

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE 8 MAI 1945 GUELMA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET SCIENCES DE LA TERRE ET DE
L'UNIVERS
DEPARTEMENT D'ECOLOGIE ET DU GENIE DE L'ENVIRONNEMENT



Mémoire de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Sciences Agronomiques
Spécialité : Production et Technologie Laitières

Effets d'une exposition continue à un migrant d'emballage alimentaire « bisphénol A » chez le rat Wistar : PROJET D'ETUDE

Présenté par :

BOUKAHIL Hayet

MEHARZI Hayet

Membres de jury :

Président : Dr. BENYOUNES Abdelaziz

Professeur

Université de Guelma.

Encadreur : Dr. BOUDALIA Sofiane

M.A.B

Université de Guelma.

Examineur : Dr. DJEKOUN Mohamed

M.C.B

Université de Guelma.

Juin 2015

Remerciements

Si ce mémoire a pu voir le jour, c'est certainement grâce au soutien et l'aide de plusieurs personnes qui nous ont permis d'accomplir ce travail dans des conditions idéales.

On profite de cet espace pour les remercier tous.

Nos très vifs remerciements vont à monsieur le professeur BENYOUNES, d'une part parce qu'il a bien voulu présidé le jury de ce mémoire. Et d'une autre part pour ces précieux conseils scientifiques dans le domaine de l'agronomie durant notre cursus universitaire.

Notre gratitude va également au docteur DJEKOUN Mohamed qui nous honore par sa participation dans notre jury en tant qu'examineur.

On remercier tout particulièrement notre encadreur BOUDALIA Sofiane pour avoir accepté diriger ce mémoire, pour ses précieux conseils, et pour la confiance qu'il nous a accordé.

Un grand merci pour les enseignants qui ont contribué de manière directe ou indirecte à l'enrichissement de ce travail.

Enfin, merci à tous les membres de nos familles pour leurs soutien indéfectible, leurs encouragement leurs disponibilité et leurs compréhension sans eux ce mémoire n'aurait jamais vu le jour.

Résumé

Durant la dernière décennie, la problématique de santé liée aux migrants d'emballages s'est étendue à des nouvelles pathologies autres que les problèmes de la reproduction.

L'objectif de ce travail était de définir les conséquences d'une exposition **continue au Bisphénol A**, à des **doses faibles et** définies comme «**non nocives**» par les autorités réglementaires.

Une exposition continue au BPA, fera l'objet d'une étude intégrative chez le rat *Wistar* qui prendra en compte le métabolisme énergétique, le comportement alimentaire (préférences gustatives et prise alimentaire).

Notre protocole va nous permettre de déterminer les effets sur :

- Le développement de la masse corporelle, de tissu adipeux.
- L'évolution des paramètres sanguins (HDL, LDL, Glu, leptine, insuline...).

En conclusion, ce protocole expérimental, va nous permettre de chercher des corrélations entre une exposition aux migrants d'emballages et le développement des maladies métaboliques telles que le diabète et l'obésité.

Mots clés : migrant d'emballage, tissu adipeux, obésité, intolérance au glucose, cholestérol.

Abstract

During the last decade, the issue of health-related chemical migrants includes Bisphenol A (BPA) has been extended to new diseases other than reproductive problems.

The objective of this study was to define the effects of lifelong exposure to BPA, at low doses defined as "non-harmful" by the authorities.

In this aim, the effects of BPA will be investigated in the *Wistar* rat by using an integrative experimental approach which takes into account feeding behavior (food intake and food preferences) and development.

Our protocol will allow us to determine the effects on:

- Body weight development and adipose tissue differentiation.
- Changes in blood parameters (HDL, LDL, Glu, leptin, insulin ...).

In conclusion, this experimental protocol, will allow us to look for correlations between exposure to chemicals migrants from food packaging and the development of metabolic diseases such as diabetes and obesity.

Keywords: chemicals migrants, adipose tissue, obesity, glucose tolerance, cholesterol.

ملخص

خلال العقد الماضي، المشاكل الصحية مرتبطة بتغليف الاغذية وقد وسعت أمراض جديدة أخرى منها مشاكل الإنجاب

والهدف من هذا العمل لتحديد عواقب استمرار التعرض لثنائي الفينول أ في الجرعات المنخفضة الذي يعرف بأنه غير مؤدي من قبل السلطات التنظيمية وستكون الدراسة التكاملية في فئران هام ستر ويجب أن يؤخذ بعين الاعتبار التمثيل الغذائي والطاقة وسلوك التغذية (تفضيلات الدوق وتناول الطعام)

ولدينا بروتوكول يسمح لنا بتحديد الآثار المترتبة عن :

- تطوير وزن الجسم والأنسجة الدهنية

- تغيرات في فحص الدم حمض الغلوتاميك ليبتين الأنسولين

وفي الختام هذا البروتوكول التجريبي سوف يسمح لنا بالبحث عن الارتباط بين التعرض للتغليف وتطوير الأمراض الاستقلابية مثل السكري والسمنة

Abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique.
AGD	La distance ano-génitale.
ANOVA	Analysis of variance
ANSES	Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail.
BPA	Bisphénol A
DEQM	Direction Européenne de la qualité des médicaments.
E₂	Œstradiol.
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i> (Autorité européenne de sécurité des aliments).
ELISA	Enzyme Linked immunosorbent assay.
GD	Gestation day.
GRP30	G protein coupled receptor for estrogen
HDL	High-density lipoprotein.
INRA	Institut national de la recherche agronomique.
INSERM	Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale.
LDL	Low-density lipoprotein.
NHANES	National Health and nutrition Examination Survey.
NOAEL	No Observed Adverse effect Level.
pc	Polycarbonate.
PND	Post natal day.
REACH	Registration, Evaluation and authorization of chemicals.
SEM	Standard Error Mean.
SFT	Société Française de Toxicologie.

Liste des figures

Figure :	Titre :	Page :
1	Structure chimique du Bisphénol A	3
2	Mode d'action des hormones stéroïdiennes, et du bisphénol A	6
3	Échanges de matières entre les matériaux et leur environnement	7
4	Composition du régime L5 et du régime Harland 2018	19
5	Protocole d'exposition continue (conception-âge adulte) de rats au BPA.	22
6	Dispositif de mesure de la distance ano-génitale	24
7	Détermination du stade de séparation du prépus chez le rat	26
8	Détermination du stade de l'ouverture vaginale chez la ratte femelle au stade pré-pubertaire (A), apparition de la puberté (B).	26
9	Interprétation des frottis chez la ratte	28
10	Dispositif de mesure de la masse grasse	30
11	Coupe histologique de tissu adipeux péri-gonadique	31

Liste des tableaux

Tableau :	Titre :	Page :
1	Propriétés physico-chimiques du Bisphénol A	4

Sommaire

Introduction	1
1. Définition	3
1.1. Structure chimique du bisphénol A	3
1.2. Utilisation du bisphénol A	3
1.3. Caractéristiques du bisphénol A (BPA)	3
1.4. La consommation de BPA	4
1.5. La réglementation	4
1.6. Le mode d'action	5
1.7. Migration de composants de l'emballage vers l'aliment	7
1.8. Voies d'exposition	8
1.9. Niveau d'exposition chez l'homme	8
1.10. Les conséquences d'une exposition au BPA	9
2. Les objectifs du projet	18
3. Matériels et méthodes	18
3.1. Matériel biologique et réactifs chimiques	18
3.1.1. Molécule étudiée	18
3.1.2. Animaux, produits et matériels spécifiques à l'expérimentation animale	18
3.1.2.1. Animaux et hébergement	18
3.1.2.2. Matériel de mesures	20
3.1.3. Expérimentations animales	20
3.1.4. Exposition continue au BPA chez le rat	20
3.1.5. Gestation et développement prénatal	23
3.1.6. Naissances et caractérisation de la portée	23
3.1.7. Croissance et prise alimentaire	23
3.1.8. Distance ano-génitale	24
3.1.9. Apparition de la puberté	25
3.1.10. Durée des cycles œstraux	27
3.1.11. Sacrifice et prélèvements	29
3.1.11.1. Recueil de données avant le sacrifice	29

3.1.11.2. Modalités des sacrifices et prélèvements sanguins	30
3.1.11.3. Prélèvements d'organes et conditions de stockages	30
3.2. Analyse histologique et biochimique des organes	31
3.2.1. Analyse histologique (coloration à l'Hemalun/Eosine).....	31
3.3. Dosage biochimiques	32
3.3.1. Dosage de leptine.....	32
3.3.2. Dosage des marqueurs métaboliques.....	32
3.4. Analyses statistiques des données	33
4. Résultats attendus :.....	35
Références bibliographiques	37

Introduction

Le développement de l'industrie depuis le 18^{ème} siècle a profondément transformé le mode de vie de nos civilisations. Cela a permis d'améliorer notre confort, de consommer une nourriture sans dangers biologiques, d'augmenter fortement l'espérance de vie, de lutter de manière plus efficace contre les maladies.

Depuis une vingtaine d'années, des recherches sont menées afin d'évaluer l'innocuité de ces produits pour la santé humaine. En effet, ils contiennent de nombreuses molécules issues de la chimie n'existant pas dans le monde vivant : les migrants d'emballage. Dans cette catégorie entrent notamment des substances contenues dans les plastiques, les pesticides, des médicaments. Certaines de ces molécules peuvent potentiellement être toxiques pour l'organisme.

De nombreux composés comme des produits de la plasturgie sont soupçonnés d'être des perturbateurs endocriniens, c'est-à-dire « des agents exogènes qui interfèrent avec la production, la libération, le transport, le métabolisme, la liaison, l'action ou l'élimination des hormones naturelles responsables du maintien de l'homéostasie et de la régulation du développement de l'organisme ».

L'interaction de ces migrants d'emballage alimentaire avec les hormones de l'organisme pourrait avoir des effets néfastes sur la santé humaine puisque celles-ci jouent un rôle essentiel dans l'organisme (, métabolisme cellulaire, apport de l'énergie aux cellules, fonction de reproduction, fonctionnement cardiaque...).

Parmi les composés les plus étudiés se trouve le Bisphénol A qui a été l'objet de notre mémoire. C'est un migrant d'emballage considéré comme perturbateur endocrinien ; il est issu de la plasturgie, de type œstrogène-mimétique, qui à ce titre peut interférer avec la fonction de reproduction et d'autres fonctions de système endocrinien.

Plusieurs études épidémiologiques sur le sujet suggèrent l'implication des migrants d'emballage œstrogène-mimétiques environnementaux (ou xœstrogènes) dans l'incidence accrue de l'obésité, des troubles métaboliques, la puberté précoce, de pathologies de la reproduction comme les cancers du sein, de la prostate et des testicules, ou encore de diminution de la qualité et de la quantité du sperme.

Malheureusement et par de moyens, la réalisation de ce projet n'était pas possible.

CONTEXTE SCIENTIFIQUE

1. Définition

1.1. Structure chimique du bisphénol A

Le bisphénol A (BPA) est un composé chimique contient deux groupements fonctionnels hydroxy-phénols et fait partie des composés organiques aromatiques.

Cette famille comprend au moins des dizaines de composés, les plus fréquemment rencontrés ([Cabaton et al 2011](#)).

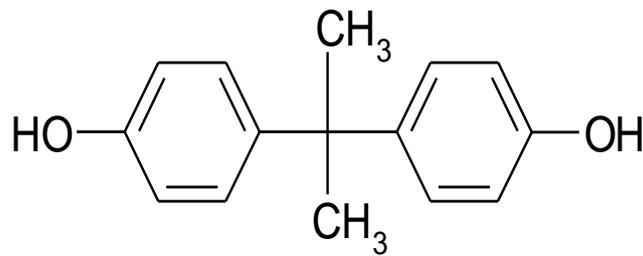


Figure 1 : structure chimique du Bisphénol A

1.2. Utilisation du bisphénol A

Le bisphénol A [(2,2-(4,4'-Dihydroxydiphényl) propane] est synthétisé pour la première fois en 1891, cette molécule est utilisée dans la synthèse de polycarbonates plastiques destinés à la confection d'emballages alimentaires (bouteilles de plastiques), de boîtes de conserves ([Bonfeld-Jorgensen et al 2007](#)).

