

Université MUSTAPHA Stambouli
Mascara



جامعة مصطفى أسطمبولي
معسكر

Faculté des sciences de la nature et de la vie
Département de biologie
Laboratoire de BTE-BD-PR université Ahmed Ben Bella Oran1

THESE de DOCTORAT en SCIENCES

Spécialité Biochimie Appliquée

Intitulée

Impact des phtalates sur l'absorption entérocytaire et leur biodisponibilité

Présentée par : SETTI AHMED Kheira

Le 30/09/2019

Devant le jury :

Président	BENARBA Bachir	MCA	Université de Mascara
Examineur	KROUF Djamil	Prof	Université d'Oran
Examineur	BERROUKECH	Prof	Université de Saida
Examineur	MADANI Zohra	MCA	Université de Mascara
Co-directeur	BOUCHKARA	Prof	Université de Mascara
Encadreur	KHAROUBI Omar	Prof	Université d'Oran

Année Universitaire : 2018-2019

« A coeur vaillant, rien d'impossible »
Devise de Jacques Coeur (1395 - 1456)

Remerciements

Les travaux qui font l'objet de ce mémoire de thèse ont été réalisés à la ferme expérimentale de l'université de Mascara et au Laboratoire de toxicologie et phytoremediation (université d'Oran). Le caractère pluridisciplinaire de ce travail a permis de nombreuses collaborations, que ce soit avec le Centre De Recherche et d'Analyse Cedra (dijon) ainsi que le laboratoire d'imagerie cellulaire (université de Bourgogne).

Mes premiers remerciements iront à mon directeur de thèse Kharoubi Omar sans qui je n'aurais pu mener à bien la réalisation de ce travail. Il m'a accueilli dans son équipe et procuré tous les moyens nécessaires au bon déroulement de mon projet. Je le remercie sincèrement de l'attention particulière qu'il a portée sur mon travail, de la confiance qu'il m'a accordée dès le début de cette thèse, de sa patience, de ses encouragements à faire de la recherche et à avancer malgré les obstacles.

Un remerciement particulier à M Bouchkara Mohamed pour ses corrections et son soutien.

Je tiens à remercier sincèrement les membres de mon jury : Monsieur Benarba Bachir qui m'a fait l'honneur d'accepter de présider ce jury. Mes examinateurs Krouf Djamil, Berroukech et madame Madani Zohra pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail, pour le temps consacré à la relecture de ce manuscrit

Mes sincères remerciements vont également à madame Hamou Lhadj Latifa, responsable de la ferme expérimentale. Merci d'avoir été là et de m'avoir soutenu pendant mes moments de stress et de colère. Merci pour ta joie de vivre et tes encouragements permanents, je souhaite plein de bonheur à votre famille...

Je remercie vivement toute l'équipe de l'animalerie de la ferme expérimentale qui prend soin, au quotidien, des animaux, assurant ainsi la qualité des travaux. Merci Bouslah AZIZ, merci Mankour BOUZIANE.

Mes chaleureux remerciements vont également Vers monsieur Mebani Omar pour ses encouragements et ses conseils ;

Je remercie mes amis, qui m'ont toujours soutenu, dans les moments difficiles comme dans les moments agréables Malika Taleb , Ikram.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Mr El ouissi AEK, Je le remercie énormément pour ses conseils indispensables surtout ces derniers mois.

Je ne peux que remercier ma famille de m'avoir toujours soutenue et encouragée pendant ces années d'études.

SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES.

LISTE DES TABLEAUX

ABREVIATIONS

RESUME..

AVANT-PROPOS

INTRODUCTION

Chapitre I :les phtalates

1. Description générale des principaux composés de phtalates.....	4
1.2 . Voies d'exposition :	6
1.2.1 Voie digestive.....	6
1.2. 2 .Inhalation.....	7
1.2. 3Absorption cutanée.....	7
1.2. 4Voie parentérale	7
1.2. 5 Voie transplacentaire.....	7
1.3. Métabolisme	8
1.4 Distribution.....	9
1.5 Biomarqueurs d'exposition aux phtalates	10
1.6 Exposition en population générale.	10
Tableau 3 :Concentration des principaux métabolites des phtalates dans des échantillons d'urines humains dans différents pays	11
1.7 Exposition fœtale et néonatale aux phtalates.	12
1.8 Exposition pendant la période d'allaitement aux phtalates (Italie du sud).	14
Exposition de l'enfant en bas âge aux phtalates.....	15
1.9 Exposition professionnelle	15
Doses toxiques.....	16
1.10 Mécanisme d'action des phtalates.....	16

Structure et fonction des récepteurs nucléaires	17
1.11 Effets des phtalates démontrés chez les animaux ou in vitro	20
1.11.1 Effets des phtalates sur le développement et les fonctions du testicule chez les rongeurs : études in vivo	20
1.11.2 Perturbation de la fonction thyroïdienne.....	21
1.11.3 Effets sur le foie	22
Etudes chez la femme.....	23
Système immunitaire.....	24
1.11.4 Système immunitaire.....	24
Effets épigénétiques	25

