phénomène appelé la programmation fœtale (Konkel 2016). Cette période permet de préparer le fœtus à l'environnement dans lequel il va naître. Par exemple, si la mère est contrainte à une sous nutrition durant la période de gestation, le métabolisme du fœtus sera adapté à ce type d'environnement, il stockera alors plus facilement les nutriments (Goyal et al. 2019). L'effet des modifications épigénétiques de l'ADN ou des histones serait

un facteur primaire des maladies métaboliques comme l'hypertension, l'obésité ou le diabète mais nous ne pouvons, pour le moment, pas déterminer si ces changements sont héréditaires (Goyal et al. 2019).

Le développement du placenta chez les mammifères suit plusieurs étapes cruciales. Il est composé de cellules trophoblastiques qui vont assurer les fonctions d'implantation, par adhérence avec l'endomètre, mais aussi d'échange avec l'embryon. Pour permettre la transmission des nutriments entre la mère et le petit, des villosités choriales se forment. Ce sont en fait des replis dans le chorion qui pénètrent dans les vaisseaux sanguins de la mère, permet les échanges de gaz, d'éléments nutritifs, et de déchets sans mélange des 2 circulations sanguines (Serman 2011).

Le placenta joue alors le rôle de barrière contre de nombreux dangers comme les agents infectieux, l'échange sanguin entre la mère et le fœtus, mais aussi contre le passage des médicaments et substances toxiques ingérées par la mère. Malheureusement, le placenta n'est pas imperméable à ces substances et ceci dépend des propriétés physicochimiques des composés toxiques. Seuls les composés de fort poids moléculaire seront bloqués. En effet, le passage des substances à travers le placenta se fait généralement par transport actif ou passif si le poids moléculaire est inférieur à 500 Da (Elefant 2012). Les composés toxiques vont alors modifier l'expression des gènes, en affectant directement la transcription de l'ADN ou en ayant un effet épigénétique (Fudvoye et al. 2014). Une des voies de régulation des modifications épigénétiques est le silençage de l'ARN messager par les microARN qui sont des petits brins d'ARN non codant qui vont réguler l'expression du gène (Konkel 2016). La période fœtale est donc une période critique.

### Les effets des bisphénols A et S sur le placenta

Du fait de leur faible poids moléculaire, le BPA (228,29) et le BPS (250,27) sont capables de passer la barrière placentaire et de contaminer l'environnement du fœtus. Une étude montre que des femelles traitées avec une forte dose de BPA (40 mg/kg/jour) montrent un retard de l'implantation et une augmentation de la mortalité périnatale de la descendance. Une exposition périnatale au BPA à forte dose entrainerait donc un effet délétère sur le transport de l'embryon, sa préimplantation et l'implantation (Xiao et al.

2011). Une exposition périnatale au BPA à dose environnementale entraîne également une diminution de la prolifération des cellules trophoblastiques ce qui compromet la communication mère fœtus, les cellules trophoblastiques servant à former les villosités chorales qui sont indispensables aux échanges entre la mère et le fœtus (C. Rosenfeld 2012). De plus, après 9 jours d'exposition au BPS à la dose de 500µg/kg/jour, le sang des rates F0 contient 55% du contaminant (W. Mao et al. 2022). Or le sang de la mère est la voie principale d'échange avec le fœtus via le chorion, par les villosités chorales permettant les échanges de gaz et de nutriments. Le BPA comme le BPS, à dose environnementale, impactent tous les deux l'expression de certains gènes codant pour la zone de jonction, soit l'interface entre le placenta et l'endomètre mais aussi une altération du contenu en neurotransmetteurs du placenta (J. Mao et al. 2020; Tait et al. 2015).

L'exposition aux bisphénols peut aussi engendrer un dysfonctionnement du système endocrinien lié au placenta ce qui entraîne une dérégulation du signal fusogénique des trophoblastes (Gingrich et al. 2018). On remarque aussi une augmentation du développement de l'arborescence des vaisseaux sanguins du placenta à faible dose alors qu'une exposition à forte dose limite la formation de cette arborescence. Ceci est induit par une diminution de la concentration en sérotonine placentaire à la suite d'une exposition au BPA comme au BPS et qui est essentielle pour la formation du tissu trophoblastique. De plus une exposition maternelle au BPA engendre une hyperméthylation des certains gènes (C. S. Rosenfeld 2021).

## Contexte de travail et objectif

Le fonctionnement actuel de notre société engendre de nombreux dangers pour la santé des organismes. Les perturbateurs endocriniens en font partie et posent un problème aussi bien pour la santé humaine que pour l'environnement. Leur étude entre dans le cadre de l'écotoxicologie afin de comprendre quels polluants sont des perturbateurs endocriniens mais aussi de connaître leurs impacts sur les organismes. C'est dans ce contexte que nous avons essayé de montrer les effets du BPA et du BPS sur la placentation, en cherchant des marqueurs transcriptionnels placentaires d'une exposition à ces polluants, sur un modèle

animal. Nous avons également regardé les possibles effets sur une génération d'animaux F1 concernant la puberté et le poids.

## Matériel & méthode

### Substances

Les composés chimiques BPA et BPS ont été commandé auprès de la firme Sigma-Aldrich (Missouri, USA). Le BPA (Bisphenol A 99+%, 2,2-Bis-(4-hydroxyphenyl) -propan 99+%, 228,29g/mol, CAS : 80-05-7) se présente sous forme de billes blanches. Le BPS (Bisphenol S 98%, 4,4'-Sulfonyldiphenol 98%, 250,27g/mol, CAS : 80-09-01) se présente, lui, sous forme de poudre blanche. Les composés sont chacun dissous dans de l'éthanol >99,8% (Roth). De cette solution stock est calculé le volume nécessaire, selon le poids des rates, pour la solution finale de 50µL d'huile.

### Animaux et expérimentation

La phase expérimentale se fait sur des rats Wistar logés dans des conditions standards d'animalerie, soit une température de 22,8°C et un cycle de jour de 7h à 19h. Pour écarter une exposition non contrôlée aux perturbateurs endocriniens testés, les rats sont logés dans des cages BPA-free (Cage polypropylene, Ref 1291H006, Tecnilab, Pays-Bas) et l'eau de boisson est fournie dans des biberons en verre. De plus les animaux sont nourris avec des pellets sans perturbateurs endocriniens ni phytoœstrogènes (V135 R/Z low phytoœstrogen pellets, SSNIFF Diet, Pays-Bas).

L'administration des substances se fait par voie orale : des galettes (galette vanille, Delacre) dans lesquels sont ajoutés 50µl d'huile de maïs seule ou d'une solution de BPA ou de BPS mélangé avec de l'huile de maïs, sont administrées chaque jour aux rates. Les cages sont systématiquement vérifiées après 10 minutes pour contrôler l'ingestion

complète de la galette. Les solutions de BPA et de BPS sont soumises à deux dosages, 4 µg/kg/jour et 25ng/kg/jour. Les groupes ont été répartis comme suit :

<b>Groupe</b>	<b>Contrôle</b>	<b>BPA 4 µg/kg/j</b>	<b>BPA 25ng/kg/j</b>	<b>BPS 4 µg/kg/j</b>	<b>BPS 25ng/kg/j</b>
<b>Nombre de rates</b>	15	5	5	5	15

Les femelles sont pesées toutes les semaines afin de rééquilibrer le dosage des solutions de BPA et de BPS en fonction de la prise de poids des différents groupes tests. L'exposition des femelles commence 7 jours avant la mise à mâles. Cette étape s'étale sur 72h durant lesquels un mâle est alors placé dans une cage de deux femelles. Les femelles sont disposées de manière à ce que la capacité reproductrice du mâle n'influence pas les groupes tests : dans chaque cage, les femelles appartiennent à des groupes différents. La fin de la mise à mâle est considérée comme le premier jour de gestation, de cette manière nous respectons le temps nécessaire aux substances pour atteindre une concentration effective dans le sang de l'animal (W. Mao et al. 2022). L'exposition continue tout au long de la gestation, soit jusqu'au jour 20. La prise de poids des femelles nous sert à définir lesquelles sont gestantes (prise de poids >90g). Au 20<sup>ème</sup> jour, les femelles prévues comme gestantes sont sacrifiées et une césarienne est effectuée, notant la position de chaque sac gestationnel. Une dissection de l'appareil génital des femelles prévues comme non gestantes est également pratiqué afin de vérifier qu'elles ne possèdent pas de sac gestationnel ou de malformation gonadique. Du tissu foetal est collecté pour réaliser une réaction en chaîne par polymérase (PCR) afin de déterminer le sexe des petits. Les tissus placentaires sont congelés dans de l'azote liquide et conservés à -80°C avant une extraction de l'ARN. Les tissus foetaux sont eux disposés à -20°C avant l'extraction de l'ADN.

Cette exposition étant une répétition d'une expérience précédente, nous avons utilisé les premiers placentas ainsi que les mesures de taux de gestation et de poids en complément.

Trois femelles des groupes de contrôle et de BPS 25 ng/kg/j terminent leur gestation. Un pool de petits est alors gardé. L'exposition des mères est allongée jusqu'à la fin de l'allaitement. Le sevrage est réalisé au 21<sup>ème</sup> jour de la descendance.

Les F1 sont soumis à plusieurs mesures. Tout d'abord le poids est évalué aux jours 7, 14, 21, 40, 50, 60 et 90. La taille est également mesurée à 90 jours en plaçant l'animal en position allongée le long d'une règle, la taille est considérée du bout du museau à la base de la queue. Un suivi de la phase de puberté est réalisé : chez les femelles, en notant le jour de l'ouverture vaginale, mais également chez les mâles en notant le jour de la séparation balanopréputiale complète (Figure 6). Les animaux sont pesés au moment de leur puberté. La prise de nourriture est aussi mesurée à p60 en pesant la nourriture restante des cages pour en déduire la quantité ingérée par rat. Enfin une partie des animaux est sacrifiée suivant des âges spécifiques : au sevrage, à la puberté et à l'âge adulte afin de pratiquer une dissection du cerveau. L'hypothalamus medio-basal (MBH), l'air pré optique (POA) et l'hypophyse sont alors échantillonnés et conservé à -80°C. Une extraction de l'ARN de ces échantillons est réalisée.



Figure 6 : Illustration des phases de la séparation balanopréputiale chez le rat mâle. (A) état juvénile, (B) début de la séparation, (C) séparation balanopréputiale. Le rat est considéré comme pubère à la phase (C). (D. Franssen)

Enfin, des frottis vaginaux sont réalisés sur les femelles F1 adultes, à partir de leur 67<sup>ème</sup> jour et ce pour une durée de 21 jours. Les frottis sont faits le matin entre 9h30 et 10h, à l'aide d'un coton tige imbibé de PBS pour aider le passage. Le contenu récupéré est déposé sur des lames puis laissé à sécher à l'air libre pendant 20 minutes. Ensuite, les lames sont plongées 5 minutes dans un bain de bleu de toluidine 0,1%, puis dans un deuxième bain d'eau froide pour le rinçage. Les lames sont ensuite soumises à un deuxième temps de séchage de 30 minutes avant d'être analysées. L'étude des frottis se fait à l'aide d'un microscope afin d'évaluer le type de cellules présentes dans le vagin des



rates. Ceci permet de connaître la phase du cycle menstruel des femelles. Celui-ci est composé de quatre phases (Figure 7) :

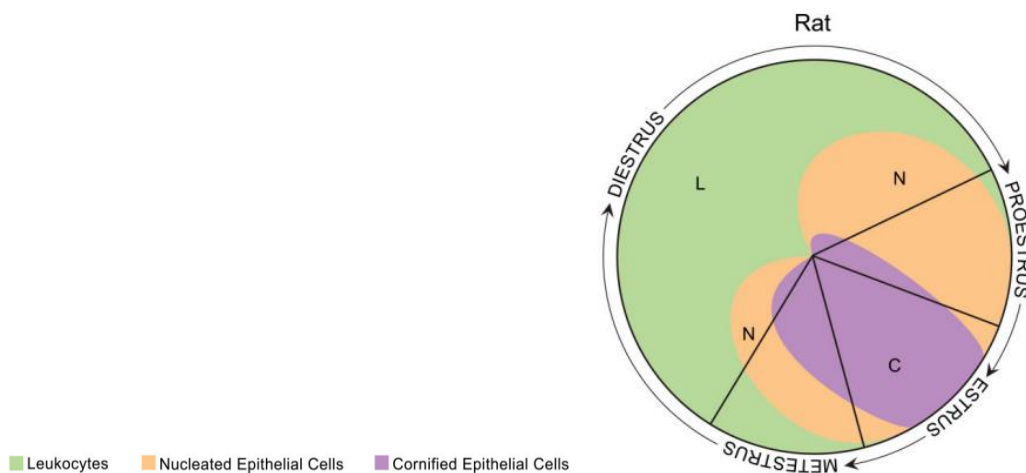


Figure 7 : Schéma de la proportion cellulaire des trois types de cellules caractérisant le cycle menstruel des rates. (Cora, Kooistra, et Travlos 2015)

La phase de proestrus dure en moyenne 14h et est caractérisée par la présence de nombreuses cellules épithéliales nucléées, rondes et de petite taille. Elles se présentent généralement en amas mais peuvent aussi être séparées (Figure 8).