Le Bisphénol A (BPA) est notamment utilisé dans le polycarbonate, un type de plastique rigide et transparent qu'on trouve donc dans de très nombreux emballages alimentaires, récipients alimentaires (les biberons, les récipients de conservation, etc).

Il existe autre utilisation tel que les produits dentaires (des ciments dentaires) qui contenant des polymères à base de BPA ([Folia et al 2012](#)), également le BPA peut être utilisé dans les formulations de fongicides.

1.3. Caractéristiques du bisphénol A (BPA)

➤ Propriétés physico-chimiques

Tableau 1 : propriétés physico-chimiques du Bisphénol A

Constantes physico-chimiques	Valeur	Valeurs expérimentales ou modélisées
<i>Forme physique (à T° ambiante)</i>	<i>Solide blanc pouvant se présenter sous forme de poudre, écailles ou cristaux, avec une faible odeur phénolique</i>	<i>Valeur expérimentale</i>
<i>Poids moléculaire (g/mol)</i>	<i>228,3</i>	<i>Non précisé</i>
<i>Point d'ébullition (°C)</i>	<i>250-252°C sous 1,7 kPa 360°C sous 101,3 kPa</i>	<i>Valeur expérimentale</i>
<i>Pression de vapeur (Pa)</i>	<i>5,3.10⁻⁶ à 25°C</i>	<i>Valeur expérimentale</i>
<i>Densité vapeur</i>	<i>Non précisé</i>	<i>Non précisé</i>
<i>Densité liquide</i>	<i>1,1 à 1,2</i>	<i>Non précisé</i>
<i>Solubilité dans l'eau (mg/L)</i>	<i>120 - 300 à 25°C</i>	<i>Valeur expérimentale</i>

1.4. La consommation de BPA

La consommation de BPA a nettement augmenté (37%) au sein de l'Union Européenne entre les périodes 1996-1999 (685 000 tonnes/an) et 2005-2006 (1 084 870 tonnes/an).

La consommation mondiale a augmenté à un taux moyen annuel d'environ 10% de 2003 à 2006 : cette hausse s'explique principalement par la forte demande en polycarbonate.

La demande de BPA est supposée atteindre les 5,5 millions de tonnes en 2011.

En 2006, les Etats Unis et le Japon sont les plus gros consommateurs mondiaux de BPA. Les pays de l'Asie et l'Europe de l'ouest sont également de gros consommateurs (plus de 50% de la consommation mondiale).

1.5. La réglementation

Il n'y a pas de réglementation particulière en vigueur de limitation de mise sur le marché du BPA au niveau de l'Union Européenne ou en Amérique du nord. Néanmoins, le récent rapport d'évaluation des risques de cette substance conclut à l'absence actuelle de recommandation de mesure de réduction ([EFSA 2014](#)).

A ce jour, dans le cadre de REACH (Enregistrement, évaluation, autorisation et restriction des produits chimiques), le BPA ne fait pas partie des substances dites « *Very High Concern* = substance extrêmement préoccupante », ni des substances pour lesquelles une intention de déposer un dossier de restriction a été manifestée. A ce jour, d'après la directive cadre sur l'eau, le BPA n'est pas listé (liste des substances prioritaires dans le domaine de l'eau) mais est inscrit au sein de l'annexe III (liste des substances soumises à révision pour leur possible identification comme substance prioritaire ou comme substance dangereuse prioritaire).

En France, la loi n° 2010-729 du 30 juin 2010 a suspendu la commercialisation de biberons produits à base de bisphénol A en attente d'un avis de l'ANSES. Néanmoins, antérieurement à ce texte, un grand nombre d'industriels français avaient décidé de façon unilatérale de se passer de BPA pour la production de certains articles dédiés à l'alimentation des nourrissons ([JORF 2012](#)) ([Arnich et al 2011](#)).

A Paris ainsi que dans d'autres villes françaises (Besançon, Toulouse,...), par mesure de précaution, la mairie de Paris ne commande plus pour ses crèches des biberons contenant du BPA depuis plusieurs mois l'Agence Norvégienne de Contrôle de la Pollution (SFT) a proposé en 2007 (et confirmé cette proposition en 2008 après une phase de consultation) de restreindre la teneur maximale autorisée en BPA des produits de consommation à 0,005% en poids.

1.6. Le mode d'action

Le BPA est un migrant d'emballage alimentaire considéré comme perturbateur endocrinien, c'est à dire une substance étrangère à l'organisme qui produit des effets délétères sur l'organisme ou sa descendance, à la suite d'une modification de la fonction hormonale. De manière générale, il s'agit de substances chimiques d'origine naturelle ou artificielle qui peuvent interférer avec le fonctionnement des glandes endocrines, organes responsables de la sécrétion des hormones. Cette action peut passer par différentes voies ([Riu et al 2011](#)) :

- *Le perturbateur endocrinien peut mimer l'action d'une hormone naturelle et entraîner ainsi la réponse due à cette hormone.*
- *La substance peut empêcher une hormone de se fixer à son récepteur et ainsi empêcher la transmission du signal hormonal.*
- *Enfin la substance peut perturber la production ou la régulation des hormones ou de leurs récepteurs.*

Par ses similitudes structurales à l'œstradiol, le bisphénol A est capable d'agir sur les récepteurs d'œstrogènes : ER α et ER β . Il est considéré comme un œstrogène faible parce que son affinité pour ces récepteurs est 10 000 fois inférieure à celle de du 17 β -œstradiol.

Récemment des indications se sont accumulées suggérant que le BPA pourrait agir sur d'autres types de récepteurs. Il pourrait ainsi agir par l'intermédiaire du récepteur transmembranaire de l'œstradiol GPR30. Des effets via d'autres récepteurs nucléaires d'hormones tels que le récepteur de l'hormone thyroïdienne, le récepteur des androgènes, et les récepteurs des glucocorticoïdes, ont également été suggéré. Plus récemment, le récepteur nucléaire orphelin (ERR γ) a été montré pour capable de lier BPA avec une affinité mille fois plus forte que celle des récepteurs des œstrogènes ([Riu et al 2011](#)).

L'étude de Pascal Phrakonkham et al, sur les cellules 3T3-L1 montre qu'un traitement précoce avec des xéno-œstrogènes (BPA, génistéine et apigénine) peut augmenter l'expression des gènes de différenciation ainsi que l'activité endocrine de l'adipocyte (synthèse de leptine), sans modification du niveau d'expression des récepteurs aux œstrogènes ([Phrakonkham et al 2008](#)). Dans le même sens, Anne Riu et al, montrent que les retardateurs de flamme, qui sont des analogues de BPA [Tetrabromobisphenol A (TBBPA)] et [Tetrachlorobisphenol A (TCBPA)] peuvent se lier au PPAR γ et induire l'adipogenèse dans les cellules 3T3-L1 ([Riu et al 2011](#)).

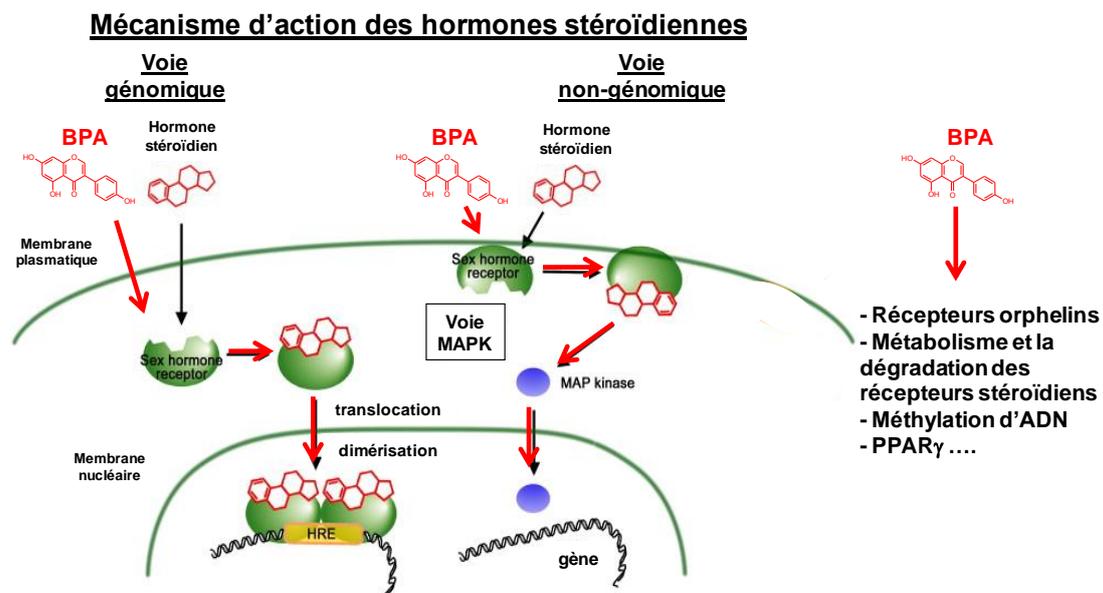


Figure 2 : mode d'action des hormones stéroïdiennes, et du bisphénol A
 [D'après avec modification ([Furukawa & Kurokawa 2007](#))]

1.7. Migration de composants de l'emballage vers l'aliment

Les monomères des matériaux de base ou les additifs incorporés au plastique peuvent se transférer dans l'aliment (figure 3), avec des conséquences sur les plans organoleptique ou toxicologique. Ce phénomène de migration dépend de la composition de l'emballage (nature, volatilité, concentration des molécules) mais également de celle de l'aliment, puisque la migration est fonction des affinités entre le migrant et le produit emballé. La plupart des monomères et des adjuvants étant lipophiles, la migration est généralement plus importante dans un milieu gras que dans un milieu aqueux.

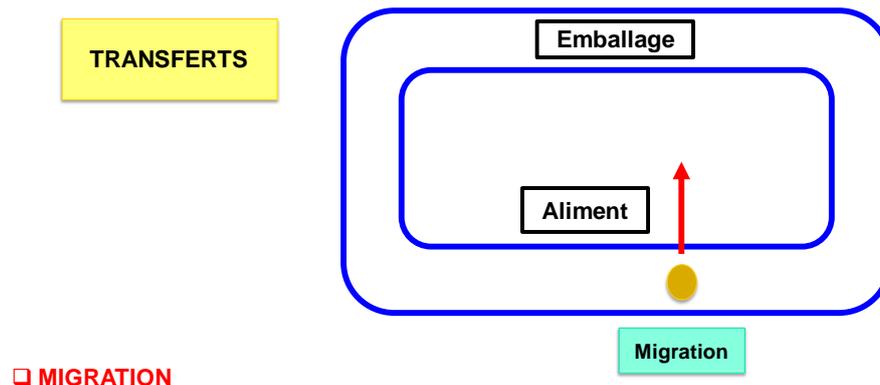


Figure 3 : Échanges de matières entre les matériaux et leur environnement
[D'après (Endrizzi et al 2009)]

Certains constituants de l'aliment, susceptibles de passer dans l'emballage et d'en modifier la structure, peuvent aussi activer la migration de composés du plastique. L'emballage peut enfin être perméable à des contaminations provenant de l'environnement (encre utilisée sur sa face externe, odeurs du lieu de stockage...), qui peuvent également altérer l'aliment. En règle générale, la migration augmente avec la durée et la température de stockage.

Au cours du processus chimique de polymérisation, le BPA réagit et se lie indissolublement à la structure, devenant ainsi une partie constituante du matériau polymère. Plus de 99% de la production globale de BPA est immédiatement convertie en polymères.

Toutefois, comme pour toute procédé chimique, il est possible de retrouver des traces inévitables de BPA (appelé «BPA libre » ou résiduel de BPA) dans le polymère final. La quantité de BPA libre dans le polymère ne joue cependant pas un rôle fondamental dans la migration du BPA. Cela vient du fait que le mécanisme principal responsable de la migration

du BPA du polymère au liquide en contact avec lui est l'hydrolyse, et pas la quantité de BPA libre (BPA résiduel).

De nombreuses études sur la migration du BPA, qui incluent aussi des conditions d'usage quotidien comme le réchauffement, le réchauffement aux micro-ondes, le lavage au lave-vaisselle, l'essorage, la stérilisation, ont montré de façon répétée que la migration du polycarbonate à base de BPA est bien inférieure aux niveaux de sécurité établis par les autorités.