Chapitre II L'épithélium intestinal

2. Structures de l'intestin grêle.....	29
2.1 Anatomie	29
2.2 L'épithélium intestinal	30
2.2.1 Paroi	30
2.2.2 Les cryptes intestinales.....	31
2.2.3 Les villosités.....	32
1.1.2.1. Les cellules souches épithéliales intestinales	35
2.4 Programme autonome de développement de l'intestin.....	38
2.6 Perméabilité de l'épithélium intestinal.....	39
2.6.1. La voie paracellulaire	39
2.6.2 La voie transcellulaire	44
2.6.3 Maturation des complexes de jonctions serrées :	45
2.7 Méthodes d'évaluation de la perméabilité intestinale	47
Le modèle cellulaire Caco2.....	51
La.....	54

2.8 Absorption des nutriments, de l'eau, et des électrolytes	54
--	----

Matériels et méthodes

3.1. ANIMAUX.....	56
3.2 . DISSECTION.....	58
3.3 DOSAGES D'ACTIVITES ENZYMATIQUES	59
3.4 Dosage des protéines.....	61
3.5 Etude histologique.....	62
3.6 Microscopie électronique à balayage	63
3.7 Préparation des membranes de la bordure en brosse (Homogénat)	63
3.8 PROTOCOLE DU TEST LACTULOSE / MANNITOL:	65
5. TECHNIQUE DE DOSAGE:	65
3.9 Immunohistochimie.....	66
3.10 Dosage des cytokines	67
3.11 Détermination du statut oxydant/antioxydant	67

Traitement statistique des résultats

4. RESULTATS	71
4.1 Influence de l'exposition au phtalates sur l'évolution de la prise alimentaire chez les mères, le poids corporel et le poids des organes des rats.....	71
4.2 . Effet de l'exposition aux DINP, DEHP et de DEP sur le poids des rats :.....	71
4.3 Effet sur la morphologie de l'intestin : Etude histologique de la hauteur des villosités.....	75
4.4 Prolifération cellulaire.....	81
4.5 Enzymes de maturation	82
4.6 Effets des phtalates sur la teneur des protéines totales.....	85
4.7 Effet sur la perméabilité intestinale.....	86
4.8 Effet sur les jonctions serrées.....	87

4.9 Effet sur le statut oxydant.....	93
Stress oxydant	96
4.10 Effets sur les Cholesterol triglycerides HDL LDL.....	98
4.11 Effet sur la production des cytokines	99
4.12 Biodisponibilité	101
4.13 Determination de la teneur des lipides membranaires	101
5.1 Développement des rats et maturation intestinale.....	104
5.2 Perméabilité intestinale	105
5.3 Risque inflammatoire de la muqueuse intestinale.....	108
5.4 Biodisponibilité	112
5.6 Prolifération cellulaire.....	114
conclusion.....	117
Annexe.....	119
références	
bibliographie.....	122

Liste des figures

Figure 1 : Structure générale des phtalates	4
Figure 2 : Sources et voies d'exposition aux phtalates.....	8
Figure 3 : Métabolisme du DEHP	9
Figure 4: Sources possibles d'exposition au DEHP en neonatologie	12
Figure 5: structure générale des récepteurs nucléaires	17
Figure 6 : activation de la transcription par les récepteurs nucléaires	18
Figure 7 : cibles des phtalates.....	19
Figure 8 : Effets des phtalates sur le développement et les fonctions du testicule chez les rongeurs	20
Figure 09: Schéma représentant le tube digestif chez le rat. (côlon).....	29
Figure 10 : Schéma d'une coupe transversale de la paroi du tube digestif	30
Figure 11. Schéma des différentes cellules retrouvées dans l'intestin grêle.	35
Figure 12: les deux modèles de lieu de résidence des cellules souches de l'intestinales	36
Figure 13: Deux modèles du lignage cellulaire des . ripes fie cellules épithéliales intestinales	37
Figure 14 : Organisation des quatre types de cellules différenciées et des cellules souches de cryptes, le long de l'axe crypte-villosité dans l'intestin grêle.	37
Figure 15 – Développement de l'épithélium intestinal.....	38
Figure 16 : Maturation intestinale chez trois espèces (le rat, le porc et l'être humain)	39
Figure 17 : Perméabilité intestinale par la voie paracellulaire et structures associées.....	40
Figure 18 : Maturation de l'expression des claudines	41
Figure 19: Représentation schématique de l'occludine et de la claudine.	42
Figure 20: Représentation schématique de protéines JAM	43
Figure 21: Perméabilité intestinale par la voie transcellulaire	45
Figure 22 Perméabilité intestinale au Dextran 4 KDa durant les huit premières semaines de vie chez la souris	47
Figure 23 : Méthode d'analyse de la perméabilité intestinale chez l'homme.	48
Figure 24 : Montage en chambre de Ussing	51
Figure 25 : Diagramme d'une monocouche de cellules Caco-2 cultivées sur un filtre.....	52
Figure 26 : Les principales maladies entraînant une hyperperméabilité intestinale	53
Figure 27 : Alimant 2918(forme de Bouchons).....	57
Figure 28 : Protocole d'exposition de rats à différents phtalates. GD : (jour de gestation), PND : (jour postnatal).....	59
Figure 29 : principe du dosage des disaccharidases	62
Figure 30 : préparation des membranes de la bordure en brosse.....	63
Figure 31: Principe de l'immunohistochimie	66
Figure 32 : Effets des phtalates sur le poids des ratons.	72