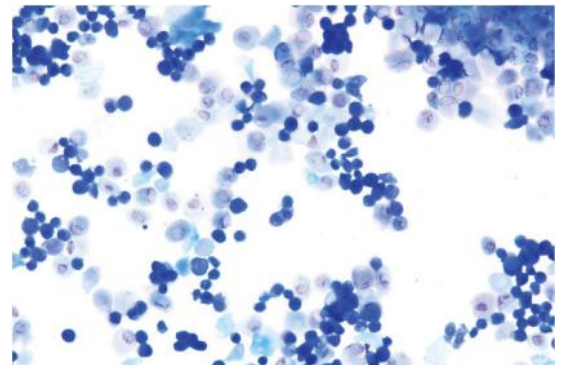
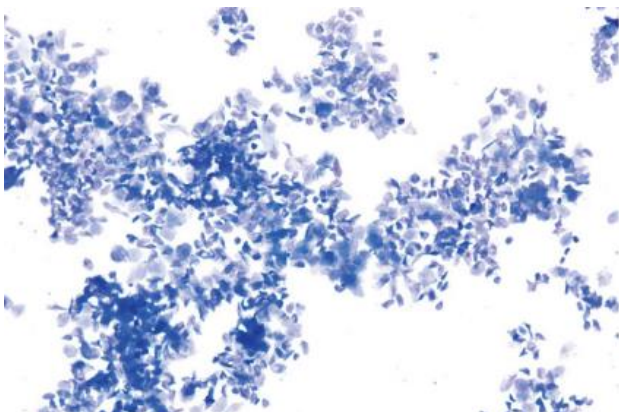


Figure 8 : Frotti vaginal d'un proestrus chez la rate. (Cora, Kooistra, et Travlos 2015)



L'œstrus peut aller de 24 à 48h. Il est facilement reconnaissable par son nombre important de cellules et de la configuration en amas qu'elles prennent. La majorité des cellules présentes sont des cellules épithéliales kératinisées anucléées. Ce stade sert de référence pour définir la cyclicité de nos rates (Figure 9).



Figure 9 : Frotti vaginal d'un œstrus chez la rate. (Cora, Kooistra, et Travlos 2015)

Le métoestrus est le stade le plus court puisqu'il dure environ 6 à 8h. Il est caractérisé par la présence des trois types de cellules, bien que celles-ci ne le soient pas en quantité similaires (Figure 10).

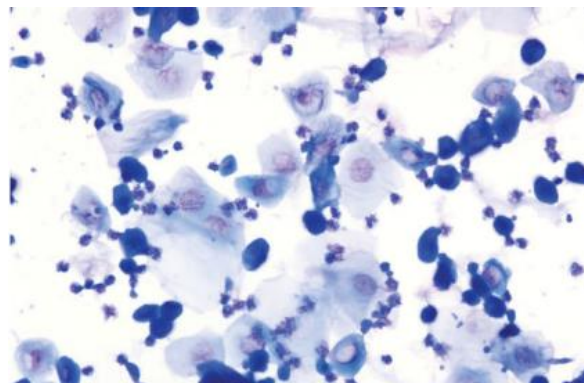


Figure 10 : Frotti vaginal d'un métoestrus chez la rate. (Cora, Kooistra, et Travlos 2015)



Figure 11 : Frotti vaginal d'un dioestrus chez la rate. (Cora, Kooistra, et Travlos 2015)

Le dioestrus peut durer de 48 à 72h et est caractérisé par la présence accrue de neutrophiles, en comparaison avec les autres stades, que l'on peut trouver principalement dans les excréments vaginales. De plus la quantité générale de cellule y est faible (Figure 11).

## Sexage

Le sexage des fœtus utilisant la distance ano-génitale étant impossible après la césarienne (de plus, le BPA ou BPS pourrait affecter celle-ci), un échantillon de tissus de chaque fœtus est récupéré. L'ADN est ensuite extrait de l'échantillon en utilisant le protocole de génotypage du kit PROMEGA (PROMEGA®, Wisconsin, USA). À la suite de l'extraction de l'ADN, une étude de l'expression du gène SRY par une PCR est réalisée, suivant toujours le protocole du kit PROMEGA. Pour se faire un couple de primer du gène SRY (sens : 5'GGAGAGAGGCGCAAGTTGGCT3' ; antisens : 5'GCTATGGTGCAGGGTCGCTCA3') ayant déjà servi à d'anciens sexages est utilisé. 2µL d'ADN est ajouté à 48µL d'un mix composé (par échantillon) de 0.25µL de Taq, 1µL de nucléotides, 10µL de buffer, 2µL de primer sens et antisens ainsi que 33,75µL d'H<sub>2</sub>O. Les

échantillons sont ensuite soumis à une PCR via le Labcycler (Sensoquest GmbH, Göttingen, Allemagne) suivant un programme de 5min à 94°C puis 35 cycles de 45sec à 95°C, 45sec à 60°C et 1min à 72°C, pour terminer par une phase de 7min à 72°C. Les gels sont élaborés avec 100mL de TBE 1x et 2% d'agarose auquel on ajoute 10µL de midori green. Les plaques sont remplies suivant le schéma ci-dessous (Figure 12). Le marqueur de poids moléculaire utilisé est le SmartLadder SF™ de la firme Eurogentec (Seraing, Belgique, ref. MW-1800-02). Les contrôles, mâle et femelle, proviennent d'un échantillon de bout de queue de rat adulte ayant subi les mêmes transformations que décrites précédemment.

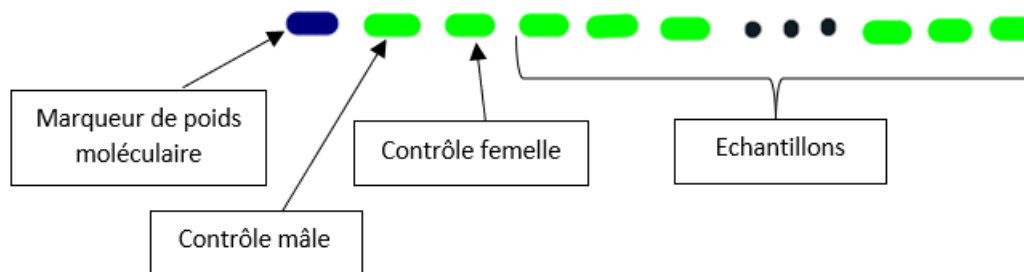


Figure 12 : Schéma représentant la disposition des échantillons pour chaque gel de génotypage

## Extraction d'ARN, reverse transcription (RT) et real-time quantitative PCR (qPCR)

L'ARN est extrait de plusieurs échantillons, toutes les extractions sont réalisées en suivant le kit RNeasy Mini (Qiagen, Pays-Bas). Dans un premier temps, l'extraction de l'ARN est réalisée sur les placentas de l'expérience précédente puis sur ceux de l'expérience actuelle, puis l'ARN des MBH et POA de l'hypothalamus est aussi extrait.

Par la suite, une reverse transcription (RT) est réalisée à l'aide protocole du kit Transcriptor FirstStrand cDNA Synthesis (Roche Diagnostics, Bâle, Suisse). Les échantillons d'ARN sont, ici, d'abord dilués à 1/5 pour que les quantités soit accordées avec une qPCR 500ng.

Enfin l'ADN complémentaire produit par la RT est dilué 10 fois pour faire les qPCR. 4 µL d'échantillon était ajouté à 6 µL de mix :

FastStart Universal SYBR® Green Master (Roche)	5 µL
Eau nuclease-free	0.4µL
Primers	0.3µL

Les primers sont dessinés par Integrated DNA Technologie, Inc. (Tableau 1). Comme gène de référence, sont utilisés l'actine qui est un gène codant pour des protéines permettant notamment la liaison de l'ATP et le 18s qui est un gène de l'ADN ribosomal. La qPCR est réalisée à l'aide du LightCycler® 480 (Roche Diagnostics, Bâle, Suisse) en suivant les conditions suivantes : phase d'initialisation de 2 minutes à 50°C et 10 min à 95°C, puis 40 cycles de dénaturation suivant 15 sec à 95°C et enfin une élongation et collecte de données de 60s à 60°C. Les valeurs de CT (cycle threshold) sont obtenues sur la courbe d'amplification de chaque échantillon. Les échantillons sont disposés en triplicat afin de normaliser nos résultats. Les statistiques sont alors faites sur une moyenne des Ct pour chaque gène cible sur chaque échantillon. Les statistiques sont faites suivant la méthode du  $\Delta\Delta Ct$ . Une équation de Pfaffl est également réalisée pour chaque gène testé afin de prendre en compte l'efficacité des couples de primers, seules les efficacités allant de 1.8 à 2.2 sont retenues.

Tableau 1 : liste des primers utilisés pour les qPCR

Actine	S 5' CGC GAG TAC AAC CTT GC 3'
	As 5' ATA CCC ZACC ATC ACA CCC TG 3'
18S	S 5' GTT CCG CTC ACZA CCT CAG AT 3'
	As 5' AGT GCG TTC GAA GTG TCG AT 3'
GREM1	S 5' GGA TCC ACT GAG GTG ACA GAA TG 3'
	As 5' GGG TCT GCT CGG AGT CAT TG 3'
WNT7B	S 5'GTC CTC TAC GTG AAG CTC GGA 3'
	As 5'GAA TCG GAA CTG GTG CTG GC 3'
SPP-1	S 5' GAT GAC GAT GAC GA 3'
	As 5' GCT GGC AGT GAA GGA CTC AT 3'
POSTN	S 5' TGC AAA AAG ACA CAC CTG CAA 3'
	As 5' GGC CTT CTC TTG ATC GCC TT 3'
SRC2-10	S 5' GGT CAG TTG ACA AGC AAG CC 3'
	As 5' AAT AAC CTG CCC AGT TGC CC 3'
SRC2-8	S 5' CAT ACG CCA AGA GGC ATC AC 3'
	As 5' CGT AGT CTG GGA ACG GAT GAG 3'
GnRH	S 5' GAA CGT CTG ATT GAA GAG GAA G 3'
	As 5' TAC TTT ATT ATG AAA TCT ACG CTG 3'
Kiss1	S 5' TGG TGA ACC CTG AAC CCA CAG GC 3'
	As 5' CGG GCA TGG CGA TGT T 3'
ERa	S 5' CGC TCT GCC TTG ATC ACA CA 3'
	As 5' GCC GAG GTA CAG ATT GGC TT 3'
ERb	S 5' TGA GCC GGA CAG ACT ACA GA 3'
	As 5' TAT GAG GAA CAC CGC CAC AC 3'

## Analyses statistiques

Les analyses statistiques sont réalisées à l'aide du logiciel Graphpad Prism 8 (version 8.0.2, Dotmatics, Royaume-Uni). Les données sont représentées sous forme de moyenne  $\pm$  SEM. Les statistiques concernant les qPCR et le poids des animaux poids sont réalisées à l'aide d'un test ANOVA à un facteur ou test Student. Le nombre de portées

ainsi que le sex ratio sont soumis à un test de contingence ainsi qu'à une ANOVA à deux facteurs. Enfin l'évolution du poids des F1 est analysée à l'aide d'un test Student multiple.

## Résultats

### Effets de l'exposition prénatale au BPA et BPS sur la gestation et la croissance foetale

Nous avons déterminé l'effet de l'exposition prénatale au BPA et au BPS sur le pourcentage de femelles enceintes après fertilisation (Figure 13). On note que les femelles exposées durant la gestation au BPA 4 $\mu$ g/kg/j ou BPS 25 ng/kg/j présentent un taux de gestation plus faible, bien que non significativement, comparé aux femelles contrôles.