Par exemple, un personne qui pèse 60 kg devrait consommer chaque jour de sa vie plus de 600 kg the nourriture ou boissons qui a été en contact avec le polycarbonate, pour atteindre les limites de sécurité établies par l'EFSA.

1.8. Voies d'exposition

Selon les agences sanitaires internationales, la principale source d'exposition de la population générale est alimentaire. Elle résulte du passage du bisphénol A dans l'aliment ou la boisson à partir des polymères plastiques et résines époxy utilisés pour les surfaces des contenants / Emballages. En effet du BPA résiduel peut migrer des divers contenants alimentaires qui contiennent le polymère et contaminer la nourriture ou la boisson qui est contenue.

C'est le cas lors d'un chauffage prolongé, après exposition à des produits acides ou lors de lavage avec des détergents agressifs et rinçage insuffisant. Les travaux de l'équipe de Pierre-Louis Toutain à Toulouse suggèrent que le BPA peut entrer dans l'organisme par la muqueuse située sous la langue et non pas seulement par voie intestinale. On suspecte également des sources d'exposition par contact, à travers la peau.

Wilson enquête donc sur l'exposition potentielle de 257 enfants d'âge préscolaire à la maison et dans les crèches, dans l'Ohio, aux Etats-Unis. Il étudie des échantillons de nourriture, de boisson, d'air intérieur, d'air extérieur, de poussière intérieure, de sol, de la surface des mains des participants et des échantillons d'urines sur une période de 48 heures. Dans cette étude, l'exposition au bisphénol A survient principalement par l'alimentation (Contribution de 99%) ([Wilson et al 2007](#)).

1.9. Niveau d'exposition chez l'homme

Les mesures de BPA effectuées dans le sang, l'urine, le lait maternel et d'autres tissus indiquent que plus de 90 % des personnes vivant dans les pays occidentaux sont exposées à des niveaux détectables de bisphénol A. Chez l'adulte, on estime que la consommation de

laits contenus dans des bouteilles en polycarbonates, d'aliments en conserve ou de denrées chauffées au four microondes dans leur emballage, entraîne une ingestion moyenne de BPA de **0,1 µg/kg PC/j**.

Des taux supérieurs la limite de détection de **0,5 µg/l** ont été retrouvés dans le placenta, le liquide amniotique et le fœtus chez les rongeurs et dans l'espèce humaine. Le BPA est donc capable de passer la barrière placentaire et d'atteindre le fœtus. L'Agence française de sécurité sanitaire a mis en évidence des risques potentiels de l'exposition au BPA pour la santé des femmes enceintes et de leur fœtus notamment, elle confirme la nécessité d'en réduire l'exposition ([Arnich et al 2011](#)).

1.10. Les conséquences d'une exposition au BPA

L'exposition au BPA pendant la phase de constitution des organes au cours de la gestation (*e.g.* au cours du développement) semble particulièrement critique ([Boudalia et al 2014](#)). De nombreuses études mettent en effet l'accent sur les conséquences d'une exposition au BPA *in utero* et pendant la lactation car elle est susceptible d'interférer directement avec le développement de l'embryon, puis du nouveau-né et d'engendrer des effets à long terme sur la reproduction du jeune et de l'adulte (mâle ou femelle). Chez le rat et la souris mâle, après exposition pendant la gestation et la période postnatale, plusieurs études révèlent des effets du BPA sur l'appareil génital. La transmission à la descendance de certains de ces effets chez les rongeurs exposés suggère que le bisphénol A peut induire des altérations de l'information épigénétique et perturber l'expression de gènes. Chez les femelles après exposition pendant la gestation et la période postnatale, le BPA peut induire une puberté précoce, des altérations de l'utérus, du vagin, de l'ovaire, et de l'endomètre. Par ailleurs, après une exposition *in utero*, des anomalies du comportement maternel et du comportement sexuel sont observées dans les deux sexes ([Della Seta et al 2005](#)). Des effets métaboliques ont également été observés. Les cellules pancréatiques semblent directement touchées par le BPA entraînant des variations dans les sécrétions d'insuline et de glucagon, deux hormones qui jouent un rôle dans l'apparition du diabète de type 2 ([Alonso-Magdalena et al 2010](#)).

Une étude menée en Chine entre 2004 et 2008 a montré, chez des travailleurs fabriquant des produits à base de BPA, que cette exposition (avec des niveaux environ 50 fois plus élevée qu'en population générale) était associée à une augmentation des troubles déclarés de leur fonction sexuelle. Par ailleurs, certains travaux ont montré une diminution de la concentration spermatique en association avec les taux urinaires de BPA. Cependant ces

résultats ne sont pas retrouvés systématiquement et il demeure de nombreuses incertitudes sur l'importance de ce lien.

En 2008, le programme national de toxicologie aux États-Unis (National Toxicology Program) exprime son inquiétude face au BPA qui serait susceptible d'engendrer des troubles « du cerveau, du comportement, de la prostate chez les fœtus, les nourrissons et les enfants ». Le programme a également exprimé sa préoccupation quant à un déclenchement précoce de la puberté chez les filles.

Une étude sur des rats montre que le BPA peut avoir des effets sur l'intestin en utilisant des doses journalières de BPA inférieures à celles admises par l'AFSSA (l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, devenue ANSES) qui sont de 0,05 mg/kg PC, il a été « démontré qu'il agit sur l'épithélium intestinal. Il diminue la perméabilité de cette voie d'échange de l'eau et des sels minéraux et occasionne des rétentions d'eau. D'autre part, chez les rats nouveau-nés, une exposition au BPA augmente le risque de développer une inflammation intestinale sévère à l'âge adulte » ([Braniste et al 2010](#)).

❖ **Les troubles métaboliques**

Dans la littérature, les études se contredisent sur les effets du BPA, cependant la majorité conclut à l'existence d'effets à de très faibles doses sur la balance énergétique et l'homéostasie générale. Une étude épidémiologique menée par The National Health and Nutritional Examination (NHANES) 2003-2008 aux Etats-Unis montre l'existence d'une corrélation entre l'augmentation des concentrations de BPA dans les urines et l'apparition du diabète chez 3967 participants (51,7% femmes) ([Shankar & Teppala 2011](#)).

Chez le modèle animal, une exposition *in utero* à partir du 6^{ème} jour de la gestation jusqu'au sevrage dans l'eau de boisson à des faibles doses (0,1 mg/kg PC/j et 1,2 mg/kg PC/j) montre une augmentation de poids corporel à l'âge adulte chez les deux sexes avec un effet plus prononcé chez les femelles. L'effet également est dose-dépendant car c'est la faible dose qui a le plus d'effet ([Rubin et al 2001](#)). Ces effets sont plus prononcés chez la femelle d'où l'implication des hormones sexuelles ([Somm et al 2009](#)).

Chez des souris mâles adultes, l'exposition au BPA via des injections sous-cutanées (pendant 8 jours), à des doses relativement faibles (100 µg/kg PC/j) diminue le métabolisme énergétique ce qui se traduit par une déficience dans la signalisation d'insuline au niveau périphérique (surtout au niveau musculaire). Le poids corporel n'a pas été affecté alors qu'on

observe une diminution de prise de nourriture, une diminution de la température corporelle et de l'activité locomotrice, ce qui laisse penser que le BPA peut être considéré comme un facteur de risque dans le développement du diabète ([Batista et al 2012](#)). Chez des femelles Sprague-Dawley adultes, ovariectomisés une exposition au BPA à des doses de 4 mg/j ou 5 mg/j via des mini pompes implantées au niveau dorsal pendant 15 j montre une diminution de gain de poids, avec une accumulation préférentielle au niveau du tissu adipeux brun ([Nunez et al 2001](#)). Malgré les effets du BPA sur la balance énergétique, les mécanismes restent encore peu élucidés. Xu et al, 2011 montrent une variation dans la préférence au sucré (saccharine et sucrose) après une exposition *in utero* à des faibles doses de BPA (0,1 mg/kg PC/j, 1 mg/kg PC/j). Cette augmentation de consommation de sucré signifie une augmentation de prise d'énergie qui se traduit par une augmentation de poids corporel ([Xu et al 2011a](#)). Des interactions au niveau du système neuroendocrinien qui contrôle la balance énergétique d'une part et d'autre part la reproduction peuvent être la cible de perturbateur endocrinien, ce qui peut expliquer ces effets ([Bourguignon et al 2010](#)).

In vitro notre équipe a montré que le BPA affecte l'expression des gènes de la différenciation adipocytaire dans 3T3-L1, sans modifier l'accumulation des triglycérides ([Phrakonkham et al 2008](#)). L'équipe d'Angel Nadal, montre que le BPA à faible dose (1 nM) diminue l'activité du canal potassique, augmente la sécrétion d'insuline dans les cellules pancréatiques β de souris ou humaines, avec un effet plus prononcé sur les cellules pancréatiques humaines. Cela signifie que le BPA à des très faibles doses peut altérer l'homéostasie du glucose ([Soriano et al 2012](#)).

Cette analyse nous laisse supposer que le BPA peut avoir d'autres effets à des doses plus faibles, mais également une possibilité d'amplification d'effet ou non en présence d'autres perturbateurs endocriniens.

Aujourd'hui l'impact du BPA sur les troubles métaboliques et cardiovasculaires se confirme. Trois études, deux réalisées dans le cadre de la grande enquête de la *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES, USA), campagne 2003-2008, et une en Chine pointent les liens entre les niveaux de BPA urinaire et le phénotype obèse.

Ce lien est décrit chez les enfants et adolescents avec une spécificité ethnique et chez les adultes. Les niveaux urinaires de BPA seraient également liés à l'existence de troubles du

métabolisme glucidique (diabète, résistance à l'insuline) dans l'enquête NHANES et l'étude chinoise.

L'action *insulinotrope* du BPA est démontrée *in vitro* sur des cellules pancréatiques ce qui pourrait être rapproché des résultats observés chez la souris indiquant que le BPA perturbe la signalisation insulinique et le métabolisme énergétique ([Ropero et al 2008](#)).

Alors que des études précédentes et récentes sur cellules préadipocytaires murines isolées ont montré un effet adipogénique du BPA, une étude réalisée sur des cellules souches humaines en culture montre à l'inverse un effet inhibiteur du BPA sur la lipogénèse.

Le BPA apparait également comme un facteur de risque cardiovasculaire comme le montrent plusieurs études épidémiologiques qui décrivent une association statistique entre les niveaux de BPA urinaire et le degré de sténose de l'artère coronaire, les maladies artérielles périphérique, la survenue de maladies coronariennes et l'hypertension.

Des effets cardiaques arythmogènes rapides du BPA sont décrits sur le cœur de rate impliquant les récepteurs aux œstrogènes ER α and ER β .

❖ **Troubles neuro développementaux et neurocomportementaux**

Les effets en lien avec une exposition au BPA pré ou périnatale sur le développement cérébral sont confirmés par plusieurs études qui montrent, notamment, des modifications du profil de neuro-différenciation, des altérations des systèmes aminergique et glutamatergique, des modifications de l'expression des récepteurs aux œstrogènes α et β , et du nombre de neurones sensibles à l'ocytocine et à la sérotonine. Ces effets sur la neurogénèse sont considérés comme avérés.

Des perturbations anatomo-fonctionnelles s'observent dans le cerveau après exposition prénatale au BPA.

Une étude épidémiologique montre que l'exposition prénatale au BPA entraîne chez les garçons une augmentation significative de la réactivité émotionnelle et du comportement agressif et chez les filles une tendance anxieuse et dépressive ainsi qu'à un comportement plus agressif.

L'impact néfaste du BPA sur le processus de mémorisation régulé par l'œstrogène E2 est montré dans deux études chez le rat femelle et mâle altérant les fonctions des cellules cérébrales ([Farabollini et al 2002](#)).

Chez l'homme comme chez l'animal, la capacité du BPA à traverser la barrière placentaire est établie : Zalko et al, évaluent à 4% de la dose administrée par voie sous-cutanée le passage du BPA à travers le placenta chez les souris CD1 ([Zalko et al 2003](#)). Chez l'homme, une étude montre la présence de BPA (non conjugué) dans les cordons ombilicaux de 152 bébés garçons ([Fenichel et al 2012](#)).