Fig 33 : Impact des phtalates sur la longueur de l'intestin chez les ratons à différents ages	73
Figure 34 : Effets des phtalates sur le diamètre de l'intestin	76
Figure 35: Enterocytes caractérisant la partie distal des ratons entre j0 et j 14 (grossissement 10x)	77
Figure 36: Coupes histologiques des intestins de ratons au stade J0, j7 et j30 suite à l'exposition gestationnelle et lactationnelle à 380mg/Kg/pc de DEHP, DINP et DEP	78
Figure37 : Infiltration lymphocytaires.....	80
Figure38 : Effet des phtalates sur l'expression de la Ki-67 dans l'intestin des ratons suite à l'exposition gestationnelle et lactationnelle.....	81
Figure39 :Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à 380mg/Kg/pc	82
Figure 40 : Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à 380mg/Kg/pc de DEHP, DINP et DEP sur l'expressionde la lactase au niveau du A) duodénum, B) jejunum et C) ileon des rats au stade J0, J7, J15, j21 et j30	83
Figure 41 : Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à 380mg/Kg/pc de DEHP, DINP et DEP sur l'expression des activités de la maltase	84
Figure 42: Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à 380mg/Kg/pc de DEHP, DINP et DEP sur l'expression des activités de la phosphatase au niveau du duod	85
Figure 43 : Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à 380mg/Kg/pc de DEHP, DINP et DEP sur l'expression des protéines totales niveau du A) duodénum, B) jejunum et C)ileon des rats au stade J0, J7, J15, j21 et j30.	86
Figure 44 : Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à 380mg/Kg/pc de DEHP, DINP et DEP sur la perméabilité intestinale chez les rats âgés de 21 jours.	88
Figure 45: Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à 380mg/Kg/pc de DEHP, DINP et DEP sur l'expression de la claudine 3 au niveau du duod, jej et ileon des rats au stade J0, J7, J15, j21 et j30.....	89
Figure46 : (suite), Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à 380mg/Kg/pc de DEHP, DINP et DEP sur l'expression de la claudine 3 au niveau du duodénum.....	90
Figure 47 : Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à 380mg/Kg/pc de DEHP, DINP et DEP sur l'expression de occludine au niveau du duodénum	91
Figure 48: Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à 380mg/Kg/pc de DEHP	92
Fig49 : Western blot des protéines de jonctions serrées	93
Fig 50 : Effet sur le stataut oxydant	94
Fig51 : Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à 380mg/Kg/pc de DEHP, DINP et DEP sur le taux de MDA au niveau du duodénum, jejunum et ileon des rats	95
Fig52 : Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à 380mg/Kg/pc de DEHP, DINP et DEP sur l'activité de la GPx au niveau du duod, jej , ileon et serum des rats	96
Fig53 : Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à 380mg/Kg/pc de DEHP, DINP et DEP sur l'activité de la SOD au niveau du duod, jej et ileon des rats	97

Fig 54 :_Effet des phtalates sur les triglycerides, cholesterol, HDL et LDL sérique	98
Fig 55 : Taux des cytokines au niveau sérique chez les rats agés de 21 jours (témoins, traités (DEHP, DINP et DEP).....	99
Fig 56 : Effet sur la production des cytokines au niveau tissulaire (duodénum, jejunum, iléon)...	100
Fig 57 : Chromatogramme de DINP (1)DEP (2) et DEHP	102
Fig 58 : Impact des phtalates sur le poids des femelles en périodes de gestation et lactation	120
Fig 59 : Microscopie électronique d'intestin de rats témoins et traités aux phtalates.	121

Liste des tableaux

Tableau 1. Description des principaux phtalates pour usage de type commercial et industriel.....	05
Tableau 2 : Teneurs en phtalates dans les aliments (ng/g PS) et dans les eaux de boissons (ng/l).....	06
Tableau 3 : Concentration des principaux métabolites des phtalates dans des échantillons d'urines humains dans différents pays	11
Tableau 4: Matériel utilisé en néonatalogie pouvant contenir du DEHP	13
Tableau 5: Exposition de l'enfant en bas âge aux phtalates	15
Tableau 6: Valeurs toxiques de certains phtalates D'après	16
Tableau 7 : Effets sanitaire chez le nourrisson et l'enfant.....	25
Tableau 8 : Effets sanitaire chez l'adulte.....	27
Tableau 9. Expression des claudines dans l'intestin des mammifères	46
Tableau 10:	53
Tableau11 : Composition de l'aliment 2018.....	57
Tableau 12 : Effet des phtalates sur la prise alimentaires hebdomadaire (g).....	71
Tableau13 : Effet des trois phtalates sur le poids de l'intestin (Duodénum, Jéjunum et l Iléon) , le foie , le rein et le cerveau.....	47
Tableau 14 : impact des phtalates sur le volume urinaire (ml) et la masse de la matière fécale (g).....	56
Tableau15: Impact des phtalates sur le poids des femelles en périodes de gestation et lactation.....	120