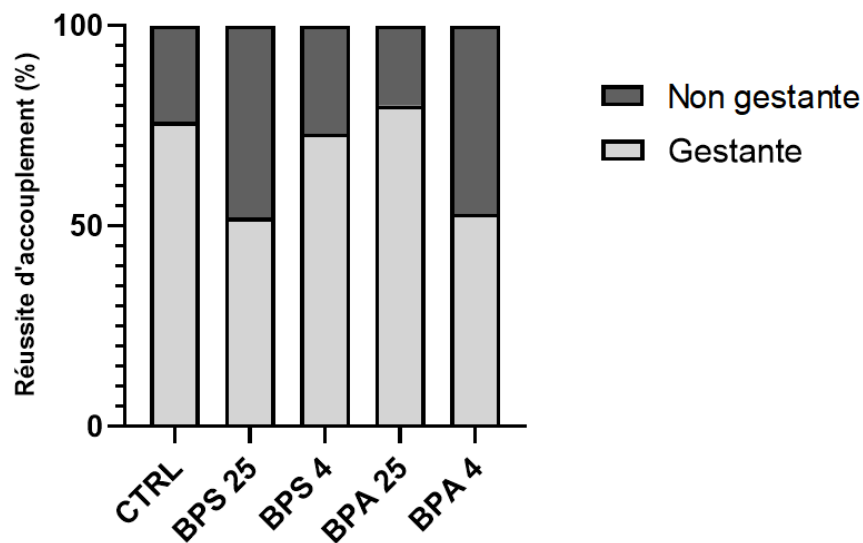


Figure 13 : pourcentage de femelles gestantes après fertilisation, après exposition périnatale au BPS 25 :BPS 25 ng/kg/j, BPS 4 : BPS 4  $\mu$ g/kg/j, BPA 25 : BPA 25 ng/kg/j, BPS 4 : BPS 4  $\mu$ g/kg/j Les données ont été soumises à un test de  $\chi^2$ .

Afin de voir si l'exposition influence l'état général de la descendance, nous avons ensuite étudié les effets de l'exposition gestationnelle au BPA et BPS sur la taille des portées, la croissance placentaire et la croissance foetale. La taille des portées n'a pas été significativement influencée par les différentes expositions. Le poids moyen des fœtus (au 18ème jour de gestation) exposés au BPA 25ng/kg/j ou BPS 25ng/kg/j était significativement plus faible que le groupe contrôle. A l'inverse, le poids moyen des fœtus

exposés au BPS 4 $\mu$ g/kg/j est significativement plus élevé que celui du groupe contrôle. Enfin le calcul du ratio du poids du fœtus contre celui du placenta nous permet de voir si l'altération de la croissance fœtale est associée à une potentielle altération de la croissance placentaire. En comparaison avec le groupe contrôle, les groupes BPA 25ng/kg/j et de BPS 25ng/kg/j montre un ratio significativement plus faible alors que le groupe du BPS 4 $\mu$ g/kg/j montre à l'inverse un ratio significativement plus important que les animaux contrôles. Le BPA 4 $\mu$ g/kg/j ne montre aucune différence significative avec le groupe contrôle concernant le poids du fœtus et du placenta.

Après avoir réalisé le sexage des fœtus, nous avons comparé le nombre de mâles et de femelles dans chaque groupe test (Figure 14). Une analyse ANOVA à deux facteurs n'a pas montré d'effet significatif de l'exposition au BPA ou BPS sur le sex ratio (Figure 15). Cependant l'influence de l'exposition est légèrement différente entre les mâles et femelles concernant le poids du fœtus : les mâles sont plus sévèrement impactés par une exposition au BPS que les femelles, bien que cela ne soit pas significatif.

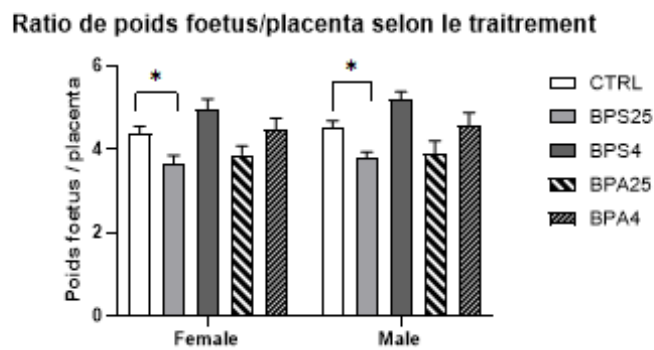
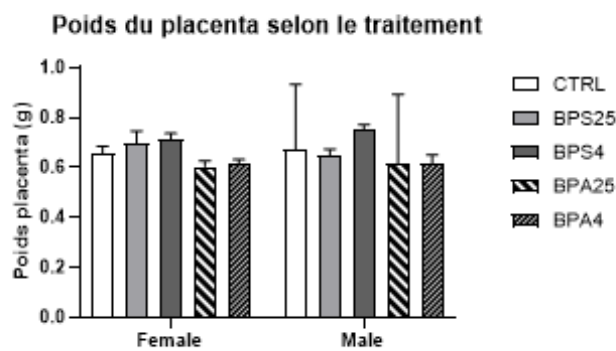
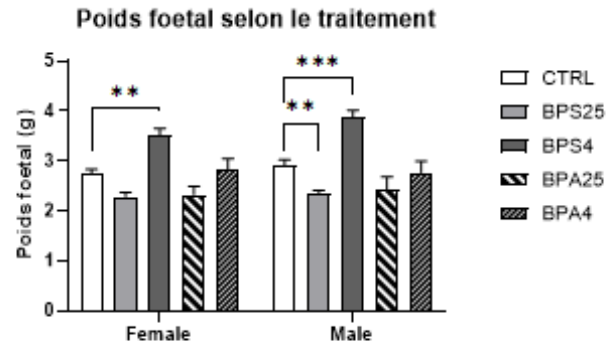


Figure 14 : comparaison des effets de l'exposition au BPA et au BPS sur le poids du fœtus et du placenta des F1, selon leur sexe. Les rats ont été exposés au BPA et au BPS lors de la période périnatale, selon les dosages suivant BPS 25 : BPS 25 ng/kg/j, BPS 4 : BPS 4 µg/kg/j, BPA 25 : BPA 25 ng/kg/j, BPS 4 : BPS 4 µg/kg/j. Les données sont soumises à une ANOVA 2 avec \*, P<0.05 ; \*\*, P<0.01 et \*\*\*, P<0.001 vs le groupe contrôle. Données = moyenne ± SEM.

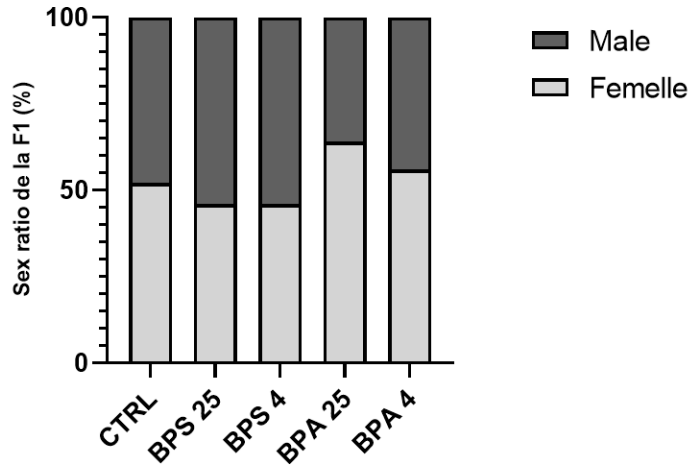


Figure 15 : évaluation des effets de l'exposition au BPA et au BPS sur le sex ratio (%) des F1. Les rats ont été exposés au BPA et au BPS lors de la période périnatale, selon les dosages suivant BPS 25 : BPS 25 ng/kg/j, BPS 4 : BPS 4 µg/kg/j, BPA 25 : BPA 25 ng/kg/j, BPS 4 : BPS 4 µg/kg/j. Les données sont soumises à un Chi<sup>2</sup>.

## Effets de l'exposition périnatale au BPS 25 sur la croissance pondérale et la puberté de la descendance

L'analyse d'un RNAseq réalisé précédemment sur des placenta (GD18) de rats femelles exposés au BPA ou BPS selon les méthodes décrites ci-dessus nous a permis de voir que le BPS 25 ng/kg/j influence l'expression de gènes de la placentation. Nous avons également décrit ci-dessous l'effet du BPS 25 sur la croissance foétale. Afin de pouvoir déterminer un phénotype postnatal potentiellement associé à cette exposition, nous avons suivi la croissance des F1 des mères exposées au BPS 25 ng/kg/j ainsi que celle des F1 contrôle. Nous avons suivi la prise de poids des juvéniles ainsi que leur timing pubertaire. Un T test multiple nous a permis de suivre la prise de poids des petits et de caractériser l'effet de l'exposition au BPS 25 ng/kg/j sur cette prise pondérale. Les résultats sont sensiblement les mêmes entre les groupes mâles et femelles : les animaux exposés au BPS 25 ng/kg/j tendant à être plus léger que les contrôle (Figure 16). Cette différence devient significative chez le jeune adulte. Concernant les femelles, les animaux exposés au BPS 25 ng/kg/j ont un poids légèrement plus faible dont la différence devient significative à l'âge adulte (p90).



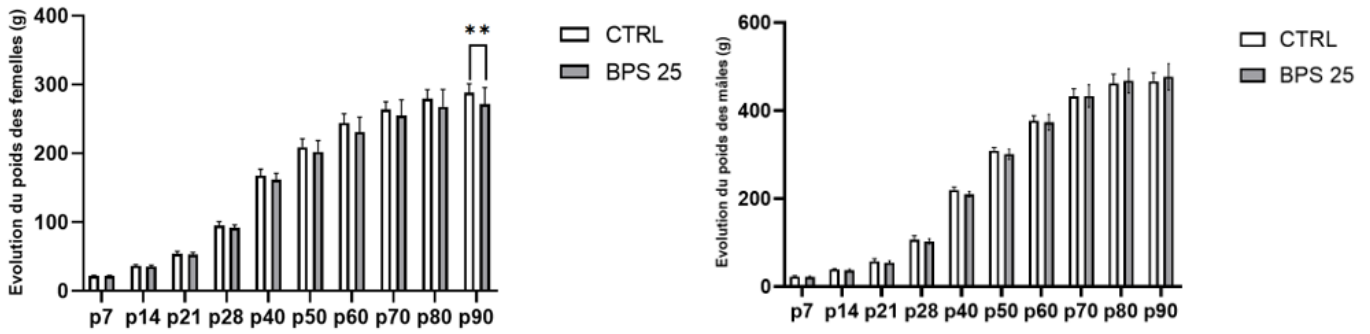


Figure 16 : évaluation des effets de l'exposition au BPS sur la prise de poids des F1 lors de la croissance, selon leur sexe. Les rats ont été exposés et au BPS lors de la période périnatale, selon le dosage suivant BPS 25 : BPS 25 ng/kg/j. Les données sont soumises à un T-test multiple avec \*\*,  $P < 0.01$  vs le groupe contrôle. Données = moyenne  $\pm$  SEM.

Pour expliquer cette différence, nous avons quantifié la prise de nourriture des petits (Figure 17). L'exposition au BPS ne semble pas affecter la prise alimentaire.

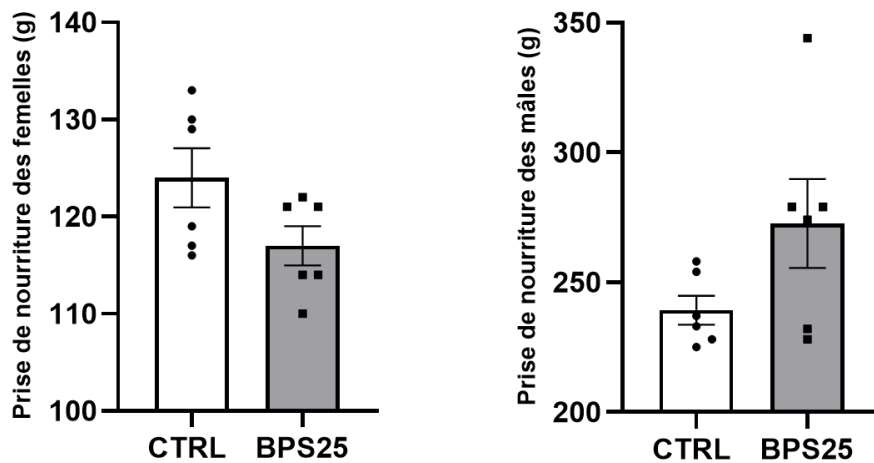


Figure 17 : comparaison des effets de l'exposition au BPS sur la prise de nourriture des F1 lors de la croissance, selon leur sexe. Les rats ont été exposés et au BPS lors de la période périnatale, selon le dosage suivant BPS 25 : BPS 25 ng/kg/j. Les données sont soumises à un T-test multiple. Données = moyenne  $\pm$  SEM.