Le passage du BPA à travers le placenta indique une exposition du cerveau durant l'embryogénèse qui pourrait expliquer les altérations observées à l'âge adulte. Cette hypothèse a été confortée lors des autopsies réalisées à l'hôpital Antwerp (Belgique), où l'équipe de Geens, a pu doser le BPA au niveau cérébral (n=8, concentration= 0,91 ng/g) ([Geens et al 2012](#)). Palanza et al, décrivent des altérations dans le comportement maternel chez la souris après des expositions (péri- et post-) natales au BPA à 10 µg/kg PC/j, qui sont plus prononcées que celles obtenues après une exposition continue. Ces changements peuvent être dus à un effet local du BPA sur des sécrétions neuroendocriniennes qui gouvernent le comportement maternel ([Palanza et al 2002](#)).

Dans le même sens, le comportement maternel, évalué sur plusieurs paramètres tels que l'allaitement (Nursing), la construction du nid (Nest building) ou bien le léchage des petits (Pups-licking), est altéré après une exposition *in utero* de 40 µg/kg PC chez le rat Sprague-Dawley ([Della Seta et al 2005](#)). En outre des injections sous-cutanées de 20 µg/kg PC de BPA pendant une période de six semaines (3 semaines de gestation + 3 semaines de lactation) perturbent le comportement suite à des "Open Field Test" dont le but est d'évaluer l'activité locomotrice, et le pouvoir d'exploration chez la souris ([Nakamura et al 2011](#)).

Le BPA peut aussi altérer le dimorphisme sexuel par une masculinisation du comportement social et émotionnel de la femelle ([Yu et al 2011](#)) et aussi, il peut altérer le comportement maternel et les préférences gustatives ([Boudalia et al 2011](#)). Xu et al, montrent une importante perte de dimorphisme chez des souris mâles et femelles exposées au BPA en période postnatale (PND 32 - PND 87) à une dose de 40 µg/kg PC/j et l'auteur avance l'hypothèse que le BPA peut agir comme un œstrogène ou un anti-œstrogène sur certaines régions du cerveau ([Xu et al 2011b](#)).

❖ Effets sur le système reproducteur

Chez l'homme :

Les effets du BPA sur le système reproducteur masculin sont controversés. Les experts soulignent la difficulté de conclure sur la base des études épidémiologiques car celles-ci ne convergent pas totalement, les populations étudiées n'étant pas toujours identiques dans les études analysées (hommes fertiles, hommes infertiles, travailleurs).

Chez l'animal :

L'altération de la production spermatique en lien avec une exposition de 5 semaines à l'âge adulte au BPA, est avérée. Les effets observés par voie orale dans l'étude de Chitra et al. et ceux observés par voie sous-cutanée dans l'étude d'Herath et al. sont convergents pour ce paramètre uniquement pour une exposition survenant à l'âge adulte ([Chitra et al 2003](#)) ([Herath et al 2004](#)).

Les effets sur le système reproducteur mâle (diminution des concentrations plasmatiques de testostérone, modification du comportement sexuel), dus à une exposition pendant la période pubertaire, sont suspectés. ([Kalfa et al 2011](#)).

Chez la femme :

L'effet du BPA sur la maturation ovocytaire chez la femme (diminution du nombre d'ovocytes après stimulation ovarienne et altération de la qualité des ovocytes collectés) ([Mok-Lin et al 2010](#)).

Les autres études épidémiologiques sont peu nombreuses. Les données humaines sont donc à considérer avec prudence et ne sont en rien conclusives d'un effet du BPA sur les paramètres étudiés.

Les experts considèrent, qu'en l'état actuel des connaissances, les données humaines relatives aux effets du BPA sur l'endomètre (endométriose, hyperplasie), sur les ovaires (syndrome des ovaires poly kystiques) et l'issue de la grossesse (fausse-couches et prématurité) chez la femme ne permettent pas de conclure.

Chez l'animal, sur la base de la convergence de résultats d'études effectuées au cours du développement (expositions pré et post-natales) dans différentes conditions et sur différents modèles, les effets suivants peuvent être considérés comme avérés :

- *Augmentation de la survenue de kystes ovariens,*

- *Apparition d'hyperplasies de l'endomètre,*
- *Avancement de l'âge de la puberté lors d'expositions prénatale et post-natale,*
- *Effets sur l'axe hypo thalamo-hypophysaire-gonadotrope due à une exposition in utero ou post-natale précoce entraînant des variations des taux d'hormones sexuelles et de l'expression des récepteurs de ces hormones.*

Les effets liés à une exposition à l'âge adulte (ex. nombre de sites d'implantation, remaniement histologique de la paroi utérine, morphologie du tractus génital,) sont observés mais pour des doses bien supérieures au NOAEL retenu par l'EFSA.

❖ **Effets trans-générationnels et altérations épigénétiques**

Les migrants d'emballage comme le BPA peuvent agir selon l'une ou l'autre voie pour transmettre des effets néfastes vers les générations suivantes. Anway et al montrent qu'une exposition à un perturbateur endocrinien peut s'étendre jusqu'à la 3^{ème} génération après une exposition *in utero* de la F1 ([Anway et al 2005](#)).

La même équipe montre qu'une exposition à un perturbateur endocrinien affecte le transcriptome du cerveau dans deux régions : l'hippocampe et l'amygdale. Cela se traduit par une diminution dans le comportement d'anxiété chez les mâles et une augmentation du même comportement chez les femelles à la 3^{ème} génération ([Skinner et al 2008](#)).

Chez la souris, l'exposition fœtale au BPA provoque des effets persistants, immédiats et trans-générationnels sur le comportement social qui sont associés à des altérations de l'expression de certains gènes dans le cerveau. Des altérations de la morphologie des neurones hippocampaux par de faibles doses de BPA sont décrites.

Dans certains des travaux cités ci-dessus sont mis en avant l'existence de marques épigénétiques (altération chimique de l'ADN sans altération de la séquence nucléotidique) précoces et permanentes dans le temps caractérisant l'exposition néonatale au bisphénol A. Cela est démontré expérimentalement chez l'animal et commence à être étudié chez l'Homme.

Ces marques sont la conséquence d'une modification persistante de l'expression de certaines enzymes impliquées dans le processus de méthylation/dé-méthylation des gènes et rendent compte des effets trans-générationnels observés.

PROJET D'ETUDE

2. Les objectifs du projet

Le bisphénol A est donc un migrant d'emballage qui se distingue par son affinité pour les récepteurs aux œstrogènes et aux androgènes. Plusieurs études illustrent des effets du BPA le développement de la masse grasse et le métabolisme énergétique ([Ruhlen et al 2008](#)) ([Boudalia et al 2014](#)).

Dans ce contexte, il était légitime de retenir cette molécule pour explorer et évaluer les effets d'une exposition au BPA sur le métabolisme énergétique.

L'objectif principal de cette étude sera donc d'identifier les effets d'une exposition **continue** (de la conception à l'âge adulte) au BPA sur le comportement alimentaire et de prendre en considération des cibles périphériques (tissu adipeux), des paramètres métaboliques (dosages sériques) et des paramètres développementaux (puberté, distance ano-génitale).

Le choix de ce type d'exposition (de la conception à l'âge adulte, et le choix de cette dose (BPA=5 µg/kg PC/j) permet de se rapprocher le plus de ce qui se passe dans notre environnement.

L'objectif à terme est de pouvoir relier les effets de ce type d'exposition à des problèmes de santé publique telle que l'obésité et le développement des troubles métaboliques.

3. Matériels et méthodes

3.1. Matériel biologique et réactifs chimiques

3.1.1. Molécule étudiée

Le bisphénol A (CAS : 80-50-7, ré f 239658) de chez Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) et sa pureté est $\geq 99\%$. Tous les produits sont conformes aux normes exigées par la DEQM (Direction Européenne de la Qualité du Médicament & Soins de Santé) (<http://www.edqm.eu/en/Homepage-628.html>).

3.1.2. Animaux, produits et matériels spécifiques à l'expérimentation animale

3.1.2.1. Animaux et hébergement

Origine : Les rats qui seront utilisés sont des rats Wistar Han. Ils seront reçus à l'âge de 6 semaines et seront hébergés à l'animalerie de l'université de Guelma, en conditions contrôlées (22°C, 55% d'humidité relative, cycles jour/nuit de 12h/12h).

Nature des cages et biberons : Toute utilisation de plastiques et consommables en polycarbonate sera écartée pour éviter des contaminations en bisphénol A ou phtalates. Les animaux seront hébergés en cages de polypropylène (4 animaux/cage) et les biberons seront en verre ou en polypropylène.

Régimes : A leur arrivée, les animaux seront alimentés avec un régime *low phyto-estrogènes* 2018 (Harland Teklad, figure 1), c'est-à-dire avec le même régime qu'ils reçoivent depuis le sevrage chez le fournisseur. Ce régime à une teneur réduite en phyto œstrogènes (250 mg/kg) par rapport à un régime standard, donc il contient moins d'isoflavones (dont la génistéine). Bien qu'il soit préconisé pour l'étude des migrants d'emballage, il n'est pas totalement dépourvu de phyto-estrogènes. Avant toute expérimentation, les animaux seront donc adaptés pendant 15 jours à un régime de croquettes semi-synthétique, "le régime L5" (INRA, Jouy-en-Josas, France) (Figure 1)] pendant les 11 semaines. Ce régime permet de s'affranchir de la présence de phyto-œstrogènes. Les régimes seront donnés *ad libitum* et les cages sont réapprovisionnées tous les deux jours.

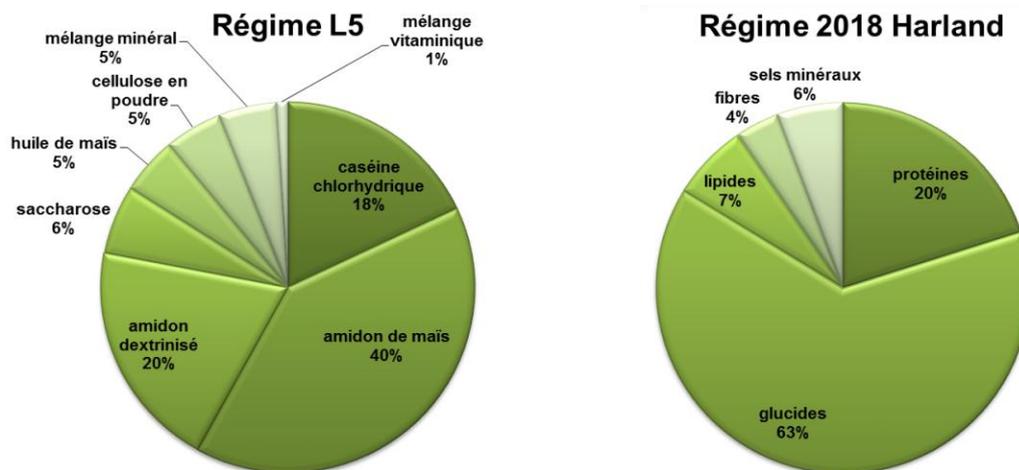


Figure 4 : Composition du régime L5 et du régime Harland 2018

Eau de boisson : L'eau de boisson qui sera utilisée est de l'eau de ville filtrée sur charbon actif pour éliminer toute trace de contaminant (pesticides, détergents) pouvant avoir des effets endocriniens.

Les litières : Les litières seront composées de sciures de peuplier, qui ne dégageront pas de poly-phénols ni de terpènes susceptibles d'agir aussi comme phyto-estrogènes. La litière sera auto-clavée à 134°C pendant 10 min, elle sera changée une fois par semaine.

3.1.2.2. Matériel de mesures

Les régimes et les animaux seront pesés avec une balance électronique couplée à un système informatique qui permettra une acquisition directe des données sur des fichiers EXCEL. Ce dispositif permettra d'éviter des erreurs lors de la prise de données et assurera une traçabilité.