Abréviations

ADN Acide DésoxyriboNucléique

BBzP benzyle butyle phtalate

DIDP Diisodecyl phthalate

BBP benzyl butyl phtalate

BPA : Bisphénol A

BrdU bromodésoxyuridine

BzBP benzyl butyl phthalate

Caco-2 human epithelial colorectal adenocarcinoma cells

CAT : CATalase

CMH complexe majeur d'histocompatibilité

Da Dalton

DEHP : di(2-éthylhexyl)phtalate

DEP diethyl phtalate

DiBP di butyl phtalate

DBP di-butyl phtalate

DCHP di-cyclohexyl phtalate

DiDP Diisodecyl phthalate

DEHP di-éthyl hexyl phtalate

DEP di-éthyl phtalate

DIBP di-isobutyl phtalate

DiNP di-isononyl phtalate

DOP di-octyl phtalate

DiPP Diisopentyl phthalate

DPP di-propyl phtalate

DM : dispositif médical

DMP diméthylphtalate

DnBP di-n-butyl-phtalate

DNOP Phtalate de di-n-octyle

DnPP Di-n-pentyl phthalate

EDTA acide éthylène-Diamine-tétra-Acétique

EGF, Epidermal growth factor

ER Estrogen Receptor

ERs : récepteurs aux oestrogènes
FSH Follicle Stimulating Hormone
GIP Gastric inhibitory polypeptide
HDL high-density lipoprotein
HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance
IL Interleukine
JAM Junctional adhesion molecule
LDL Low-density lipoprotein
LH LuteinizingHormone
MCOP Monocarboxyoctyl phthalate
MECPP Mono-(2-ethyl-5-carboxypentyl) phthalate
MEHHP mono-(2-ethyl-5-hydroxyhexyl)phthalate
MEOHP mono(2-ethyl-5-oxohexyl) phthalate
MEPP Mono(5-carboxy-2-éthylpentyl)phtalate
Mg milligramme
MLC monocarboxyoctyl phthalate
MMHP Mono[(2-carboxyméthyl)hexyl]**phtalate**
NOAEL No Observed Adverse Effect Level
OCLN Occludine
PPAR peroxisome proliferator-activated receptors
PVC : polychlorure de vinyle
PVC polychlorure de vényl
SOD Superoxyde dismutase
TBARS Thiobarbituric acid reactive substances
TGF Transforming growth factor
TJ : Tight junctions- Jonctions serrées
TNF tumor necrosis factor
ZO : Zonula Occludens

RESUME

Introduction En période néonatale, la muqueuse intestinale est immature et particulièrement perméable, notamment aux facteurs environnementaux comme les toxiques, les infections mais aussi les événements stressants. De la bonne maturation de la barrière intestinale va dépendre la mise en place de l'homéostasie intestinale

Objectifs L'objectif de ce travail a été d'évaluer les effets d'une exposition gestationnelle et lactationnelle au DEHP, DINP et DEP sur l'absorption intestinale chez le raton en période néonatale.

Matériel et méthodes L'étude expérimentale a été réalisée chez des ratons Wistar répartis en 4 groupes, un groupe témoin dont les mères reçoivent uniquement le véhicule (l'huile de maïs) à raison de 1 ml/kg/j, Pour les trois groupes traités les femelles reçoivent dans les mêmes conditions que le groupe témoin une dose de DEP (800 mg/kg/j), DEHP ou DINP (380mg/kg/j). Les animaux étaient allaités par leurs mères et pesés quotidiennement. Le sacrifice des animaux a lieu au jour 0, 7, 15, 21 et 30 postnatal. Des prélèvements d'intestin sont réalisés pour des analyses histologiques et biochimiques.

Résultats Dans un premier temps, nous avons montré une altération de la maturation de la barrière épithéliale intestinale chez le raton. Tous les phtalates testés ont réduit significativement le poids des ratons ainsi que la masse de différents organes ($p < 0.001$).

Le DINP induit une sévère atrophie villositaire, cependant le DEHP provoque des lésions lymphoepithéliales. En plus, une diminution significative de l'expression de la protéine Ki-67 était notée chez les ratons âgés de 0 à 7 jours suite au traitement par les trois phtalates ($p < 0.0001$), cependant vers le 30 jour postnatal une augmentation de l'indice mitotique Ki-67 était observée dans les groupes DEHP et DEP seulement. L'activité de la lactase et sucrase était inhibée par le DEP contrairement au DINP et DEHP qui entraînent une augmentation de l'activité enzymatique ($p < 0.05$). Dans un deuxième temps, nous avons mis en évidence qu'une exposition *in utero* et pendant l'allaitement aux phtalates, affecte la perméabilité de l'épithélium intestinal en modifiant la synthèse des protéines de jonctions serrées.

Conclusion Ce travail a permis d'identifier l'exposition aux phtalates pendant la période néonatale comme un facteur environnemental important capable d'altérer la fonction intestinale.

Mots clé : maturation, intestin, perméabilité, jonctions serrés, phtalates, *in utero*, postnatal.

ABSTRACT

Perinatal period is characterized by an immature intestinal barrier particularly permeable to luminal antigens and highly vulnerable to environmental factors like toxins, infections or stressful events.

Objective Our aim was to evaluate the impact of in utero and postnatal exposure to diisononyl phthalate (DINP), diethylhexyl phthalate (DEHP), and diethyl phthalate (DEP) on gut absorption in a Wistar rat model during neonatal period. Pregnant females were gavaged from day 8 of gestation through postnatal day (pd) 30 with 0 (vehicle control), DEHP (380 mg/kg/d), DINP (380 mg/kg/d), or DEP (800 mg/kg/d) dissolved in corn oil. Intestinal samples have been collected at 0, 7, 14, 21, and 30 pd for histological and biochemical analysis.

Results Initially, we demonstrated a modulation of the epithelial barrier maturation in the rat pups. All tested phthalate treatments have significantly decreased the body as well as the organ's weight ($p < 0.001$). DINP exposure resulted in severe villous atrophy, while DEHP treated group was characterized by lymphoepithelial lesions. In addition, a significant decrease of the Ki-67 proliferation index was observed in the youngest rats (0 and 7 days) upon the various treatments ($p < 0.0001$), whereas at day 30, an increased numbers of Ki-67 positive cells were observed in DEHP and DEP but not DINP group. Lactase and sucrase activities were inhibited by DEP in contrast to DINP and DEHP which increased enzymes activity ($p < 0.05$). In a second step, we demonstrated that phthalates alter intestinal epithelial permeability in animals by modifying synthesis of the tight junction proteins.