Le timing pubertaire a été analysé par test de Chi<sup>2</sup> multiple afin de savoir si l'exposition au BPS provoque une puberté précoce ou tardive. L'observation a une nouvelle fois été réalisée chez les mâles comme chez les femelles (Figure 18). L'exposition au BPS à dose environnementale n'affecte pas significativement le timing pubertaire des mâles. Chez les femelles, on note que l'exposition au BPS 25 entraîne une tendance non significative au retard pubertaire puisque la puberté de la moitié de femelles exposées est atteinte avec un jour de retard par rapport aux femelles contrôles.

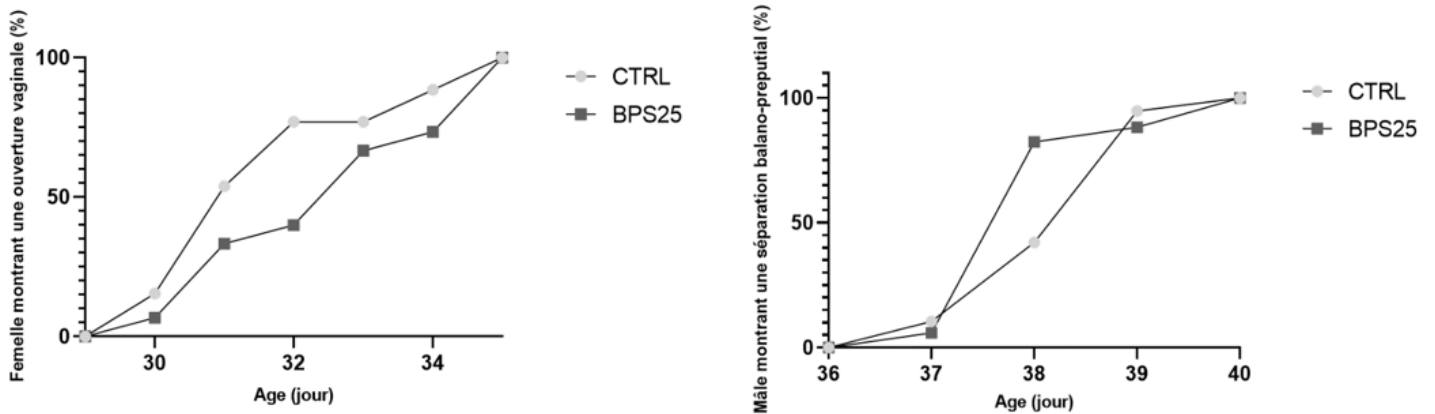


Figure 18 : illustration des effets du traitement au BPS sur le timing pubertaire des F1, selon leur sexe. Les rats ont été exposés et au BPS lors de la période périnatale, selon le dosage suivant BPS 25 : BPS 25 ng/kg/j.

Nous avons également surveillé le poids au moment de la puberté et celui-ci est significativement plus faible chez les rats mâles exposés au BPS que chez les contrôles. Le poids ne montre cependant pas de différence entre les groupes de contrôles et d'exposition chez les femelles (Figure 19).

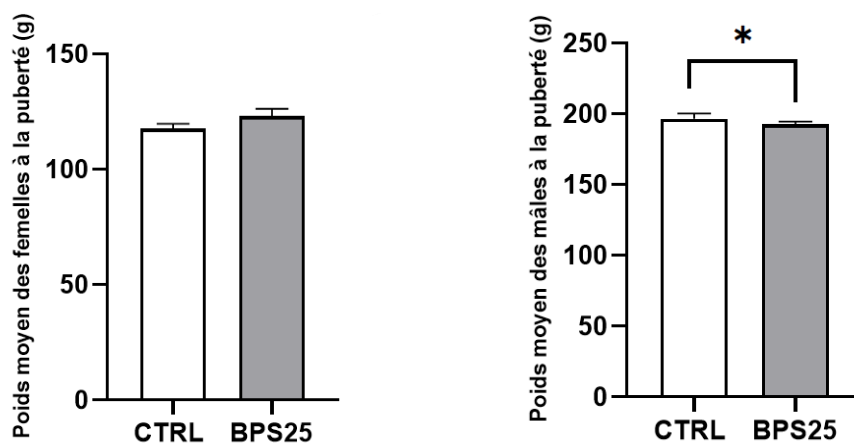


Figure 19 : comparaison des effets de l'exposition au BPS sur le poids au moment de la puberté des F1, selon leur sexe. Les rats ont été exposés au BPS lors de la période périnatale, selon le dosage suivant BPS 25 : BPS 25 ng/kg/j. Les données sont soumises à un T-test avec \*,  $P < 0.05$  vs le groupe contrôle. Données = moyenne  $\pm$  SEM.

Pour finaliser les mesures sur cette exposition, nous avons comparé les poids et tailles des individus mais également le poids, de la graisse brune (BAT) et de la graisse blanche (WAT), chez les femelles (Figure 20) et chez les mâles (Figure 21). Nous avons également

mesuré le poids des gonades chez les deux sexes (Figure 22). L'exposition périnatale au BPS n'affecte pas les différents facteurs de poids et de taille mesurés, à l'exception de la taille des femelles qui est significativement plus petite chez celles traitées au BPS 25 ng/kg/j avec une p-value de 0,019.

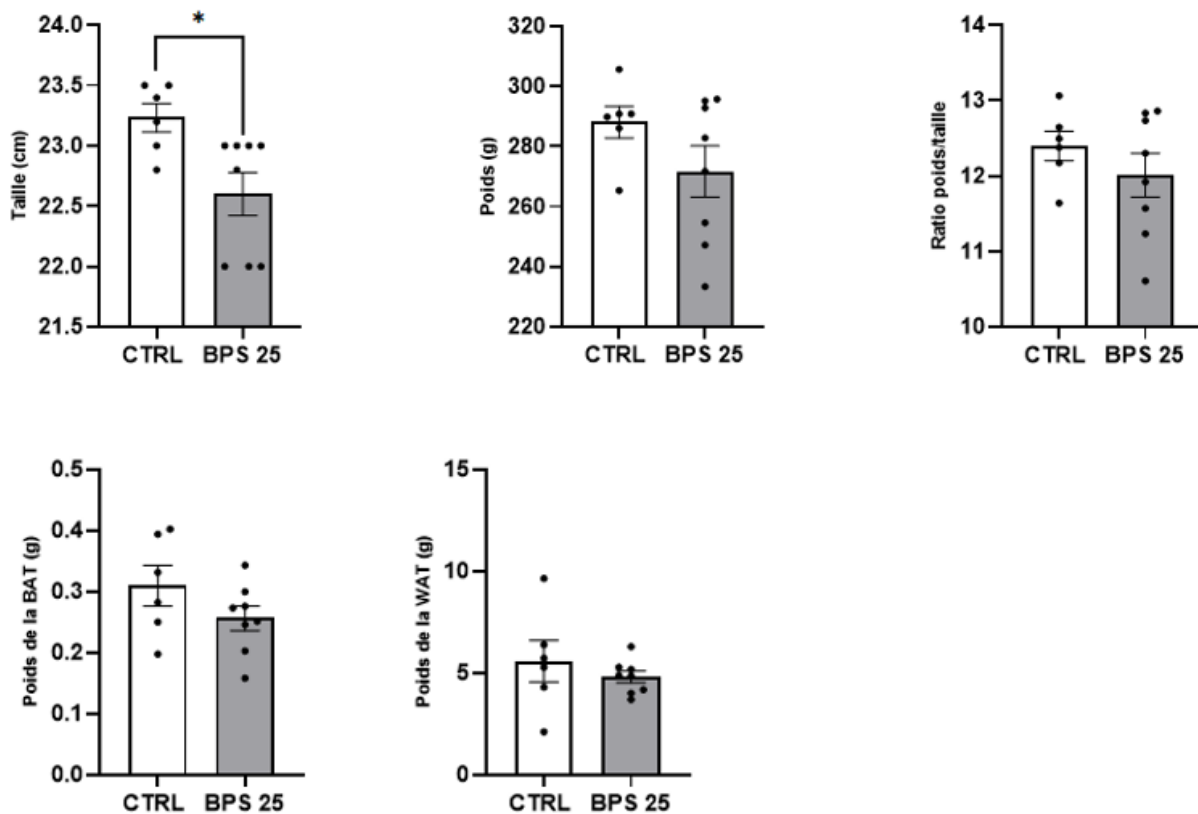


Figure 20 : comparaison des effets de l'exposition au BPS sur la taille et le poids des femelles F1 à p90 ainsi que le poids de la BAT et de la WAT. Les rats ont été exposés au BPS lors de la période périnatale, selon le dosage suivant BPS 25 : BPS 25 ng/kg/j. Les données sont soumises à un T-test avec \*,  $P < 0.05$ . Données = moyenne  $\pm$  SEM.

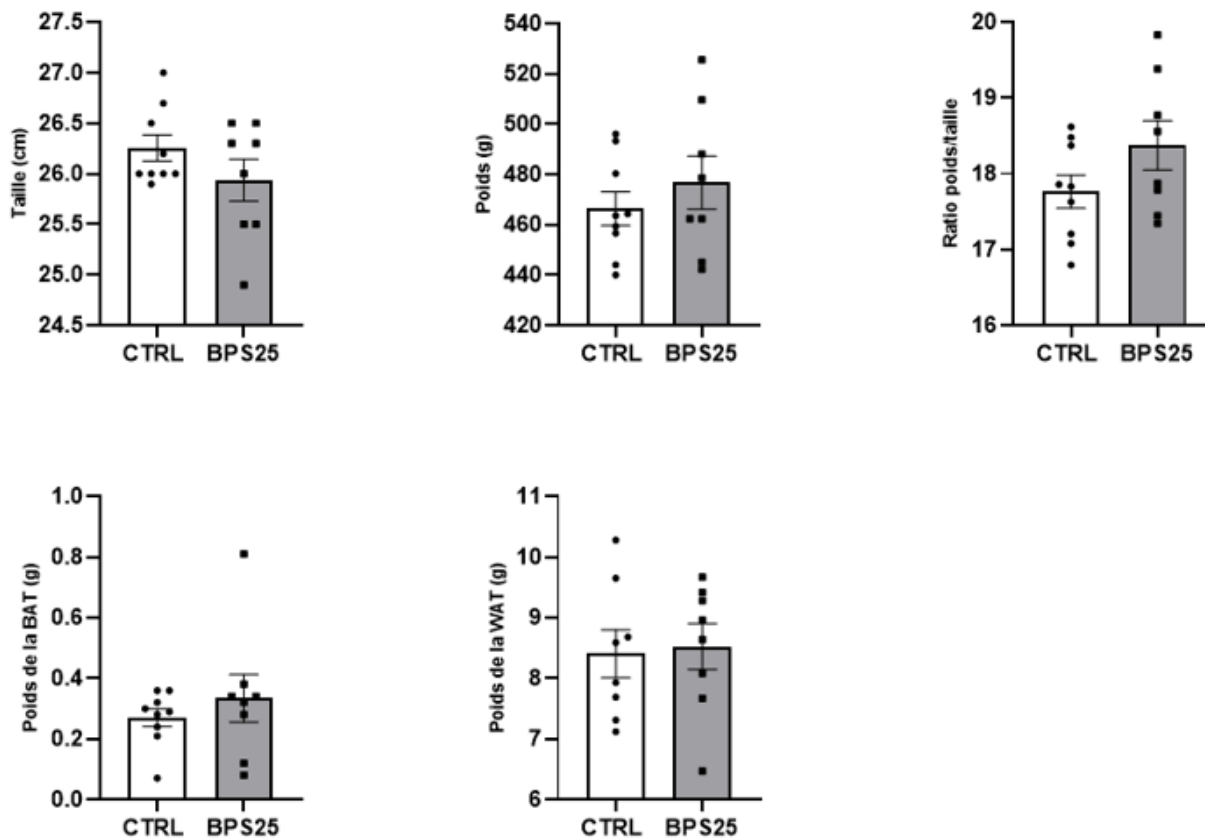


Figure 21 : comparaison des effets de l'exposition au BPS sur la taille et le poids des males F1 à p90 ainsi que le poids de la BAT et de la WAT. Les rats ont été exposés au BPS lors de la période périnatale, selon le dosage suivant BPS 25 : BPS 25 ng/kg/j. Les données sont soumises à un T-test. Données = moyenne  $\pm$  SEM.