- Réactifs pour analyses d'histologie

Les réactifs Shandon Rapid-Fixx™ (réf : 230014), Shandon Cryomatrix™ (réf : 230125) de chez Thermo Scientific (Courtaboeuf, France). L'Hémalun de Mayer (réf : 1.09242.0500) de chez Merck Chimie (Fontenay-sous-Bois, France). Le Fuchsine-Ponceau (réf : C0443), phosphomolybdique (réf : G0012) et le Vert Lumière (réf : CO702) de chez Diapath (Francheville, France). L'isopentane de chez Carlo Erba (Val de Reuil, France). L'Optimal Cutting Temperature OCTTM (réf : 004511241), le Safesolv (réf : 00699464), le Safemount (sans xylène) (réf : 00647520), et le formaldéhyde 40% de chez Labonord (Templemars, France).

- Réactifs de biochimie

Tous les produits chimiques qui seront utilisés pour les analyses immunologiques seront livrés par Sigma-Aldrich et seront de la meilleure pureté.

3.1.3. Expérimentations animales

Toutes nos expérimentations animales seront soumises à l'approbation du comité d'éthique de l'Université de Guelma. Les animaux seront traités avec soins et respect. Tout animal souffrira sera euthanasié avec du gaz carbonique, à basse concentration (jusqu'à 10%) dans une enceinte à CO₂.

❖ Conditions d'élevage et de traitements

3.1.4. Exposition continue au BPA chez le rat

Cette étude sera basée sur un modèle d'exposition continue à des migrants d'emballage précédemment établi pour réaliser des études sur la fertilité, le développement et le comportement et donc compatible avec des études sur le métabolisme énergétique.

Un total de 20 femelles et 20 mâles âgés de 14 semaines seront mis en couple en appariant un mâle pour une femelle. L'accouplement sera contrôlé tous les matins : il sera validé par la présence d'un bouchon vaginal ou de spermatozoïdes dans un prélèvement qui sera effectué par lavage vaginal avec 50 µL de sérum physiologique. Les femelles positives seront immédiatement isolées et réparties en 2 lots (10 femelles/lot).

A partir de ce jour (Gestation Day 0), elles recevront quotidiennement la molécule d'intérêt jusqu'au sevrage. Seules les femelles prises dans les 3-4 premiers jours de la mise en couple seront retenues pour l'étude de manière à constituer des lots homogènes (Figure 5). Le composé sera mis en solution dans l'huile de maïs (0,4 mL/kg PC/j) et déposé dans la bouche à l'aide d'une micropipette.

Parmi ces deux lots, un lot sera exposé au BPA. Le lot témoin sera gavé avec l'huile seule (témoin négatif).

A la mise bas, les portées seront pesées, sexées et alignées en 10 animaux par portées : 5 mâles et 5 femelles dans la mesure du possible. Le cas échéant, des adoptions croisées le jour de la naissance seront réalisées au sein d'un même lot.

Au sevrage, les mères seront sacrifiées et les jeunes rats seront identifiés par une puce électronique introduite sous la peau au niveau dorsal ou une bague avec un numéro d'identification. Les rats sevrés seront exposés *per os* jusqu'à l'âge adulte avec le même produit [12 rats/sexe/groupe (1 mâle et une femelle par portée pour chaque groupe)], ils seront sacrifiés vers à l'âge adulte.

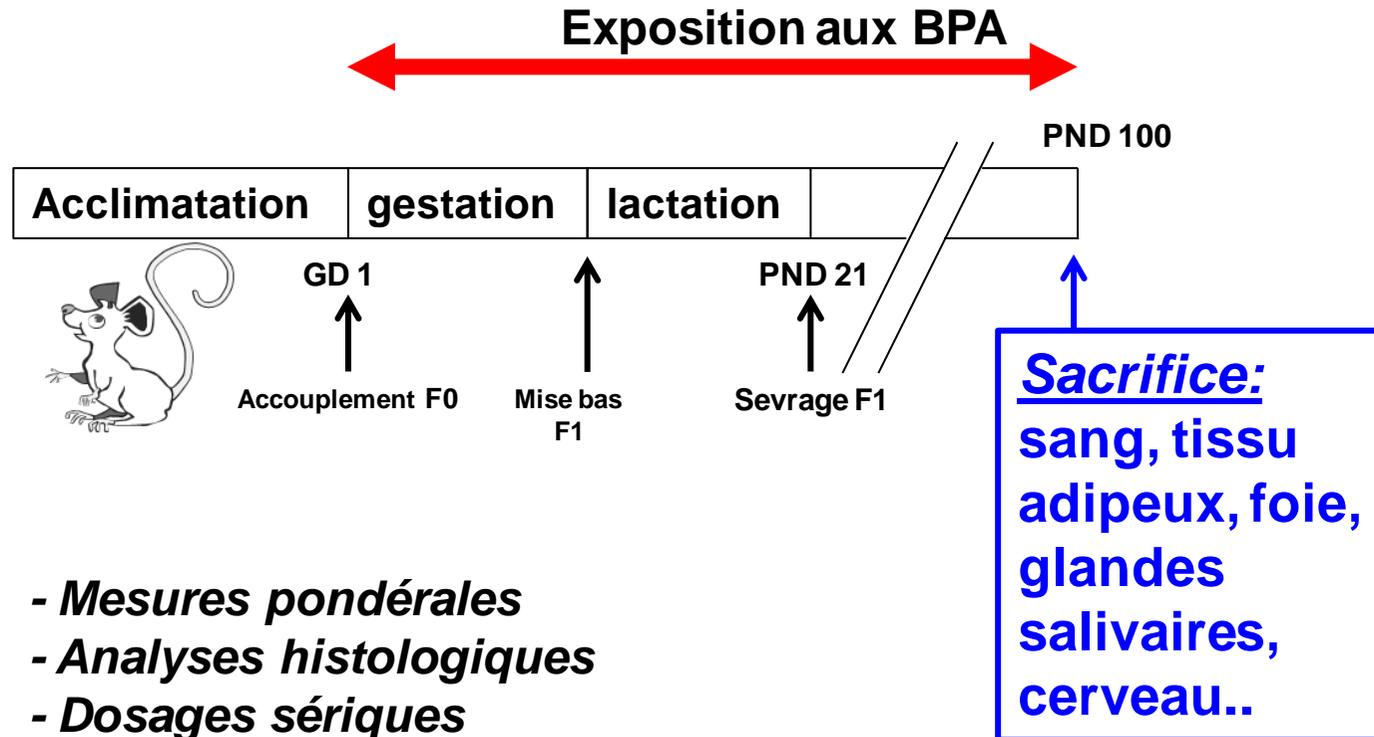


Figure 5 : Protocole d'exposition continue (conception-âge adulte) de rats au BPA. GD : (gestational day), PND : (post natal day)

A l'âge adulte, le gavage sera arrêté à PND 100 pour les deux lots.

Etudes de développement

3.1.5. Gestation et développement prénatal

Les mères seront observées quotidiennement pour déceler toute trace de comportement anormal ou tout signe de toxicité dès le début de la gestation jusqu'au sevrage : des pesées bihebdomadaires de la nourriture et de l'eau consommée et des pesées hebdomadaires des animaux permettent de s'assurer de l'état de santé. Une modification brutale de la courbe de poids au cours des deux derniers tiers de la gestation sera considérée comme symptomatique d'un avortement spontané. Pour chaque femelle, le moment de la mise bas dans la journée (matin ou après-midi) sera noté pour calculer précisément la durée de la gestation, tout avortement sera enregistré.

Au sevrage, les mères seront sacrifiées et l'examen de l'utérus permettra de compter les boutons embryonnaires (ensemble de cellules qui est l'origine de tous les tissus de fœtus). Le nombre de boutons embryonnaire - le nombre total des ratons nés (vivants et morts) permettra de compter les pertes post-implantatoires.

3.1.6. Naissances et caractérisation de la portée

A la naissance, la portée sera caractérisée par le nombre d'animaux et le poids global tout animaux confondus, puis les animaux seront pesés et sexés.

Le sexe ratio sera défini par le rapport du nombre total de mâles sur le nombre total de rats mâles et femelles au sein d'un même lot, toutes portées confondues. Ce rapport est très stable sur une population sauvage et sa valeur normale est généralement de 102 à 108 mâles pour 100 femelles ([Hood 2005](#)), soit 50,4 à 51,9% de mâles nouveau-nés. Une diminution de ce rapport traduit une influence œstrogénique pendant la gestation. Tous les ratons seront examinés afin d'enregistrer des éventuelles malformations.

3.1.7. Croissance et prise alimentaire

Tous les animaux seront quotidiennement observés dès la naissance pour déceler toutes malformations. Durant toute l'expérimentation, le poids corporel sera mesuré une fois par semaine pour suivre la croissance des animaux. La consommation de nourriture et celle d'eau seront mesurées deux fois par semaine. Le contrôle journalier des animaux permettra de détecter toute anomalie du comportement et tout signe de toxicité ou de pathologies.

A partir du sevrage, la croissance des animaux sera suivie par pesées individuelles une fois par semaine jusqu'au sacrifice. Le comportement alimentaire des animaux est également sera suivi par mesure bihebdomadaire de la nourriture et de la consommation d'eau. Tout comme pour les mères, les animaux seront observés lors des soins pour déceler tout symptôme susceptible d'indiquer un état pathologique ou des troubles du comportement propres aux migrants d'emballage (apathie, anxiété, agressivité ou hyperactivité). Une attention particulière sera portée à la santé buccale (croissance des dents) qui conditionne pour partie la prise alimentaire.

3.1.8. Distance ano-génitale

C'est la distance entre l'anus et la base de la papille génitale (pénis ou vagin) ; elle est considérée comme une méthode non invasive pour déterminer le degré d'exposition aux migrants d'emballage de type androgéniques durant la période néonatale. Elle sera mesurée au sevrage (J21) selon la méthode précédemment décrite par Boudalia et al ([Boudalia et al 2014](#)). Les rats seront maintenus immobiles dans un cylindre de rétention (Figure 6), puis des photos seront prises avec un appareil photo numérique. La distance est déterminée à partir des photos traitées grâce au logiciel de traitement d'image Visilog 6.9 (Noesis, Crolles, France), qui prend en compte le diamètre du cylindre comme mesure de référence (5 cm).

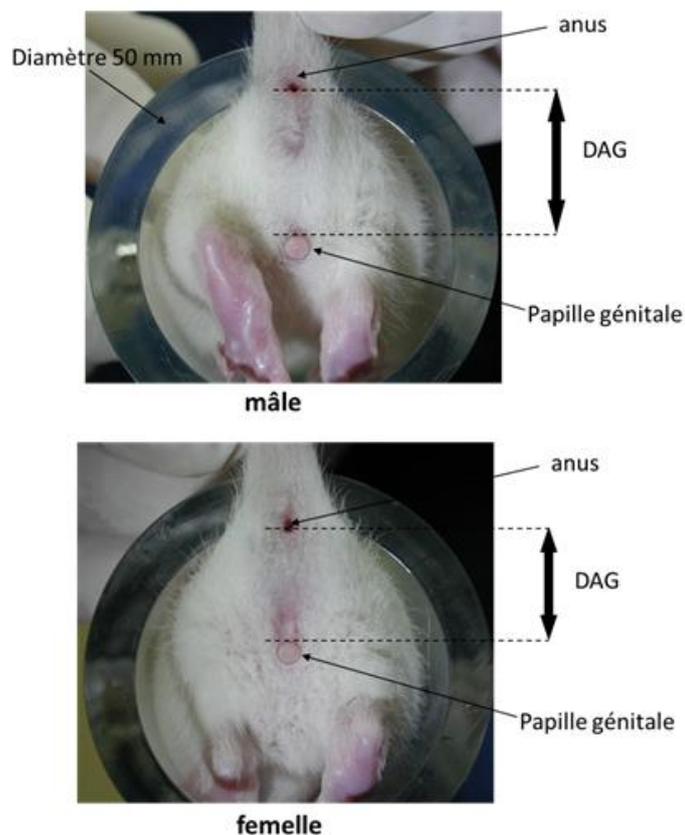


Figure 6 : Dispositif de mesure de la distance ano-génitale

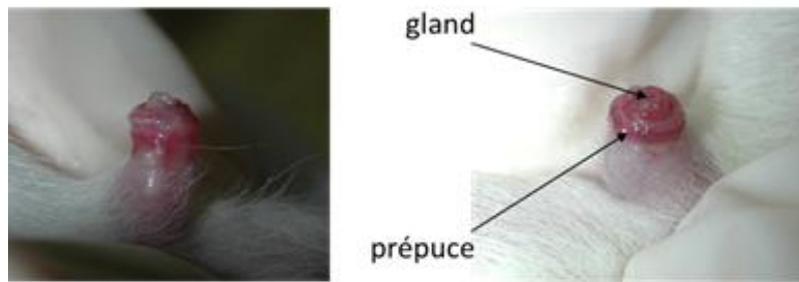
Elle est étroitement liée au développement pondéral de l'animal. C'est pourquoi les résultats seront généralement exprimés en valeurs relatives par rapport au poids du corps. Cependant, il existe un dimorphisme sexuel : chez les rats mâles, l'AGD est de 0,26 mm/g de poids corporel tandis que chez la femelle l'AGD est seulement de 0,13 mm/g de PC.