Conclusion Our results suggest that exposure to phthalates during gestational and lactational phases negatively impacts the development of the small intestine.

Keywords, gut maturation, permeability, tight junction, phthalates, in utero, postnatal.

الملخص

تكون مخاطية الامعاء غير مكتملة النضج و نفوذة للعوامل الخارجية مثل السموم و البكتيريا عند الاطفال حديثي الولادة . إن التطور السليم و الجيد لهذه المخاطية يعتمد على خلق توازن . إن الهدف من هذه الدراسة هو معرفة نتائج التعرض خلال فترة الحمل و الرضاعة للفثالات على وظيفة الامتصاص المعوي لدى فئران حديثي الولادة. تم اجراء الدراسة باستعمال فئران إناث خلال فترة الحمل و الرضاعة حيث تم تعريض المجموعة الاولى منها الى دي اثيل اكسيل فثالات اما المجموعة الثانية فعرضت لدي ايزونونيل فثالات. بينما المجموعة الثالثة عولجت بدي اثيل فثالات. على عكس الفئران الشاهدة التي لم تتلق سوى زيت الذرة .

نقوم بتشريح الفئران الحديثة الولادة لكل مجموعة في أزمنة مختلفة (0، 7، 14، 21، 30 يوماً بعد الولادة).

وبعد كل عملية تشريح نزرع الامعاء بهدف اجراء تحاليل بيوكيميائية و دراسات نسيجية .

في البداية ، أظهرنا تباطؤاً في نضج الحاجز الظهاري المعوي حيث لاحظنا اولا تناقصاً في وزن الفئران وكذا وزن مختلف الاعضاء و تراجع في تركيب البروتين Ki67 يؤدي التعرض لل DEP الى تثبيط عمل انزيم اللاكتاز و السكراز على عكس ال DEHP; DINP اللذان يحفزان هذين الانزيمين .

في خطوة ثانية ، أظهرنا أن تعرض الجنين في الرحم للفثالات ، (هو ملوث يحاكي الإستروجين يستغل إلى حد كبير في الصناعة)، يؤثر على نفاذية الخلايا المعوية بسبب تغير في تصنيع البروتينات الرابطة بين الخلايا المعوية .

تبين هذه الدراسة ان التعرض لفثالات خلال فترة الحمل عامل كفيلاً بإضعاف وظيفة الأمعاء.

الكلمات المفتاحية: النضج ، الأمعاء ، النفاذية ، الوصلات الضيقة ، الفثالات ، الجنين، فترة ما بعد الولادة .

Introduction

Introduction

Alors que le plastique est omniprésent dans notre quotidien, les effets sur la santé environnementale de certains plastifiants, comme les phtalates, font l'objet de préoccupations croissantes.

Il est bien établi que la période périnatale constitue une fenêtre critique du développement, dans laquelle les facteurs environnementaux peuvent interférer de manière durable avec la santé, notamment par des mécanismes épigénétiques, possiblement sur plusieurs générations. Les femmes enceintes, leurs foetus et les nouveau-nés constituent donc des populations particulièrement vulnérables face aux expositions chimiques.

Les phtalates sont des composés chimiques dérivés de l'acide phtalique dont la production mondiale est de 3 millions de tonnes par an. Ils sont couramment utilisés depuis les années 1950, comme plastifiants pour assouplir les plastiques, principalement de type PVC. On les trouve dans les produits pour automobile, les revêtements pour les planchers et les murs, les isolants pour câbles et fils souples, le matériel médical, les médicaments, les peintures, les laques, les encres d'imprimeries, les céramiques, les emballages alimentaires, les fournitures scolaires comme les gommes.

Or les phtalates migrent dans les aliments ou les liquides dès les conditions normales d'utilisation (température ambiante), une migration exacerbée lors du chauffage (stérilisation, micro-ondes) ou dans des conditions acides (pH faible de certains légumes et fruits en conserves). L'exposition de la population humaine est attestée par des études relatant leur présence dans le plasma et l'urine. Compte tenu de leurs propriétés oestrogéniques, les phtalates sont classés comme perturbateurs endocriniens, capables de se lier aux récepteurs des oestrogènes et ainsi mimer l'activité de l'hormone endogène. De nombreuses études montrent que les phtalates peuvent perturber des fonctions endocrines normales, effets traduits chez l'animal par des anomalies de développement de l'appareil génital (atrophie testiculaire et épидидymaire, hypospadias), une réduction de fertilité (une altération de la qualité du sperme ainsi qu'une atrophie des tubes séminifères), des défauts d'ovulation, une altération du cycle oestral ou encore une activité proliférative accrue des cellules épithéliales dans les glandes endométriales ou mammaires.