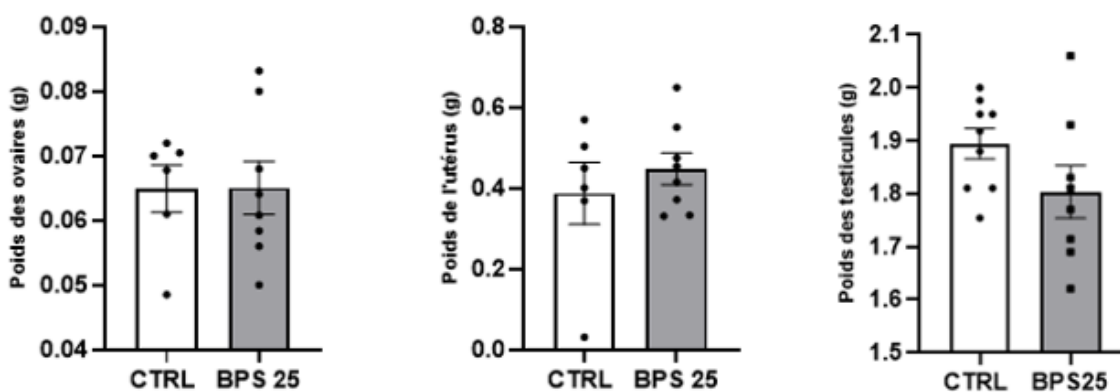


Figure 22 : comparaison des effets de l'exposition au BPS sur le poids des gonades des F1 à p90, selon leur sexe. Les rats ont été exposés au BPS lors de la période périnatale, selon le dosage suivant BPS 25 : BPS 25 ng/kg/j. Les données sont soumises à un T-test. Données = moyenne  $\pm$  SEM.

## Effets transcriptionnels de l'exposition gestationnelle au BPA et BPS au sein du placenta

Code du gène	Grem1	Spp1	Postn	Wnt7b
<b>Implication</b>	Placentation	Placentation / Implantation	Implantation	Placentation / Implantation
<b>Traitement d'effet</b>	BPA4µg	BPS25ng	BPS25ng	BPS25ng
<b>Expression RNAseq</b>	upRegulated	downRegulated	downRegulated	downRegulated

Tableau 2 : Tableau récapitulatif des gènes de la placentation mis en valeur par le RNAseq.

Afin d'identifier des marqueurs transcriptionnels placentaires précoces de l'exposition au BPA et BPS, un RNAseq a été réalisé, par le laboratoire du Pr. Anne-Simone Parent sur des échantillons de placenta de femelles rates ayant subi une exposition au BPA et au BPS aux mêmes concentrations que pour l'expérience actuelle. L'analyse du RNAseq a permis de mettre en avant 4 gènes codant pour la placentation dont l'expression était significativement affectée par l'exposition au BPS 25 ou BPA 4 (Tableau 2).

Les analyses RT- qPCR ont ici été réalisées sur les échantillons issus de la première exposition des rats aux BPA et BPS à doses environnementales. L'expression transcriptionnelle a été étudiée sur 30 échantillons de placentas (n=6 par groupe) femelles (Figure 23) et 25 échantillons de placentas mâles (n =5 par groupe) (Figure 24). L'expression de l'ARNm codant pour le gène Spp1 est significativement plus faible au sein des placentas femelles exposés au BPS 25ng/kg/j et 4µg/kg/j en comparaison avec le groupe contrôle. Concernant les mâles, on voit cette fois une sous expression du gène Wnt7b dans le groupe exposé au BPS 4µg/kg/j comparée au groupe contrôle.

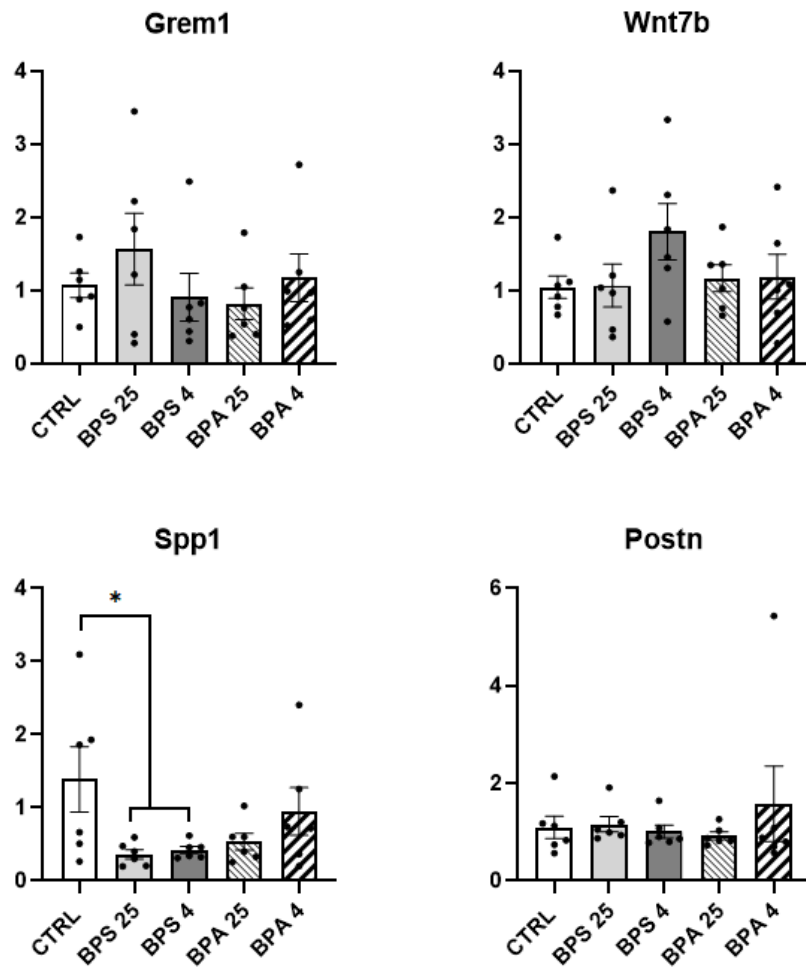


Figure 23 : expression placentaire de l'ARNm codant pour les gènes *Grem1*, *Wnt7b*, *Spp1* et *Postn* dans le placenta de fœtus femelles contrôles ou exposées au BPA et au BPS lors de la période périnatale, selon les dosages suivant BPS 25 : BPS 25 ng/kg/j, BPS 4 : BPS 4 µg/kg/j, BPA 25 : BPA 25 ng/kg/j, BPS 4 : BPS 4 µg/kg/j.. Les données sont soumises à une ANOVA 1 avec \*,  $P < 0.05$  vs le groupe contrôle. Données = moyenne  $\pm$  SEM.

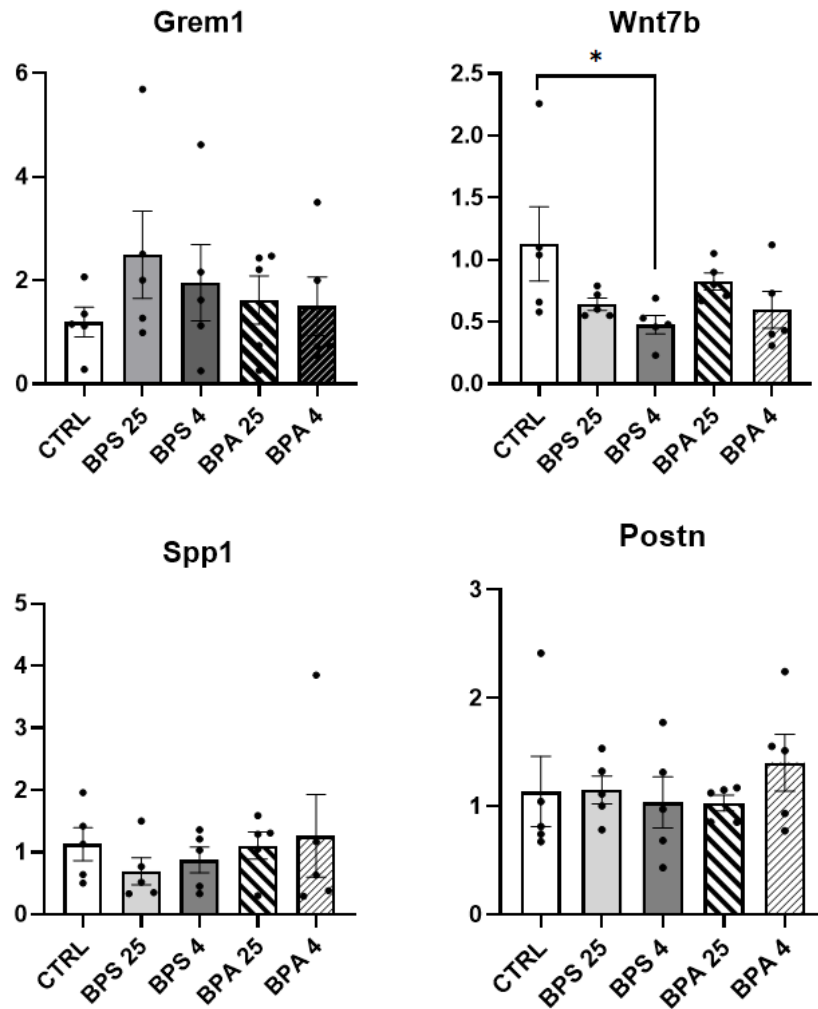


Figure 24 : expression placentaire de l'ARNm codant pour les gènes *Grem1*, *Wnt7b*, *Spp1* et *Postn* dans le placenta de fœtus males contrôles ou exposés au BPA et au BPS lors de la période périnatale, selon les dosages suivant BPS 25 : BPS 25 ng/kg/j, BPS 4 : BPS 4 µg/kg/j, BPA 25 : BPA 25 ng/kg/j, BPS 4 : BPS 4 µg/kg/j. Les données sont soumises à une ANOVA 1 avec \*,  $P < 0.05$  vs le groupe contrôle. Données = moyenne  $\pm$  SEM.

## Effets transcriptionnels de l'exposition périnatale au BPS 25 au sein de l'hypothalamus de la descendance

En complément du timing pubertaire, nous avons analysé par RT-qPCR l'expression des gènes impliqués dans le contrôle hypothalamique de la puberté. Après extraction de l'ARN des échantillons de l'hypothalamus médio-basal (MBH) et de l'aire préoptique (POA), nous avons mesuré l'expression de la kisspeptine 1 (*Kiss1*), de la GnRH, est des récepteurs oestrogéniques alpha (*ERa*) et beta (*ERb*) chez les femelles. Nous avons aussi déterminé l'expression du gène *SRC2*, un co-récepteur des récepteurs aux

œstrogènes, sous deux variants : SRC2-10 et SRC2-8 (splicing alternatif) puisque son expression placentaire est affectée par l'exposition au BPS 25.

Les RT-qPCR ont été réalisées sur les échantillons de MBH et POA des femelles aux âges p21 (Figures 25 et 26) et p35 (Figures 27 et 28) correspondant à la période de sevrage et de puberté. Les CT ont été soumises à une analyse  $\Delta\Delta C_t$  avec, comme gène rapporteur, l'actine.

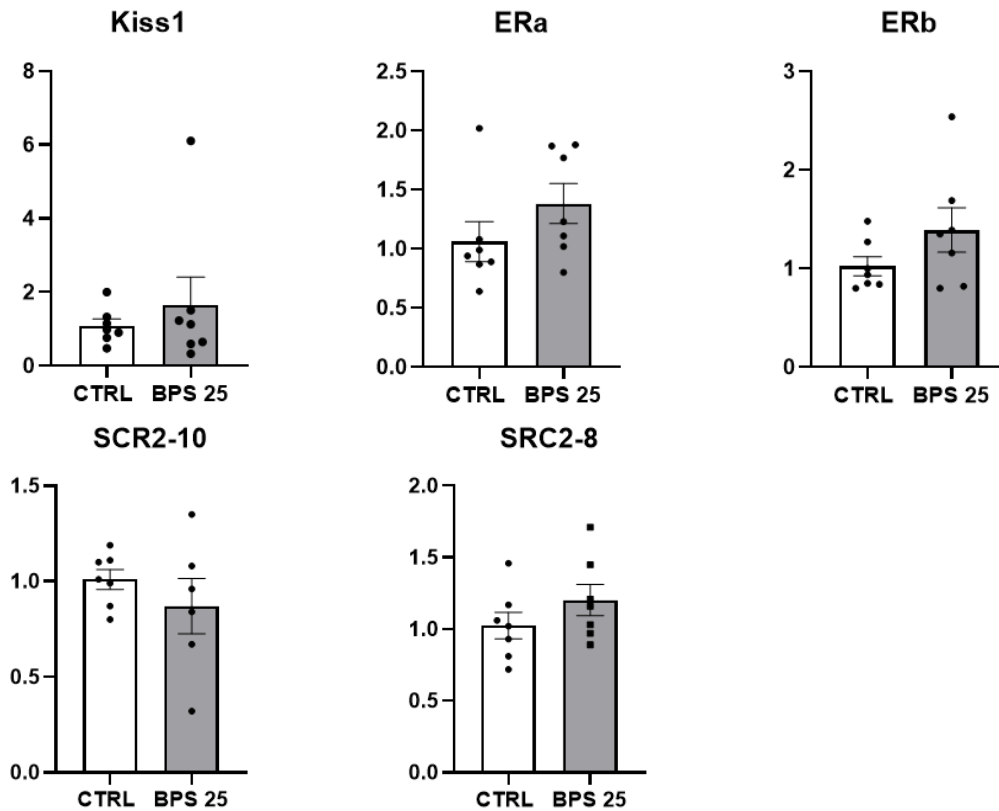


Figure 25 : expression placentaire à p21 de l'ARNm codant pour les gènes Kiss1, ERa, ERb et SRC2 aux variants 10 et 8, dans le MBH des femelles contrôles ou exposées au BPS lors de la période périnatale, selon le dosage suivant BPS 25 : BPS 25 ng/kg/j. L'actine est utilisée en gène de référence. Les données sont soumises à un T-test. Données = moyenne  $\pm$  SEM.