Selon l'étude de Gallavan, normaliser l'AGD en divisant par le poids du corps ne suffit pas à compenser les différences de poids entre animaux, alors que si on exprime l'AGD par rapport à la racine cubique du poids du corps, on obtient une valeur constante de 2,8 chez les mâles et de 1,8 chez les femelles. Nous calculerons donc l'AGD index (AnoGenital Index), qui est le rapport AGD/Poids corporel ^{1/3} ([Gallavan et al 1999](#)).

3.1.9. Apparition de la puberté

Elle reflète l'apparition des caractères sexuels sous l'effet des œstrogènes et androgènes, elle est déterminée à partir de J23 sur la base de :

- *La séparation du prépuce chez les mâles* : à un stade immature (jusqu'à l'âge de J25 environ) le pénis a une forme en V. A l'apparition de la puberté, vers l'âge de J25-J30, il passe par un stade intermédiaire, et son extrémité prend la forme d'un W lorsque le rat atteint l'âge adulte (au-delà de J80), c'est-à-dire quand il est finalement mûre, la forme du pénis s'apparente à un U (Figure 7).
- *L'ouverture vaginale chez les femelles* : celle-ci apparaît entre J33 et J42 et correspond à la disparition de la membrane vaginale (ouverture vaginale), elle est le signe précurseur de la puberté. Les cycles apparaissent environ une semaine après l'ouverture vaginale (Figure 8).



Début de la séparation



Séparation presque accomplie



Séparation totale du prépuce

Figure 7 : Détermination du stade de séparation du prépuce chez le rat

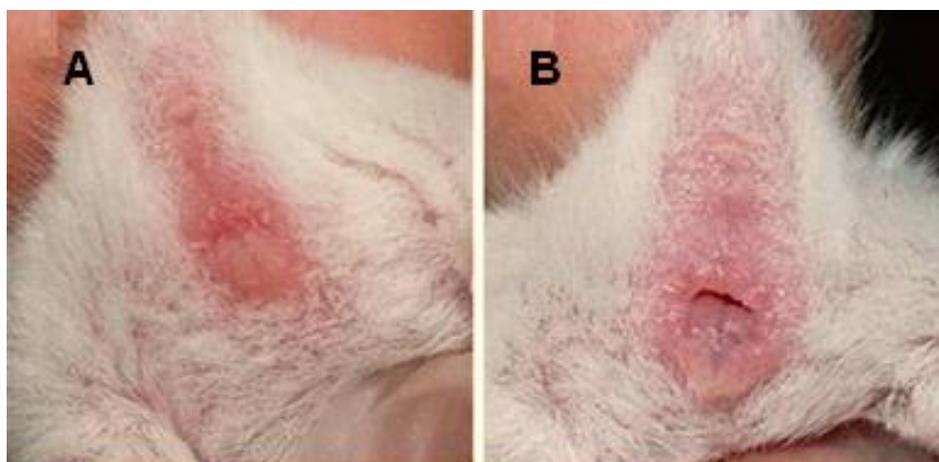


Figure 8 : Détermination du stade de l'ouverture vaginale chez la ratte femelle au stade pré-pubertaire (A), apparition de la puberté (B) (Nah et al 2011)

3.1.10. Durée des cycles œstrals

Chez le rat, la durée du cycle est de 4 jours. Elle peut augmenter sous l'effet des œstrogènes. L'aspect des frottis vaginaux varie au cours du cycle, le pourcentage de cellules vaginales cornifiées étant maximal au moment de l'ovulation, les frottis vaginaux seront réalisés chaque matin durant deux semaines pour évaluer l'impact sur les différentes étapes des cycles et sur la durée totale des cycles.

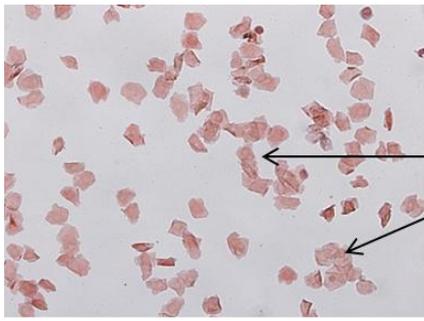
Frottis vaginaux : Le cycle œstral de la ratte comporte 4 phases classiques de durée bien définies : le proestrus [constitué de deux phases : early proestrus d'une durée de 55-57 heures et late proestrus 12-14 heures], est suivi de 25-27 heures d'œstrus au cours desquelles la rate accepte le mâle pour accouplement.

En cas de non fécondation, suivent le Métoestrus (6 à 10 heures) et le Dioestrus (6 heures), au cours de ces différentes phases, l'utérus et le vagin présentent des modifications cellulaires, dont une hypertrophie marquée au moment de l'œstrus. Au niveau du vagin, ces modifications se traduisent par une kératinisation de l'épithélium vaginal qui est visible sur le frottis (Figure 9).

Réalisation du frottis : Les lames seront soigneusement lavées à l'alcool puis séchées et numérotées (n° de lame correspondant au n° de l'animal). L'extrémité d'un coton tige sera humidifiée dans du sérum physiologique puis introduit doucement dans le vagin en le tournant lentement, tout en maintenant bien l'animal immobile contre soi. Le prélèvement sera ensuite étalé sur la lame sans trop appuyer sur le coton tige et séché à l'air libre.

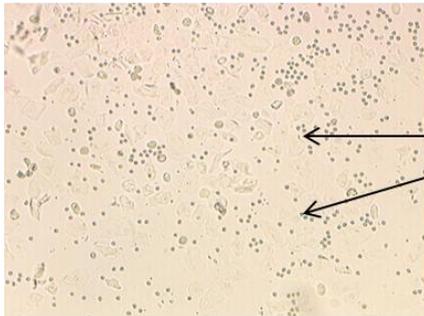
Les lames séchées seront déshydratées quelques secondes dans deux bains d'éthanol à 70% et 50% puis un bain d'eau distillée, les lames seront plongées dans un bain d'hématoxyline stabilisée durant 3 minutes. Après deux rinçages à l'eau distillée et deux minutes de révélation des noyaux au liquide bleuissant, les lames seront déshydratées par bains successifs d'eau distillée et d'éthanol à 70% et 95% respectivement. Après 3 minutes de bain de colorant de Shorr, les lames seront fixées par deux bains successifs d'éthanol à 100%. Les coupes colorées seront ensuite montées entre lame et lamelle et observées avec un microscope.

Interprétation : la chromatine des noyaux cellulaires sera colorée en bleu violet ou noir. Le cytoplasme des cellules malpighiennes éosinophiles sera rose orange, les cellules cynophiles apparaîtront en vert foncé et les cellules orangéophiles en orangé très brillant. Les leucocytes présents dans le frottis se caractérisent par un noyau bleu foncé et un cytoplasme bleu très clair. Le stade de chaque phase du cycle (La phase Dioestrus n'est pas colorée).



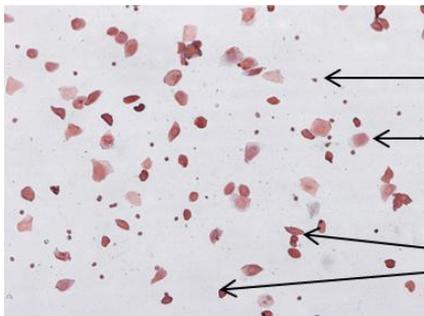
Oestrus

Cellules cornifiées
anucléées en amas



Dioestrus

Leucocytes

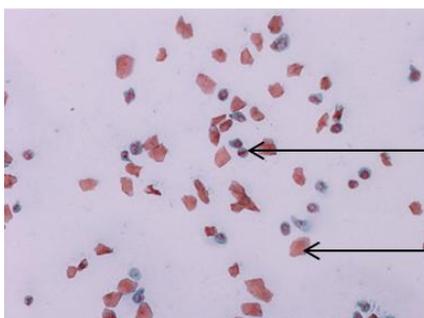


Early pro-oestrus

Cellules polynucléaires

Cellules cornifiées

Cellules épithéliales
nucléées et rondes



Late pro-oestrus

Cellules épithéliales
nucléées et rondes

Cellules cornifiées

Figure 9 : Interprétation des frottis chez la ratte

3.1.11. Sacrifice et prélèvements

3.1.11.1. Recueil de données avant le sacrifice

Au stade adulte, les animaux seront mis à jeûn la veille du sacrifice. Au matin les rats seront pesés, puis la glycémie sera mesurée grâce à un glucomètre (Accu-check) par ponction d'une goutte de sang à l'extrémité de la queue.

Test de tolérance au glucose : Il permettra de détecter la capacité de normaliser rapidement l'épisode hyper-glycémique induit par un bolus de glucose. Cette capacité dépend de l'intégrité d'une réponse métabolique qui inclut d'une part la sécrétion d'insuline en réponse au glucose par les cellules β pancréatiques, et d'autre part l'action hypoglycémiante de l'insuline dans le foie et les organes périphériques.

Une injection intra péritonéale de glucose (1 g/kg) sera réalisée (rats à jeun depuis 12h) le matin. La glycémie sera mesurée à l'aide d'un glucomètre par ponction d'une goutte de sang au bout de la queue (Accu-Check) à différents temps pour établir une cinétique: -30 min, 0 min, 30 min, 60 min, 120 min. Les résultats seront exprimés en (mg/dl) dans le sang.

Mesure de la masse grasse : La mesure de la masse grasse sera réalisée avec un Impédance-mètre. C'est un appareil utilisé pour déterminer la composition corporelle en masse grasse et maigre, grâce un courant alternatif de faible tension appliqué par des électrodes sous la peau, ces électrodes sont reliées à l'appareil de mesure qui analysera les données à l'aide d'un logiciel de modélisation ([Smith et al 2009](#)).

L'animal sera anesthésié à l'isoflurane (AErrane[®], Baxter SA, Marepas, France) à 2,5% (v/v) dans l'oxygène, puis placé à plat sur l'abdomen sur une planche, les membres supérieurs et inférieurs à côté du corps, et la queue en prolongement vers le bas ; quatre électrodes seront placées sous la peau selon un axe antéro-postérieur (2 électrodes au niveau supérieur, 2 électrodes au niveau inférieur) (Figure 10).

Expression des résultats : L'impédance électrique mesurée sera rapportée à la masse du sujet (poids du corps le jour du sacrifice) et à sa taille (de la base de la tête au bout de la queue).

Le résultat sera calibré en fonction de l'âge et du sexe, pour donner, en pourcentage, la proportion de graisse dans l'organisme.



Figure 10 : Dispositif de mesure de la masse grasse

3.1.11.2. Modalités des sacrifices et prélèvements sanguins

Les rats anesthésiés à l'isoflurane (AErrane®, Baxter SA, Marepas, France) à 2,5% (v/v) dans l'oxygène seront euthanasiés par exsanguination. Le sang sera prélevé par ponction à l'aorte abdominale et recueilli dans des tubes héparinés, le sérum sera obtenu par centrifugation (9000 g, 10 min). Il sera aliquoté par fraction de 500 μ L dans des tubes Eppendorfs et puis stocké à -20°C pour les dosages sériques.