La maturation du tube digestif est un phénomène qui démarre précocement durant la période foetale et qui se poursuit pendant les premiers mois de vie. Les conditions nutritionnelles et environnementales auxquelles le nouveau-né est confronté pendant les premiers mois de vie orientent le profil développemental de l'intestin. Durant cette période, le tube digestif doit acquérir la capacité à digérer les aliments et absorber les nutriments, à se défendre contre les

Introduction

bactéries pathogènes, à éliminer les toxines exogènes, et à tolérer le microbiote commensal et les aliments. En effet, l'intestin est un organe complexe doté de fonctions majeures de digestion et d'absorption sélectives. En tant que première barrière épithéliale de l'organisme, l'épithélium intestinal doit également contrôler le passage d'agents exogènes qui vont participer à la maturation du système immunitaire local présent dans l'intestin.

Si la voie orale est la principale voie de contamination aux phtalates pour l'homme, la barrière intestinale est tout naturellement la première zone exposée au contaminant. Pourtant, aucune étude ne s'est intéressée à l'impact endocrinien des phtalates dans l'intestin. Dans ce travail de thèse, le premier objectif a été de définir les bases physiologiques d'un contrôle hormonal de la perméabilité épithéliale. Ce volet fondamental était nécessaire pour ensuite aborder l'influence d'une exposition aux doses élevées sur la physiopathologie de la barrière intestinale chez le raton neonate (maturation, perméabilité et états inflammatoires), à partir d'une exposition périnatale considérée comme la période critique d'exposition aux perturbateurs endocriniens.

Chapitre I

LES PHTALATES

1. Description générale des principaux composés de phtalates

Les phtalates sont des esters de l'acide phtalique (Fig.1). Ce sont des composés industriels de plus en plus utilisés depuis 1930 (Habert., 2011). Ce sont des liquides visqueux, transparents, incolores, avec peu ou sans odeur et très peu volatiles. Hydrophobes dans les conditions normales, ils auront donc une affinité particulière pour les graisses ou les alcools lourds (Arniard., 2011). Les phtalates sont biodégradables mais peuvent persister plus longtemps dans certains milieux comme le milieu aquatique où ils vont se mélanger aux sédiments (Arniard., 2011).

Leur production mondiale est passée de 1,8 à 4,3 millions de tonnes entre 1970 et 2006. Ils sont ajoutés aux polymères pour rendre le PVC plus doux et flexible. Ils entrent dans la composition d'une large gamme de produits en PVC comme les matériaux de construction tels que les câbles, les planchers, les murs et les toits. Ils entrent dans la composition d'équipements médicaux, de tuyaux, des rideaux de douche, des films plastiques, des jouets, de l'intérieur des voitures, des vêtements, des emballages alimentaires, des capsules médicamenteuses. (Habert., 2011). Selon la longueur de leur chaîne carbonée, les phtalates peuvent être classés en deux groupes : les phtalates de bas poids moléculaire (la chaîne carbonée est constituée de 1 à 4 atomes), comprenant DMP, PEP, DBP, DIBP et les phtalates de haut poids moléculaire dont la molécule comprend plus de 5 carbones, ce groupe inclut DEHP, DOP et DINP. (Task ahead., 2008). Parmi les plus couramment utilisées, mentionnons le BBP (phtalate de benzylbutyle), le DBP (phtalate de dibutyle), le DEP (phtalate de diéthyle), le DEHP (phtalate de di-2-éthylhexyle) et le DINP (phtalate de diisononyl) (Saint-Laurent., 2004).

Certains appareillages médicaux, emballages de médicament et poches de transfusion sanguine contiennent également des doses élevées de phtalates (Hauser *et al.*, 2004; Koo and Lee., 2004; Heudorf *et al.*, 2007).

Les phtalates ont la structure générale suivante : où R est un groupement alkyl, alkenyl et aryl (Patnaik, 2009).

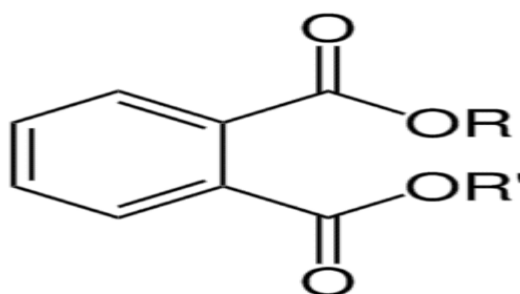


Fig 1 : Structure générale des phtalates

Les phtalates sont suspectés d'être des perturbateurs endocriniens comme certains pesticides, détergents ou plastifiants pouvant à ce titre entraîner des troubles de la reproduction, de l'immunité et du développement (Lund ., 2000).

Tableau 1. Description des principaux phtalates pour usage de type commercial et industriel (Louis Saint-Laurent et al., 2004)

Catégorie de phtalates	Abréviation	Exemples d'utilisation
Phtalate de benzylbutyle	BBP	Fragrances, fixatifs pour cheveux, adhésifs et colles, produits pour l'automobile, revêtement à plancher en vinyle
Phtalate de dibutyle	DBP	Fragrances, déodorants, fixatifs pour cheveux, vernis à ongle, encres pour imprimante, insecticides
Phtalate de diéthyle	DEP	Fragrances, déodorants, gels et mousses pour les cheveux, shampooings, savons, fixatifs pour cheveux, vernis à ongle, lotions pour le corps
Phtalate de di-2-éthylhexyle	DEHP	Fragrances, produits flexibles en PVC (rideau de douche, boyau d'arrosage, couche, contenant pour la nourriture, pellicule plastique pour la nourriture, sac pour unités de sang, cathéter, tubulure pour soluté, gants, etc.)
Phtalate de di-isononyle	DINP	Jouets pour enfants, revêtements à plancher en vinyle, gants, matériels pour l'emballage de la nourriture, pailles à breuvage, boyaux d'arrosage
Phtalate de di-cyclohexyle	DCHP	Laboratoires de recherche
Phtalate de di-n-octyle	DOP	Produits flexibles à base de plastique
Phtalate de diméthyle	DMP	Déodorants

Les phtalates ne sont pas liés chimiquement aux molécules de vinyle et restent libres, sous une forme extractible dans le matériau (Jermain ., 2012). La proportion de ces plastifiants dans les produits finis oscille entre 15 et 60% (Zimmer., 2008).