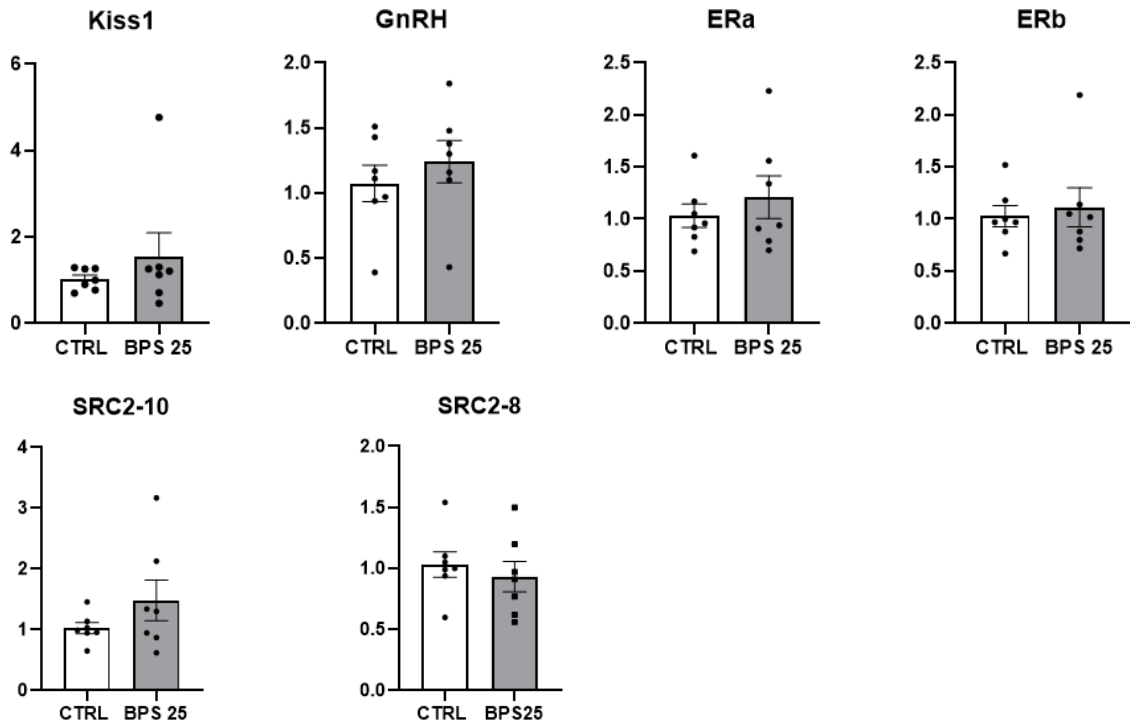


Figure 26 : expression placentaire à p21 de l'ARNm codant pour les gènes Kiss1, ERa, ERb et SRC2 pour les variants 10 et 8, dans le POA des femelles contrôles ou exposées au BPS lors de la période périnatale, selon le dosage suivant BPS 25 : BPS 25 ng/kg/j. L'actine est utilisée en gène de référence. Les données sont soumises à un T-test. Données = moyenne  $\pm$  SEM.

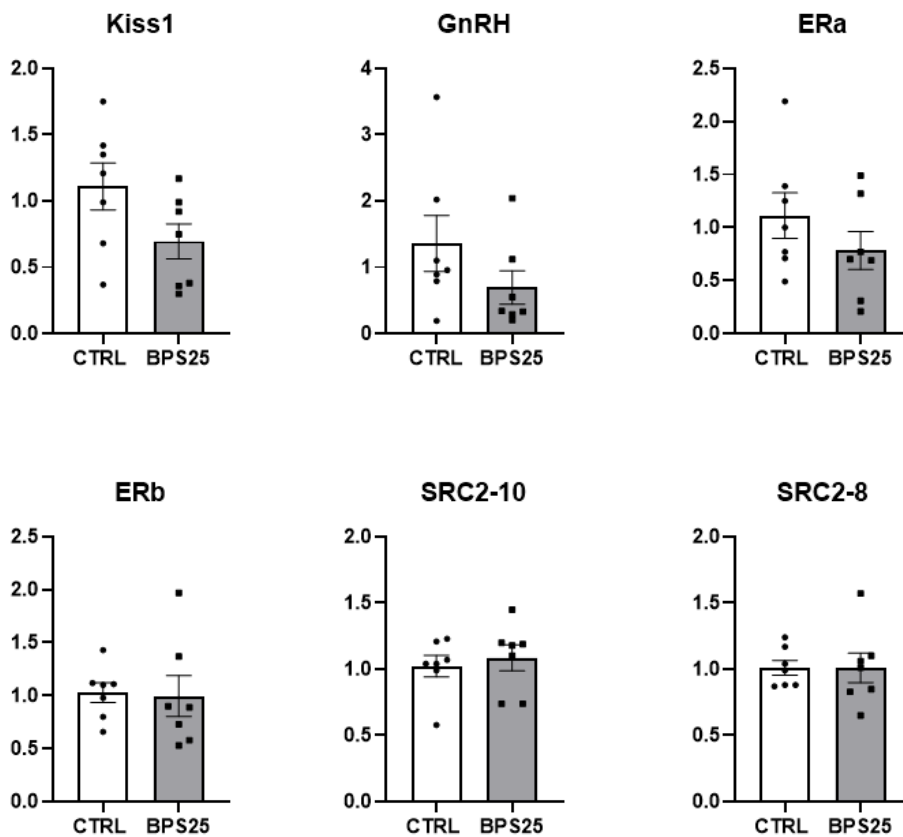


Figure 27 : expression placentaire à p35 de l'ARNm codant pour les gènes Kiss1, ERa, ERb et SRC2 pour les variants 10 et 8, dans le MBH des femelles contrôles ou exposées au BPS lors de la période périnatale, selon le dosage suivant BPS 25 : BPS 25 ng/kg/j. L'actine est utilisée en gène de référence. Les données sont soumises à un T-test. Données = moyenne  $\pm$  SEM.

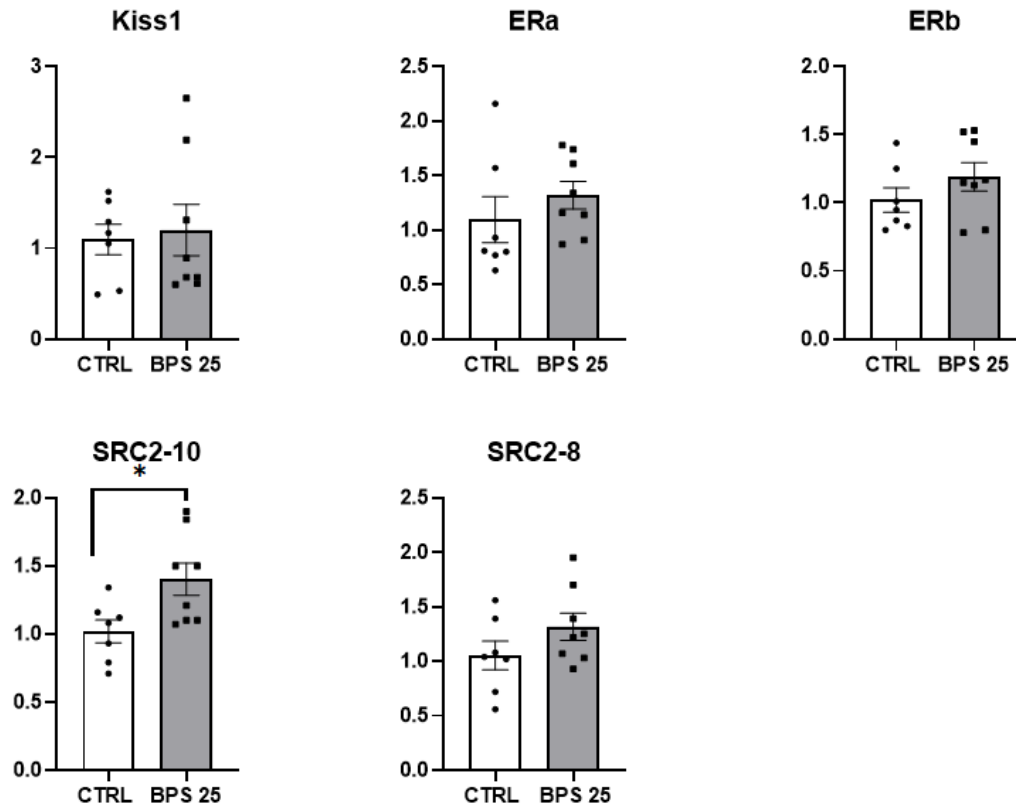


Figure 28 : expression placentaire à p35 de l'ARNm codant pour les gènes Kiss1, ERa, ERb et SRC2 pour les variants 10 et 8, dans le POA des femelles contrôles ou exposées au BPS lors de la période périnatale, selon le dosage suivant BPS 25 : BPS 25 ng/kg/j. L'actine est utilisée en gène de référence. Les données sont soumises à un T-test. Données = moyenne ± SEM.

L'expression de l'ARNm codant pour les gènes impliqués dans le contrôle de la puberté n'est pas affecté significativement par l'exposition au BPS 25ng/kg/j. En effet, l'expression des gènes Kiss1, GnRH et ERa n'est pas affectée dans le POA par l'exposition au BPS 25 ng/kg/j. Cependant, on constate une augmentation significative de l'expression du gène SRC2-10 dans le MBH des femelles F1 à p35, avec une p-value de 0,0232.

## Discussion

### Effets de l'exposition prénatale au BPA et BPS sur la gestation et la croissance fœtale

Les perturbateurs endocriniens peuvent affecter les fonctions placentaires et la croissance fœtale (Fudvoye et al. 2014; Gingrich et al. 2018; Rolfo et al. 2020). En effet le placenta est caractérisé par un nombre conséquent de récepteurs aux stéroïdes ce qui le rend vulnérables aux interactions avec les PEs (Gingrich et al. 2018). De plus, les PEs sont capables de passer la barrière du placenta et vont ensuite s'accumuler dans l'embryon et le liquide amniotique. Le fœtus, pour son développement, est dépendant des hormones. Il y est donc très sensible, ce qui explique pourquoi la présence de perturbateurs endocriniens entraîne un danger pour le développement du fœtus. De plus, certains phénomènes cellulaires sont engagés dans le développement cérébral et sont sensibles aux hormones et donc également aux PEs (Bouret 2017). Enfin, une exposition lors de cette période fœtale est particulièrement délétère puisque le fœtus ne possède pas les enzymes permettant la biotransformation des PEs (Fudvoye et al. 2014). Ainsi, de précédentes recherches ont montré que l'exposition au BPA affectait la croissance fœtale suivant un effet dose-réponse de U inversé (Fudvoye et al. 2014). Ceci sera discuté plus bas. Cependant, les effets du BPS sur la croissance fœtale sont très peu abondants jusqu'à ce jour.