3.1.11.3. Prélèvements d'organes et conditions de stockages

- Le tissu adipeux blanc (péri-gonadique, périrénal, viscéral, sous-cutané) sera prélevé, pesé, et puis conditionné pour les analyses : un échantillon du tissu périgonadique sera immédiatement conservé dans une solution tamponnée de formaldéhyde 4% (Labonord, Templemars, France) pour l'analyse histologique (étude morpho-métrique de tissu adipeux blanc).
- Le foie, le cerveau seront également prélevés, pesés et immédiatement congelés à -80°C pour des analyses histologiques et/ou moléculaires ultérieures.

3.2. Analyse histologique et biochimique des organes

Etude du tissu adipeux

3.2.1. Analyse histologique (coloration à l'Hemalun/Eosine)

Les échantillons du tissu adipeux périgonadique préalablement inclus dans de la paraffine seront découpés au microtome (5 μm d'épaisseur) selon un axe antéro-postérieur, et coloré à l'Hemalun/Eosine.

- **Principe de coloration** : elle est basée sur une coloration nucléaire des substances basophiles par l'hématoxyline, et une coloration cytoplasmique (rose) par l'éosine (colorant acide). Cette coloration permet d'avoir une vue général et globale du tissu adipeux blanc péri-gonadique. Elle permet également de conclure si les cellules sont en hyperplasie et/ou hypertrophie par mesure de diamètre (μm) et d'aire (μm^2) (Figure 11).

Pour cela les lames seront observées sous microscope au grossissement $\times 10$ et des images seront prises avec une caméra. Différents paramètres morphométriques seront mesurés : l'aire de l'adipocyte, la surface, le volume et la densité.

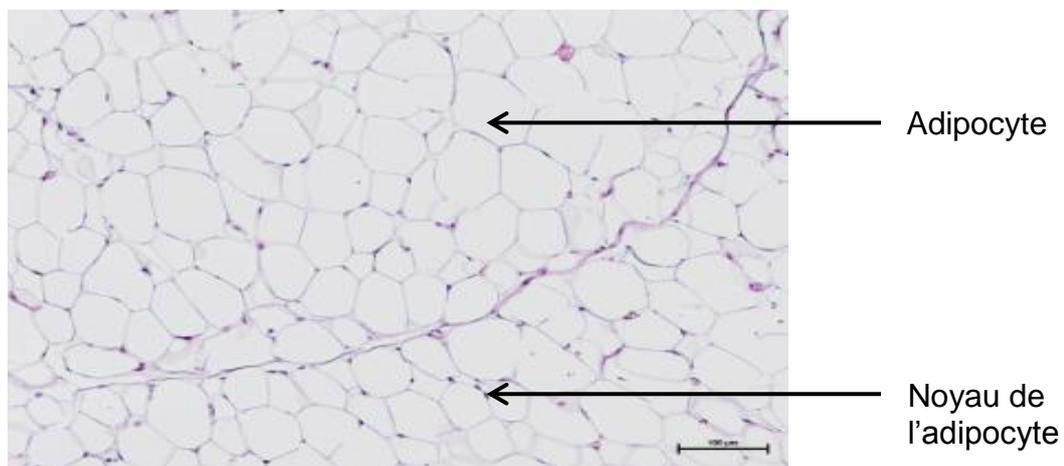


Figure 11 : Coupe histologique de tissu adipeux péri-gonadique (grossissement $\times 20$ -Coloration Hemalun/Eosine)

Pour chaque échantillon, 5-7 coupes seront réalisées, et pour chaque coupe 8-15 photos seront prises. Le diamètre (r), l'aire et le volume des adipocytes seront calculés à partir de 10 mesures d'adipocytes prises au hasard pour chaque photo.

Le volume sera calculé en utilisant la formule $\frac{4}{3}r^3$ [r : rayon ou le diamètre de l'adipocyte (Penza et al 2006)], tandis que la densité sera calculée à partir du nombre des adipocytes par champ (10 non chevauchant), et les résultats seront exprimés en nombre d'adipocyte/ μm^2 .

Les résultats seront exprimés en μm pour le diamètre de l'adipocyte, en μm^2 pour l'aire de l'adipocyte, en μm^3 pour le volume de l'adipocyte et en nombre d'adipocytes/ mm^2 pour la densité adipocytaire.

3.3. Dosage biochimiques

3.3.1. Dosage de leptine

La leptine est une cytokine principalement synthétisée par le tissu adipeux, mais aussi le placenta (pas dans toutes les espèces) ([Hassink et al 1997](#)) ([Laivuori et al 2006](#)), la glande mammaire ([Smith-Kirwin et al 1998](#)), et d'autres tissus comme la glande salivaire et l'épithélium lingual ([De Matteis et al 2002](#)). Elle est impliquée dans le contrôle de la réserve adipeuse et de la satiété, mais également elle peut affecter les préférences gustatives telles qu'une modulation de la préférence au sucré ([Kawai et al 2000](#)). Elle agit également sur le système limbique qui régule la motivation, et les circuits de récompense de la prise alimentaire. La leptine peut aussi affecter des fonctions neuroendocriniennes au niveau cérébral, qui se traduisent par des effets au niveau périphérique sur la sécrétion des hormones de reproduction et des hormones thyroïdiennes ([Mantzoros et al 2011](#)). Elle agit aussi sur le métabolisme lipidique et glucidique, et sur le système gastro-intestinal ([Vatier et al 2010](#)).

La leptine sérique sera dosée par spectrophotométrie à l'aide du kit ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay). Une quantité de 20-80 μL de sérum sera ajoutée aux puits de la microplaque qui seront déjà tapissés avec un anticorps de capture capable de lier spécifiquement l'antigène recherché selon les instructions du fabricant (Mediagnost, Allemagne). La concentration de leptine sera mesurée par spectrophotométrie ($\lambda = 450 \text{ nm}$, filtre de référence $\geq 590 \text{ nm}$). Les résultats seront exprimés en (pg/mL).

3.3.2. Dosage des marqueurs métaboliques

Le cholestérol, Cholestérol-HDL (high-density lipoprotein), Cholestérol-LDL (low-density lipoprotein), Glu PAP seront mesurés à l'aide d'un analyseur biochimique. Une petite quantité de sérum (2,4-3 μL) est nécessaire pour chaque type de dosage qui est basé sur une méthode spectrophotométrique. Les résultats seront exprimés en (mmol/L).

3.4. Analyses statistiques des données

Dans toutes les analyses statistiques des études *in vivo*, la portée sera considérée comme l'unité de base (donnée expérimentale). Autrement dit, chacune des données analysées se référera à une portée N, qu'il s'agisse de la moyenne des valeurs obtenues pour chaque animal d'une même portée, ou de la valeur obtenue pour un animal pris au hasard dans chaque portée (les données des femelles non prises seront éliminées lors des tests statistiques).

Les résultats seront exprimés sous forme des moyennes \pm SEM (*Standard Error Mean*).

Suivi de la gestation et de la lactation : Le poids corporel, consommation de nourriture et prise d'eau pour les mères et la descendance seront analysés au moyen de modèles mixtes pour prendre en compte la nature des données : mesures répétées. Dans toutes les analyses, la partie aléatoire du modèle inclut au moins un effet portée (ou mère) aléatoire pour tenir compte de la variabilité liée à la portée (respectivement la mère par ex). La partie fixe du modèle comprend les effets des facteurs « groupe de traitement » et « jour d'observation », ainsi que l'interaction groupe x jour. D'autres effets aléatoires seront envisagés ([Pinheiro et al 2012](#)).

La durée de gestation, le nombre de nouveau-nés par portée, le nombre d'implantation embryonnaire, les pertes post implantatoires, le cannibalisme (%) et le sex-ratio feront l'objet d'une analyse de variance (ANOVA) suivi d'une comparaison des moyennes (test de Dunnet) quand les conditions de normalité et d'homogénéité des variances sont respectées, et le cas échéant d'une analyse de variance non paramétrique (Kruskal-Wallis) suivi du test de Mann-Whitney. L'effet sera considéré significatif pour des valeurs de $p < 0,05$.

Données d'observations et de mesures du sevrage à l'âge adulte (F1): Les données de croissance et développement relevées du sevrage à l'âge adulte, de même que toutes les données relatives aux analyses d'échantillons biologiques seront exprimées en valeur moyenne \pm SEM pour chaque groupe ; elles seront analysées indépendamment pour chaque sexe (un animal par portée/sexe). Lorsque les données prennent en compte plusieurs individus par portées (distance ano-génitale, ouverture vaginale), les analyses statistiques seront établies sur la moyenne \pm SEM de la valeur moyenne obtenue au sein de chaque portée (l'unité = portée).

L'index de la distance ano-génitale (AGD), et l'apparition de la puberté seront analysés séparément pour les mâles et les femelles sur la base d'une analyse de variance (Anova) suivie d'une comparaison des moyennes (test post-hoc : dunnet ou newman Keuls) quand les conditions de normalité et d'homogénéité des variances seront respectées, ou par une Anova non paramétrique de Kruskal-Wallis suivi du test de Mann-Whitney le cas échéant. Il en est de même

pour l'analyse des données morphométriques (tissu adipeux, glandes salivaires), l'impédance-métrie ainsi que les données issues des analyses biochimiques (dosages sériques).

Les analyses de variances (Anova) et les comparaisons de moyennes (Dunnett, Mann-Whitney etc) seront été réalisées à l'aide du logiciel Minitab [version 16]. Le logiciel R sera utilisé pour les analyses au moyen d'un modèle linéaire mixte (nlme, Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R package version 3.1-103).

4. Résultats attendus

Malheureusement pour des raisons techniques, on n'a pas pu mettre en place une expérimentation animale.

Cependant les résultats de cette expérimentation devraient nous permettre d'évaluer l'impact de contaminants alimentaires hormonaux sur l'adipogenèse. En tout premier lieu, ils identifieront les effets d'un migrant d'emballage œstrogénomimétique sur la différenciation adipocytaire, et sur la synthèse de leptine.

En second lieu, ils permettront peut-être de corréler un effet sur les préférences gustatives avec un effet sur le tissu adipeux, en particulier sur la synthèse de leptine.

Dans le même sens, et d'après la littérature une exposition aux migrants d'emballage peut altérer l'homéostasie glucidique, en agissant sur les taux sériques de leptine ([Alonso-Magdalena et al 2010](#)) ([Wei et al 2011](#)). Ces résultats sont également en accord avec des études épidémiologiques, où des corrélations entre les concentrations de BPA dans des fluides biologiques avec l'augmentation de poids corporel ont été enregistrées ([Carwile & Michels 2011](#)).

Néanmoins, le suivi de l'évolution de poids corporel et la détermination de la masse grasse permettront de vérifier l'hypothèse de «programmation fœtale» : qui suggère qu'une exposition périnatale puisse être à l'origine des problèmes de santé à l'âge adulte en lien avec l'influence périnatale des migrants d'emballage sur la différenciation et le développement de la masse grasse ([Heindel 2003](#)).

Aussi, plusieurs études montrent une augmentation significative du poids corporel corrélée à une augmentation de la masse adipeuse suite à des expositions aux migrants d'emballage ([Lassiter & Brimijoin 2008](#)) ([Miyawaki et al 2007](#)) ([Newbold 1995](#)) ([Penza et al 2006](#)) ([Rubin et al 2001](#)) ([Somm et al 2009](#)).

En conclusion, et malgré que la réalisation de ce projet n'était pas possible par manque de moyens, l'accomplissement de ce protocole expérimental va nous permettre d'étudier les effets d'une exposition continue à un migrant d'emballage sur le développement du poids corporel, et puis faire le lien entre l'évolution du poids corporel avec le développement de la masse adipeuse. Et aussi chercher des corrélations entre le bilan sérique et l'activité endocrine ainsi que la différenciation de l'adipocyte.