1.2 . Voies d'exposition :

Il existe trois voies d'absorption principales de ces composés chimiques : cutanée, respiratoire et digestive.

1.2.1 Voie digestive

Chez l'homme en général, l'alimentation est la voie d'exposition dominante, c'est la migration de ces substances utilisées dans la fabrication des emballages alimentaires et des différents conditionnements en cours de production et de transport qui est en cause (**Zimmer., 2008**). En effet, plusieurs études ont montré la présence de ces composés dans différents produits alimentaires comme les poissons, crustacés, oeufs et laitages (liposolubles, on trouve jusqu'à 47,8 mg/kg de butyl-benzylphtalate [BBP] dans le beurre et la margarine). Ils sont ainsi absorbés par dizaines de milligrammes chaque jour. Le lait employé pour les nouveau-nés contenait 10,2 mg/kg de phtalates, dont 0,25 mg/kg de BBP (**Bendridi1., et al 2001**).

Tableau 2 : Teneurs en phtalates dans les aliments (ng/g PS) et dans les eaux de boissons (ng/l)

Echantillon	DM	DE	DnBP	BBP	OEHP	Référence
Eau minérale	Nd-	15-81	75-185	Nd-27	46-358	Dargnat et al. 2009)
Eau de source	Nd-	24-54	85-182	Nd-10	90-132	Dargnat et al. 2009)
Eau minérale (France)	10-8-12	19-51	65-131	Nd-5	90-248	Dargnat et al. 2009)
Eau robinet (Paris)		Nd-30	40-51	Nd-3	51-59	Dargnat et al. 2009)
Terrine de poisson	nd	nd	4,82	nd	453,2	Dargnat et al. 2009
Mâche	nd	nd	31,47	nd	348,7	Dargnat et al. 2009
Radis	nd	nd	130,6	nd	138,0	Dargnat et al. 2009
Cuisse de poulet	nd	nd	126,9	nd	644,8	Dargnat et al. 2009
Riz basmati	nd	nd	9,14	0,68	156,2	Dargnat et al. 2009
Pomme Granny	17,83	23,11	35,27	Nd	169,9	Dargnat et al. 2009
Raisin noir	2,78	12,7	35,84	Nd	210,5	Dargnat et al. 2009
Salade de fruits	12,62	Nd	36,70	2,37	146,4	Dargnat et al. 2009
Huile d'olive	nd	nd	96-490	Nd-1730	Nd-4700	(Cavaliere et al. 20082008)
Jambon	1,1		260	17	3 300	(Peters. , 2006)
Fromage de brebis			780	25	890	(Peters. , 2006)
Huile d'olive				340	24 000	(Peters., 2006)
Poulet	4,9	24	760	11	670	(Peters., 2006)
Fromage de vache		Nd-7	Nd-300	Nd-39	41-1230	Wormuthetal.2006
Légumes verts		Nd-6,7	Nd-30		Nd-140	Wormuthetal.2006
Poisson	Nd-	Nd-8,5	5-380	Nd-5	2,3-290	Wormuthetal.2006

1.2. 2 .Inhalation

L'exposition aux phtalates par l'air intérieur est la deuxième source de contamination par ces substances (Zimmer., 2008). La concentration de phtalates est estimée à 77ng par m³ d'air ambiant pour le DEHP, 220 ng.m⁻³ pour le DnBP et 590 ng.m⁻³ pour le DEP. (Rudel et al., 2003), ce qui est largement supérieur à la limite de 0,42 ug par m³ au-dessus de laquelle on considère qu'il y a un danger d'effet cancérigène. Au Royaume-Uni, on a trouvé en moyenne 0,43 mg de phtalates par gramme de poussière (Greenpeace., 2003).

Lors d'une étude de 2011 réalisée en Allemagne, les auteurs ont mesuré 11 phtalates: (DMP), (DEP), (DnBP), (DiBP), (DnPP), (DiPP), (DcHP), (BzBP), (DEHP), (DiNP), (DiDP) dans l'air et les poussières des crèches, et leurs métabolites chez les enfants les fréquentant.

La plupart des phtalates recherchés ont été détectés dans l'air et la poussière déposée, DEHP et DiNP sont en concentrations très variables et représentent respectivement 70 et 24 % des concentrations totales en phtalates.

Les écoles ont fait l'objet de plusieurs études européennes récentes qui ont confirmé la présence de phtalates dans l'air intérieur des classes. Les phtalates les plus volatils, comme le DBP et le DEP, sont présents à des concentrations plus élevées dans l'air que des phtalates moins volatils, comme le DEHP ou le BBP qui sont plus abondants dans les poussières.

1.2. 3 Absorption cutanée

L'exposition des consommateurs n'est notable que si les concentrations des phtalates dans les articles manipulés sont élevées et si les temps de contact sont prolongés. Concernant le DEHP, le passage percutané est estimé à 5 % de la dose appliquée (Kavlock *et al.*, 2002d dargnat). Chez l'homme, quelques heures seulement après l'application d'une crème sur le corps entier de 26 volontaires sains, les métabolites de phtalates (MEP et MBP en l'occurrence) sont retrouvés dans leur plasma (Janjua NR et al., 2007).