Nous constatons que dans notre expérience, le succès de fertilisation tend à être plus faible chez les femelles exposées pendant la gestation au BPS 25ng/kg/j et BPA 4µg/kg/j. Bien que cette tendance ne soit pas significative, le taux de gestation est proche des 50% seulement au sein de ces groupes. Ceci pourrait indiquer qu'une exposition prénatale au BPA et au BPS serait un frein au succès de fertilisation. Pour le BPA, ce type de résultats n'est pas surprenant puisqu'il a déjà été démontré qu'il entraîne l'arrêt de la progression de l'embryon vers l'implantation dans l'utérus (C. Rosenfeld 2012). De plus, nous avons montré que certains gènes impliqués dans l'implantation et la placentation voient leur expression modifiée par une exposition au BPS, avec *Spp1* et *Wnt7b* qui sont tous les deux sous exprimés. Notons que les taux de gestation sont tout de même assez bas dans tous les groupes, ce qui pourrait être expliqué par le fait que la mise à mâle a été faite sur un

temps court. Nous avons en fait choisi de la faire sur une période de 72 heures afin de connaître la date de fin de gestation et pouvoir réaliser une césarienne le plus tardivement possible mais ceci limite les chances de succès de gestation.

Nos résultats indiquent que l'exposition prénatale au BPA et BPS à faible dose affectent la croissance fœtale. En effet, une exposition périnatale au BPA et au BPS est associée à un poids fœtal plus faible. Dans les groupes exposés au BPA et BPS 25ng/kg/j, le ratio de poids entre le fœtus et le placenta est plus faible en comparaison avec le groupe contrôle. Ceci montre un possible impact de l'exposition au BPA et BPS sur les fonctions placentaires. En effet, le BPA comme le BPS, à une dose de 200µg/kg/j, réduisent la quantité et la qualité des cellules trophoblastiques du placenta chez les souris (J. Mao et al. 2020). Ces cellules permettant les échanges entre le sang de la mère et le fœtus, leur nombre limité engendrera alors un manque de nutriments pour la bonne croissance fœtale. Une récente étude sur cellules humaines (Profita et al. 2021) a montré pour la première fois que le BPA ainsi que le BPS ( $10^{-13}$  et  $10^{-3}$ M) provoquent une altération de la capacité de prolifération et migration des cellules HTR-8/SVneo. Celles-ci sont dérivées des cellules trophoblastiques et sont utiles pour étudier le trophoblaste mais aussi la biologie du placenta. Une telle altération pourrait expliquer une diminution des capacités de fonctionnement du placenta. Cependant, concernant le groupe du BPS 4µg/kg/j, le ratio de poids entre le fœtus et le placenta montre un effet inverse puisqu'il est cette fois plus fort que celui du groupe contrôle. Ceci montre que l'effet du BPS dépend de sa dose.

Peu d'études impliquent la mesure du poids à la naissance après une exposition périnatale au BPA et au BPS, mais nombreuses sont celles menées sur le modèle animal ayant montré qu'une exposition précoce aux PE et plus spécialement au BPA augmente le risque de développer une obésité ou un syndrome métabolique plus tard dans la vie (Fudvoye et al. 2014). En effet lors d'une exposition au BPA à faible dose au cours de la gestation et de la lactation, la descendance montre une augmentation du poids plus forte chez les groupes exposés, que ça soit chez les mâles ou les femelles (Liang et al. 2016; Wei et al. 2011; Rubin et al. 2001). Ajoutons qu'un poids fœtal faible est souvent suivi par une prise de poids forte au cours de la croissance ou à l'âge adulte (Taylor et al. 2018).

Les traitements n'ont cependant pas d'incidence sur le sex ratio de la descendance. Nous savons aujourd'hui que les PEs ont tendance à influencer le sex ratio principalement dans d'autres taxons animaux comme les reptiles (Semenza et Jackson 1997).

### Effets de l'exposition périnatale au BPS 25 sur la croissance pondérale et la puberté de la descendance

De nombreuses données indiquent qu'une exposition gestationnelle ou postnatale précoce aux perturbateurs affecte la croissance ainsi que le développement pubertaire chez les rongeurs (Liang et al. 2016; Wei et al. 2011; Taylor et al. 2018; Rubin et al. 2001; Lopez-Rodriguez et al. 2021). Les perturbateurs endocriniens affectent également le contrôle de la balance énergétique, ils peuvent affecter la neurogénèse hypothalamique ou agir directement sur les hormones telles que la leptine, la ghréline ou l'insuline (Haverinen et al. 2021). Nous savons également que les PEs obésogènes, dont le BPA, qui va donc promouvoir la prise de masse grasse en augmentant les adipocytes, leur taille et leur différenciation chez l'humain (Heindel et al. 2019). L'exposition périnatale au BPS 25ng/kg/j montre plutôt une tendance à un retard de la prise de poids contrairement à ce qui a été montré avec le BPA. En effet, comme pour le poids foetal, les F1 ayant subi une exposition gestationnelle au BPS 25ng/kg/j ont un poids plus faible que les F1 issus de femelles du groupe contrôle. Cette tendance persiste jusqu'à l'âge adulte. Chez les mâles, cette tendance est de moins en moins significative au fil de la croissance ce qui montre une certaine stabilisation alors que chez les femelles, la différence de poids est de plus en plus marquée avec le temps. Il existe donc une différence sexuelle concernant les effets du BPS sur la croissance pondérale chez le rat. L'effet de l'exposition au BPS à faible dose sur la croissance postnatale n'avait encore jamais été montré. Nous avons alors vérifié la prise de nourriture des animaux afin de déterminer si le poids plus faible ne serait pas induit par une prise de nourriture limitée. Nos données n'ont pas montré d'effet de l'exposition au BPS sur la prise alimentaire. Ce profil est intéressant puisqu'il montre la possibilité d'un effet inverse du BPS comparé au BPA, sur le métabolisme. En effet, le BPA est connu comme étant un obésogène alors qu'ici le BPS semble ici associé à une restriction de la croissance pondérale. Comme décrit récemment par Wang et al., le BPA et ces analogues ne montrent pas tous le même effet et certains bisphénols de

remplacement comme le BPAF et le BPE sont plus toxique que le BPA : les  $LC_{50-96h}$  en eau douce du BPAF et du BPE (1.96 et 2.08 mg/L) sont plus faibles que celle du BPA (3.01 mg/L), avec l'espèce de référence du méné à tête de boule. Concernant le modèle du rat, le BPAF suit la même tendance avec une  $LC_{50-96h}$  de 306.91 mg/kg contre 3196.23 pour le BPA. De plus leurs composés intermédiaires ne présentent pas les mêmes effets (Wang et al. 2022). Ceci nous permet de savoir que les bisphénols, bien qu'étant des composés semblables, n'entraînent pas forcément les mêmes mécanismes d'action.

La puberté, qui est contrôlée par l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique, est une cible des PEs. Il a très souvent été démontré que la période de puberté est avancée ou reculée, à la fois chez les mâles et les femelles, à la suite d'une exposition périnatale aux PEs (Fudvoye et al. 2019; Lopez-Rodriguez et al. 2021). Le laboratoire d'Anne-Simone Parent a précédemment montré qu'une exposition postnatale au BPA à faible dose engendre un retard de l'ouverture vaginale chez les rates Wistar (Franssen et al. 2016). Ces résultats indiquaient un mécanisme hypothalamique puisque la maturation de la sécrétion de la GnRH était ralentie suite à une augmentation du tonus GABAergique hypothalamique. Notre recherche montre que l'exposition au BPS à faible dose tend à affecter l'âge de la puberté bien que ceci ne soit pas significatif : chez les femelles, le groupe exposé au BPS présente une ouverture vaginale plus tardive que le groupe contrôle, et chez les mâles le groupe exposé au BPS montre cette fois-ci une légère avance. Le BPS à faible dose semble donc avoir le même effet sur la puberté femelle que son prédécesseur le BPA. Par contre, l'effet semble sexuellement différent.

Notre expérience porte sur une exposition périnatale développementale à des PEs. On peut se poser la question de l'existence d'effets transgénérationnels de ce type de composés, nécessitant alors d'étudier les générations F3 ou F4 au minimum (Mohajer et al. 2021).

### Effets transcriptionnels de l'exposition gestationnelle au BPA et BPS sur les gènes impliqués dans la placentation

Nous avons montré que l'exposition au BPA ou BPS durant la gestation affecte l'expression de gènes impliqués dans la placentation. Ceci suggère que le BPS et le BPA

pourraient affecter les mécanismes d'implantations et de bon fonctionnement du placenta. Le gène *Spp1* codant pour l'ostéopontine est significativement sous exprimé à la suite d'un traitement au BPS 25ng/kg/j et BPS 4µg/kg/j. Ce gène code pour la fermeture du lumen utérin et la formation de la chambre d'implantation (Kramer et al. 2021). Une exposition au BPS diminue les chances de succès d'une implantation correcte chez les femelles. Chez les mâles, c'est le gène *Wnt7b* qui est sous exprimé suite à une exposition au BPS 4µg/kg/j, ce qui pourrait impliquer une dégradation de l'état du chorion puisque *Wnt7b* code pour sa bonne formation (Parr et al. 2001).

On remarque alors une différence du pattern d'expression entre les placentas mâles et femelles, pouvant faire penser à une différence sexuelle de l'impact des substances sur l'expression des gènes (C. Rosenfeld 2012). Toutefois, cette tendance n'est pas significative.

De manière générale, nos résultats montrent que le BPS apporte d'effets délétères, et cela principalement à dose environnementale. L'étude de cet analogue de remplacement, corroboré avec les recherches de Wang et al. nous permet de remettre en question l'utilisation des bisphénols. En effet, il est important de trouver des solutions de remplacement aux composés chimiques dangereux, tout en respectant l'environnement, les organismes et notre santé.

## Conclusion

Cette étude nous permet de montrer que le BPS, à dose environnementale, induit des modifications de la transcription de certains gènes liés à la placentation et que cet effet est différent selon le sexe. Ces effets transcriptionnels pourraient expliquer l'effet négatif du BPS à faible dose sur la croissance fœtale. De plus, en étudiant le poids et la puberté de la descendance après une exposition périnatale au BPS 25ng/kg/j, nous avons observé une influence de l'exposition après seulement une génération, à la fois chez les mâles et chez les femelles.

L'expérimentation nous permet de montrer les effets néfastes d'une exposition au BPA et au BPS à dose environnementale ce qui permettra de souligner une fois de plus l'effet des

polluants et perturbateurs endocriniens afin d'influencer les choix de législation concernant ces substances.



## Références

- Barcelo, Damia, et Antonius Kettrup. 2004. « Endocrine Disruptors ». *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378 (3): 547-48. <https://doi.org/10.1007/s00216-003-2418-8>.
- Bouret, Sebastien G. 2017. « Development of Hypothalamic Circuits That Control Food Intake and Energy Balance. » In *Appetite and Food Intake: Central Control*, édité par Ruth BS Harris, 2nd éd., 135-54. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis. <https://doi.org/10.1201/9781315120171-7>.
- Cora, Michelle C., Linda Kooistra, et Greg Travlos. 2015. « Vaginal Cytology of the Laboratory Rat and Mouse: Review and Criteria for the Staging of the Estrous Cycle Using Stained Vaginal Smears ». *Toxicologic Pathology* 43 (6): 776-93. <https://doi.org/10.1177/0192623315570339>.
- Cullon, Donna L., Mark B. Yunker, Jennie R. Christensen, Robie W. Macdonald, Michael J. Whitar, Neil J. Dangerfield, et Peter S. Ross. 2012. « Biomagnification of polychlorinated biphenyls in a harbor seal (*Phoca vitulina*) food web from the strait of Georgia, British Columbia, Canada ». *Environmental Toxicology and Chemistry* 31 (11): 2445-55. <https://doi.org/10.1002/etc.1963>.
- Elefant, Élisabeth. 2012. « Le passage placentaire des immunoglobulines ». *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine* 196 (8): 1601-12. [https://doi.org/10.1016/S0001-4079\(19\)31686-3](https://doi.org/10.1016/S0001-4079(19)31686-3).
- Franssen, Delphine, Arlette Gérard, Benoit Hennuy, Anne-Françoise Donneau, Jean-Pierre Bourguignon, et Anne-Simone Parent. 2016. « Delayed Neuroendocrine Sexual Maturation in Female Rats After a Very Low Dose of Bisphenol A Through Altered GABAergic Neurotransmission and Opposing Effects of a High Dose. » *Endocrinology* 157 (5): 1740-50. <https://doi.org/10.1210/en.2015-1937>.
- Fudvoye, J, D Franssen, E Naveau, A Pinson, A Gerard, J-P Bourguignon, et A S Parent. 2014. « LA PERTURBATION ENDOCRINIENNE »: *Rev Med Liège*, 6.
- Fudvoye, David Lopez-Rodriguez, Delphine Franssen, et Anne-Simone Parent. 2019. « Endocrine disruptors and possible contribution to pubertal changes ». *Puberty* 33 (3): 101300. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2019.101300>.
- Gingrich, Jeremy, Yong Pu, Jennifer Roberts, Rajendiran Karthikraj, Kurunthachalam Kannan, Richard Ehrhardt, et Almudena Veiga-Lopez. 2018. « Gestational bisphenol S impairs placental endocrine function and the fusogenic trophoblast signaling pathway ». *Archives of Toxicology* 92 (5): 1861-76. <https://doi.org/10.1007/s00204-018-2191-2>.
- Gore, A. C., V. A. Chappell, S. E. Fenton, J. A. Flaws, A. Nadal, G. S. Prins, J. Toppari, et R. T. Zoeller. 2015. « EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals ». *Endocrine Reviews* 36 (6): E1-150. <https://doi.org/10.1210/er.2015-1010>.
- Gore, Andrea C, David Crews, Loretta L Doan, Michele La Merrill, Heather Patisaul, et Ami Zota. 2014. « INTRODUCTION TO ENDOCRINE DISRUPTING CHEMICALS (EDCs) », 76.
- Goyal, Dipali, Sean W. Limesand, et Ravi Goyal. 2019. « Epigenetic responses and the developmental origins of health and disease ». *Journal of Endocrinology* 242 (1): T105-19. <https://doi.org/10.1530/JOE-19-0009>.
- Haverinen, Elsi, Mariana F. Fernandez, Vicente Mustieles, et Hanna Tolonen. 2021. « Metabolic Syndrome and Endocrine Disrupting Chemicals: An Overview of Exposure and Health Effects ». *International Journal of Environmental Research and Public Health* 18 (24): 13047. <https://doi.org/10.3390/ijerph182413047>.
- Heindel, Jerrold J., et Bruce Blumberg. 2019. « Environmental obesogens: Mechanisms and Controversies ». *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 59 (1): 89-106. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010818-021304>.
- Helle, E., M. Olsson, et S. Jensen. 1976. « PCB Levels Correlated with Pathological Changes in Seal Uteri ». *Ambio* 5 (5/6): 261-62.