Références bibliographiques

- Alonso-Magdalena P, Vieira E, Soriano S, Menes L, Burks D, et al. 2010. Bisphenol A exposure during pregnancy disrupts glucose homeostasis in mothers and adult male offspring. *Environ Health Perspect* 118: 1243-50
- Anway MD, Cupp AS, Uzumcu M, Skinner MK. 2005. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science* 308: 1466-9
- Arnich N, Canivenc-Lavier MC, Kolf-Clauw M, Coffigny H, Cravedi JP, et al. 2011. Conclusions of the French Food Safety Agency on the toxicity of bisphenol A. *International journal of hygiene and environmental health* 214: 271-5
- Batista TM, Alonso-Magdalena P, Vieira E, Amaral ME, Cederroth CR, et al. 2012. Short-term treatment with bisphenol-A leads to metabolic abnormalities in adult male mice. *PloS one* 7: e33814
- Bonefeld-Jorgensen EC, Long M, Hofmeister MV, Vinggaard AM. 2007. Endocrine-disrupting potential of bisphenol A, bisphenol A dimethacrylate, 4-n-nonylphenol, and 4-n-octylphenol in vitro: new data and a brief review. *Environ Health Perspect* 115 Suppl 1: 69-76
- Boudalia S, Berges R, Chabanet C, Folia M, Decocq L, et al. 2014. A multi-generational study on low-dose BPA exposure in Wistar rats: effects on maternal behavior, flavor intake and development. *Neurotoxicology and teratology* 41: 16-26
- Boudalia S, Decocq L, Berges R, Canivenc-Lavier MC. 2011. Developmental exposure to low-dose of bisphenol A alters maternal behaviour in rats. *Toxicology Letters*. 205S: S180-S300.
- Bourguignon JP, Rasier G, Lebrethon MC, Gerard A, Naveau E, Parent AS. 2010. Neuroendocrine disruption of pubertal timing and interactions between homeostasis of reproduction and energy balance. *Mol Cell Endocrinol* 324: 110-20
- Braniste V, Jouault A, Gaultier E, Polizzi A, Buisson-Brenac C, et al. 2010. Impact of oral bisphenol A at reference doses on intestinal barrier function and sex differences after perinatal exposure in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 448-53
- Cabaton NJ, Wadia PR, Rubin BS, Zalko D, Schaeberle CM, et al. 2011. Perinatal exposure to environmentally relevant levels of bisphenol A decreases fertility and fecundity in CD-1 mice. *Environ Health Perspect* 119: 547-52
- Carwile JL, Michels KB. 2011. Urinary bisphenol A and obesity: NHANES 2003-2006. *Environmental research* 111: 825-30

- Chitra KC, Latchoumycandane C, Mathur PP. 2003. Induction of oxidative stress by bisphenol A in the epididymal sperm of rats. *Toxicology* 185: 119-27
- De Matteis R, Puxeddu R, Riva A, Cinti S. 2002. Intralobular ducts of human major salivary glands contain leptin and its receptor. *J Anat* 201: 363-70
- Della Seta D, Minder I, Dessi-Fulgheri F, Farabollini F. 2005. Bisphenol-A exposure during pregnancy and lactation affects maternal behavior in rats. *Brain research bulletin* 65: 255-60
- EFSA. 2014. Draft Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs.
- Endrizzi A, Karbowiak T, Debeaufort F, Chassagne D, Chagnon M-C, Voilley A. 2009. Transferts de matière au travers des emballages au contact de produits alimentaires. *Ind. Agro. Agri.:* 11-16.
- Farabollini F, Porrini S, Della Seta D, Bianchi F, Dessi-Fulgheri F. 2002. Effects of perinatal exposure to bisphenol A on sociosexual behavior of female and male rats. *Environ Health Perspect* 110 Suppl 3: 409-14
- Fenichel P, Dechaux H, Harthe C, Gal J, Ferrari P, et al. 2012. Unconjugated bisphenol A cord blood levels in boys with descended or undescended testes. *Human reproduction* 27: 983-90
- Folia M, Boudalia S, Ménétrier F, Decocq L, Pasquis B, et al. 2012. Oral homeostasis disruption by medical plasticizer component Bisphenol A in adult male rats. *The Laryngoscope*
- Furukawa T, Kurokawa J. 2007. Regulation of cardiac ion channels via non-genomic action of sex steroid hormones: implication for the gender difference in cardiac arrhythmias. *Pharmacol Ther* 115: 106-15
- Gallavan RH, Jr., Holson JF, Stump DG, Knapp JF, Reynolds VL. 1999. Interpreting the toxicologic significance of alterations in anogenital distance: potential for confounding effects of progeny body weights. *Reproductive toxicology* 13: 383-90
- Geens T, Neels H, Covaci A. 2012. Distribution of bisphenol-A, triclosan and n-nonylphenol in human adipose tissue, liver and brain. *Chemosphere* 87: 796-802
- Hassink SG, de Lancey E, Sheslow DV, Smith-Kirwin SM, O'Connor DM, et al. 1997. Placental leptin: an important new growth factor in intrauterine and neonatal development? *Pediatrics* 100: E1
- Heindel JJ. 2003. Endocrine disruptors and the obesity epidemic. *Toxicol Sci* 76: 247-9

- Herath CB, Jin W, Watanabe G, Arai K, Suzuki AK, Taya K. 2004. Adverse effects of environmental toxicants, octylphenol and bisphenol A, on male reproductive functions in pubertal rats. *Endocrine* 25: 163-72
- Hood E. 2005. Are EDCs blurring issues of gender? *Environ Health Perspect* 113: A670-7
- JORF. 2012. LOI n° 2012-1442 du 24 décembre 2012 visant à la suspension de la fabrication, de l'importation, de l'exportation et de la mise sur le marché de tout conditionnement à vocation alimentaire contenant du bisphénol A (1).
- Kalfa N, Paris F, Soyer-Gobillard MO, Daures JP, Sultan C. 2011. Prevalence of hypospadias in grandsons of women exposed to diethylstilbestrol during pregnancy: a multigenerational national cohort study. *Fertility and sterility* 95: 2574-7
- Kawai K, Sugimoto K, Nakashima K, Miura H, Ninomiya Y. 2000. Leptin as a modulator of sweet taste sensitivities in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 11044-9
- Laivuori H, Gallaher MJ, Collura L, Crombleholme WR, Markovic N, et al. 2006. Relationships between maternal plasma leptin, placental leptin mRNA and protein in normal pregnancy, pre-eclampsia and intrauterine growth restriction without pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod* 12: 551-6
- Lassiter TL, Brimijoin S. 2008. Rats gain excess weight after developmental exposure to the organophosphorothionate pesticide, chlorpyrifos. *Neurotoxicol Teratol* 30: 125-30
- Mantzoros CS, Magkos F, Brinkoetter M, Sienkiewicz E, Dardeno TA, et al. 2011. Leptin in human physiology and pathophysiology. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 301: E567-84
- Miyawaki J, Sakayama K, Kato H, Yamamoto H, Masuno H. 2007. Perinatal and postnatal exposure to bisphenol a increases adipose tissue mass and serum cholesterol level in mice. *J Atheroscler Thromb* 14: 245-52
- Mok-Lin E, Ehrlich S, Williams PL, Petrozza J, Wright DL, et al. 2010. Urinary bisphenol A concentrations and ovarian response among women undergoing IVF. *International journal of andrology* 33: 385-93
- Nah WH, Park MJ, Gye MC. 2011. Effects of early prepubertal exposure to bisphenol A on the onset of puberty, ovarian weights, and estrous cycle in female mice. *Clinical and experimental reproductive medicine* 38: 75-81
- Nakamura K, Itoh K, Dai H, Han L, Wang X, et al. 2011. Prenatal and lactational exposure to low-doses of bisphenol A alters adult mice behavior. *Brain Dev*

- Newbold R. 1995. Cellular and molecular effects of developmental exposure to diethylstilbestrol: implications for other environmental estrogens. *Environ Health Perspect* 103 Suppl 7: 83-7
- Nunez AA, Kannan K, Giesy JP, Fang J, Clemens LG. 2001. Effects of bisphenol A on energy balance and accumulation in brown adipose tissue in rats. *Chemosphere* 42: 917-22
- Palanza PL, Howdeshell KL, Parmigiani S, vom Saal FS. 2002. Exposure to a low dose of bisphenol A during fetal life or in adulthood alters maternal behavior in mice. *Environ Health Perspect* 110 Suppl 3: 415-22
- Penza M, Montani C, Romani A, Vignolini P, Pampaloni B, et al. 2006. Genistein affects adipose tissue deposition in a dose-dependent and gender-specific manner. *Endocrinology* 147: 5740-51
- Phrakonkham P, Viengchareun S, Belloir C, Lombes M, Artur Y, Canivenc-Lavier MC. 2008. Dietary xenoestrogens differentially impair 3T3-L1 preadipocyte differentiation and persistently affect leptin synthesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 110: 95-103
- Pinheiro J, Bates D, DebRoy S, Sarkar D, Team RDC. 2012. nlme. In *Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R package version 3.1-103*
- Riu A, Grimaldi M, le Maire A, Bey G, Phillips K, et al. 2011. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is a target for halogenated analogs of bisphenol A. *Environ Health Perspect* 119: 1227-32
- Ropero AB, Alonso-Magdalena P, Garcia-Garcia E, Ripoll C, Fuentes E, Nadal A. 2008. Bisphenol-A disruption of the endocrine pancreas and blood glucose homeostasis. *Int J Androl* 31: 194-200
- Rubin BS, Murray MK, Damassa DA, King JC, Soto AM. 2001. Perinatal exposure to low doses of bisphenol A affects body weight, patterns of estrous cyclicity, and plasma LH levels. *Environ Health Perspect* 109: 675-80
- Ruhlen RL, Howdeshell KL, Mao J, Taylor JA, Bronson FH, et al. 2008. Low phytoestrogen levels in feed increase fetal serum estradiol resulting in the "fetal estrogenization syndrome" and obesity in CD-1 mice. *Environ Health Perspect* 116: 322-8
- Shankar A, Teppala S. 2011. Relationship between urinary bisphenol A levels and diabetes mellitus. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 96: 3822-6
- Skinner MK, Anway MD, Savenkova MI, Gore AC, Crews D. 2008. Transgenerational epigenetic programming of the brain transcriptome and anxiety behavior. *PLoS One* 3: e3745

- Smith-Kirwin SM, O'Connor DM, De Johnston J, Lancey ED, Hassink SG, Funanage VL. 1998. Leptin expression in human mammary epithelial cells and breast milk. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 1810-3
- Smith D, Jr., Johnson M, Nagy T. 2009. Precision and accuracy of bioimpedance spectroscopy for determination of in vivo body composition in rats. *International journal of body composition research* 7: 21-26
- Somm E, Schwitzgebel VM, Toulotte A, Cederroth CR, Combescure C, et al. 2009. Perinatal exposure to bisphenol a alters early adipogenesis in the rat. *Environ Health Perspect* 117: 1549-55
- Soriano S, Alonso-Magdalena P, Garcia-Arevalo M, Novials A, Muhammed SJ, et al. 2012. Rapid insulinotropic action of low doses of bisphenol-A on mouse and human islets of Langerhans: role of estrogen receptor beta. *PloS one* 7: e31109
- Vatier C, Capeau J, Vigouroux C. 2010. [Leptin, a new therapeutic agent for treatment of diabetes?]. *Med Sci (Paris)* 26: 803-7
- Wei J, Lin Y, Li Y, Ying C, Chen J, 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: 3049-61
- Wilson N, Chuang J, Morgan M, Lordo R, Sheldon L. 2007. An observational study of the potential exposures of preschool children to pentachlorophenol, bisphenol-A, and nonylphenol at home and daycare. *Environmental Research.*: 103(1):9-20
- Xu X, Tan L, Himi T, Sadamatsu M, Tsutsumi S, et al. 2011a. Changed preference for sweet taste in adulthood induced by perinatal exposure to bisphenol A-A probable link to overweight and obesity. *Neurotoxicol Teratol*: 458-63
- Xu X, Tian D, Hong X, Chen L, Xie L. 2011b. Sex-specific influence of exposure to bisphenol-A between adolescence and young adulthood on mouse behaviors. *Neuropharmacology* 61: 565-73
- Yu C, Tai F, Song Z, Wu R, Zhang X, He F. 2011. Pubertal exposure to bisphenol A disrupts behavior in adult C57BL/6J mice. *Environ Toxicol Pharmacol* 31: 88-99
- Zalko D, Soto AM, Dolo L, Dorio C, Rathahao E, et al. 2003. Biotransformations of bisphenol A in a mammalian model: answers and new questions raised by low-dose metabolic fate studies in pregnant CD1 mice. *Environ Health Perspect* 111: 309-19