- Kabir, Eva Rahman, Monica Sharfin Rahman, et Imon Rahman. 2015. « A Review on Endocrine Disruptors and Their Possible Impacts on Human Health ». *Environmental Toxicology and Pharmacology* 40 (1): 241-58. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.06.009>.
- Köllner, Martin G. 2018. « Book Review: An Introduction to Behavioral Endocrinology (5th Edition) ». *Frontiers in Human Neuroscience* 12 (avril): 161. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2018.00161>.
- Konkel, Lindsey. 2016. « Lasting Impact of an Ephemeral Organ: The Role of the Placenta in Fetal Programming ». *Environmental Health Perspectives* 124 (7). <https://doi.org/10.1289/ehp.124-A124>.
- Kramer, Avery C, David W Erikson, Bryan A McLendon, Heewon Seo, Kanako Hayashi, Thomas E Spencer, Fuller W Bazer, Robert C Burghardt, et Greg A Johnson. 2021. « SPP1 expression in the mouse uterus and placenta: implications for implantation† ». *Biology of Reproduction* 105 (4): 892-904. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioab125>.
- Lehmler, Hans-Joachim, Buyun Liu, Manuel Gadogbe, et Wei Bao. 2018. « Exposure to Bisphenol A, Bisphenol F, and Bisphenol S in U.S. Adults and Children: The National Health and Nutrition Examination Survey 2013–2014 ». *ACS Omega* 3 (6): 6523-32. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b00824>.
- Liang, GAO, WANG Han Ning, ZHANG Ling, PENG Fang Yuan, JIA Yue, WEI Wei, et JIA Li Hong. 2016. « Effect of Perinatal Bisphenol A Exposure on Serum Lipids and Lipid Enzymes in Offspring Rats of Different Sex ». *Biomed Environ Sci*, 5.
- Lopez-Rodriguez, David, Delphine Franssen, Sabine Heger, et Anne-Simone Parent. 2021. « Endocrine-disrupting chemicals and their effects on puberty ». *Endocrine disruptors* 35 (5): 101579. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2021.101579>.
- López-Rodríguez, David, Delphine Franssen, Elena Sevrin, Arlette Gérard, Cédric Balsat, Silvia Blacher, Agnès Noël, et Anne-Simone Parent. 2019. « Persistent vs Transient Alteration of Folliculogenesis and Estrous Cycle After Neonatal vs Adult Exposure to Bisphenol A. ». *Endocrinology* 160 (11): 2558-72. <https://doi.org/10.1210/en.2019-00505>.
- Mao, Jiude, Ashish Jain, Nancy D. Denslow, Mohammad-Zaman Nouri, Sixue Chen, Tingting Wang, Ning Zhu, et al. 2020. « Bisphenol A and bisphenol S disruptions of the mouse placenta and potential effects on the placenta–brain axis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117 (9): 4642. <https://doi.org/10.1073/pnas.1919563117>.
- Mao, W., L. Mao, N. Zhao, Y. Zhang, M. Zhao, et H. Jin. 2022. « Disposition of Bisphenol S metabolites in Sprague-Dawley rats ». *Science of the Total Environment* 811. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152288>.
- Mielke, Hans, et Ursula Gundert-Remy. 2009. « Bisphenol A levels in blood depend on age and exposure ». *Toxicology Letters* 190 (1): 32-40. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.06.861>.
- Mohajer, Nicole, Erika M. Joloya, Jeongbin Seo, Toshi Shioda, et Bruce Blumberg. 2021. « Epigenetic Transgenerational Inheritance of the Effects of Obesogen Exposure ». *Frontiers in Endocrinology* 12 (décembre): 787580. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.787580>.
- Morgan, Marisa, Alok Deoraj, Quentin Felty, et Deodutta Roy. 2017. « Environmental estrogen-like endocrine disrupting chemicals and breast cancer ». *Hormone-related cancers and endocrine disruptors: new aspects of an old question* 457 (décembre): 89-102. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.10.003>.
- Newbold, Retha R., Elizabeth Padilla-Banks, et Wendy N. Jefferson. 2009. « Environmental estrogens and obesity ». *Special Issue: Endocrine Disruptors from the Environment in the Aetiology of Obesity and Diabetes* 304 (1): 84-89. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.02.024>.
- Parr, Brian A, Valerie A Cornish, Myron I Cybulsky, et Andrew P McMahon. 2001. « Wnt7b Regulates Placental Development in Mice ». *Developmental Biology* 237 (2): 324-32. <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0373>.
- Patisaul, Heather B. 2021. « REPRODUCTIVE TOXICOLOGY: Endocrine Disruption and Reproductive Disorders: Impacts on Sexually Dimorphic Neuroendocrine Pathways ». *Reproduction* 162 (5): F111-30. <https://doi.org/10.1530/REP-20-0596>.

- Profita, Marilyn, Elena Fabbri, Enzo Spisni, et Paola Valbonesi. 2021. « Comparing effects and action mechanisms of BPA and BPS on HTR-8/SVneo placental cells† ». *Biology of Reproduction* 105 (5): 1355-64. <https://doi.org/10.1093/biolre/iaab139>.
- Rajapakse, Nissanka, Elisabete Silva, et Andreas Kortenkamp. 2002. « Combining Xenoestrogens at Levels below Individual No-Observed-Effect Concentrations Dramatically Enhances Steroid Hormone Action. » *Environmental Health Perspectives* 110 (9): 917-21. <https://doi.org/10.1289/ehp.02110917>.
- Rolfo, Alessandro, Anna M. Nuzzo, Ramona De Amicis, Laura Moretti, Simona Bertoli, et Alessandro Leone. 2020. « Fetal–Maternal Exposure to Endocrine Disruptors: Correlation with Diet Intake and Pregnancy Outcomes ». *Nutrients* 12 (6). <https://doi.org/10.3390/nu12061744>.
- Rosenfeld, Cs. 2012. « Effects of Maternal Diet and Exposure to Bisphenol A on Sexually Dimorphic Responses in Conceptuses and Offspring: Maternal Diet and Offspring Responses ». *Reproduction in Domestic Animals* 47 (août): 23-30. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02051.x>.
- Rosenfeld, C.S. 2021. « Transcriptomics and Other Omics Approaches to Investigate Effects of Xenobiotics on the Placenta ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.723656>.
- Rubin, Beverly S, Mary K Murray, David A Damassa, Joan C King, et Ana M Soto. 2001. « Perinatal Exposure to Low Doses of Bisphenol A Affects Body Weight, Patterns of Estrous Cyclicity, and Plasma LH Levels ». *Environmental Health Perspectives* 109 (7): 6.
- Saal, Frederick S vom, et Claude Hughes. 2005. « An Extensive New Literature Concerning Low-Dose Effects of Bisphenol A Shows the Need for a New Risk Assessment ». *Environmental Health Perspectives* 113 (8): 926-33. <https://doi.org/10.1289/ehp.7713>.
- Safe, Stephen. 2004. « Endocrine Disruptors and Human Health: Is There a Problem ». *Toxicology* 205 (1-2): 3-10. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2004.06.032>.
- Semenza, Jan C, et Richard J Jackson. 1997. « Reproductive Toxins and Alligator Abnormalities at Lake Apopka, Florida. » *Environmental Health Perspectives* 105 (10): 3.
- Serman, Ljiljana. 2011. « Development of Placenta in a Rodent - Model for Human Placentation ». *Frontiers in Bioscience* E3 (1): 233-39. <https://doi.org/10.2741/e238>.
- Tait, Sabrina, Roberta Tassinari, Francesca Maranghi, et Alberto Mantovani. 2015. « Bisphenol A affects placental layers morphology and angiogenesis during early pregnancy phase in mice ». *Journal of Applied Toxicology* 35 (11): 1278-91. <https://doi.org/10.1002/jat.3176>.
- Taylor, Julia A., Jennifer M. Sommerfeld-Sager, Chun-Xia Meng, Susan C. Nagel, Toshi Shioda, et Frederick S. vom Saal. 2018. « Reduced body weight at weaning followed by increased post-weaning growth rate interacts with part-per-trillion fetal serum concentrations of bisphenol A (BPA) to impair glucose tolerance in male mice ». *PLOS ONE* 13 (12): e0208846. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208846>.
- Vandenberg, Laura N. 2014. « Low-Dose Effects of Hormones and Endocrine Disruptors ». In *Vitamins & Hormones*, 94:129-65. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800095-3.00005-5>.
- Wang, Jingquan, Min Zheng, Yang Deng, Min Liu, Ying Chen, Naiyun Gao, Erdeng Du, Wenhai Chu, et Hongguang Guo. 2022. « Generality and diversity on the kinetics, toxicity and DFT studies of sulfate radical-induced transformation of BPA and its analogues ». *Water Research* 219 (juillet): 118506. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2022.118506>.
- Wei, Jie, Yi Lin, Yuanyuan Li, Chenjiang Ying, Jun Chen, Liqiong Song, Zhao Zhou, et al. 2011. « Perinatal Exposure to Bisphenol A at Reference Dose Predisposes Offspring to Metabolic Syndrome in Adult Rats on a High-Fat Diet ». *Endocrinology* 152 (8): 3049-61. <https://doi.org/10.1210/en.2011-0045>.
- Williams, William V., Joel Brind, Laura Haynes, Michael D. Manhart, Hanna Klaus, Angela Lanfranchi, Gerard Migeon, et al. 2021. « Hormonally Active Contraceptives, Part II: Sociological, Environmental, and Economic Impact ». *The Linacre Quarterly* 88 (3): 291-316. <https://doi.org/10.1177/00243639211005121>.

- Wolkers, Hans, Christian Lydersen, et Kit M. Kovacs. 2004. « Accumulation and Lactational Transfer of PCBs and Pesticides in Harbor Seals (*Phoca Vitulina*) from Svalbard, Norway ». *Science of The Total Environment* 319 (1-3): 137-46. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(03\)00449-2](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(03)00449-2).
- Xiao, Shuo, Honglu Diao, Mary Alice Smith, Xiao Song, et Xiaoqin Ye. 2011. « Preimplantation exposure to bisphenol A (BPA) affects embryo transport, preimplantation embryo development, and uterine receptivity in mice ». *Reproductive Toxicology* 32 (4): 434-41. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2011.08.010>.
- Yeo, Shel-Hwa, et William H. Colledge. 2018. « The Role of Kiss1 Neurons As Integrators of Endocrine, Metabolic, and Environmental Factors in the Hypothalamic–Pituitary–Gonadal Axis ». *Frontiers in Endocrinology* 9 (avril): 188. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00188>.