1.2. 4 Voie parentérale

La voie parentérale à partir de dispositifs médicaux qui en contiennent constitue une autre source d'exposition à ces toxiques notamment le DEHP (ATSDR 2002., Green et al., Weure et al., 2006), elle correspond à une partie minime de la population (Persan., 2010).

1.2. 5 Voie transplacentaire

Les phtalates et /ou leur métabolites ont été détectés dans la salive et les urines des enfants et des adultes (Silva et al., 2004a, 2005), mais les concentrations mesurées chez les enfants sont plus élevées que celles les adultes. Ils sont détectés également dans le liquide amniotique du

foetus à partir du deuxième trimestre (Silva et al., 2004b), le sang du cordant du nouveau né (Latini et al., 2003), et le lait maternel (Mortensen et al., 2005 ; (Kim et al., 2015)).

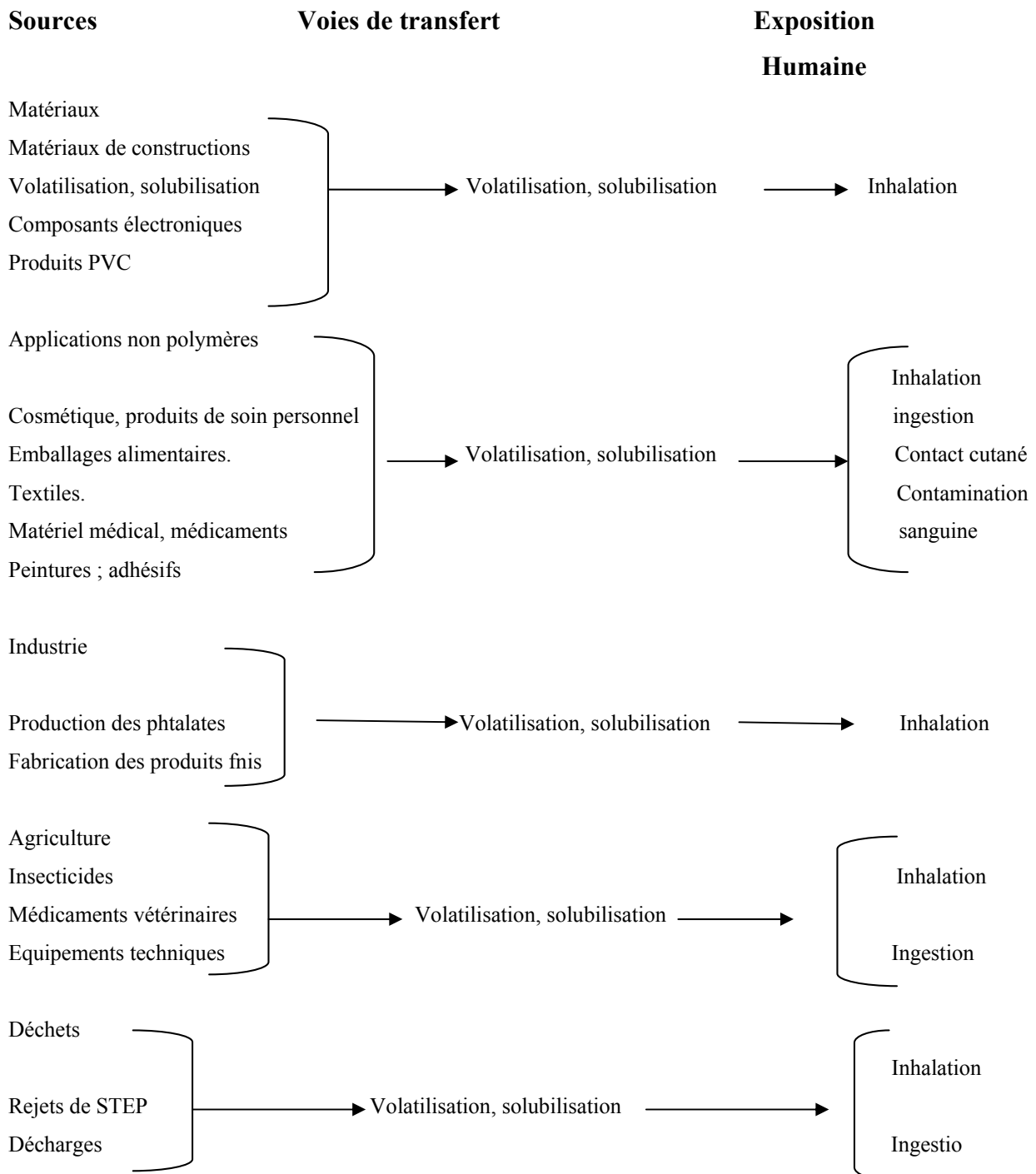


Figure 2 : Sources et voies d'exposition aux phtalates (Warmuth et al 2006)

1.3. Métabolisme

Les phtalates ont une demie vie courte, ils sont rapidement excrétés de l'organisme, (Fren et al., 2007 ; Koch et al., 2006). Leur métabolisme se déroule en 2 étapes : phase I : (hydrolyse) et phase II (conjugaison). Lors de la phase I les phtalates sont hydrolysés en métabolites

primaires. Cette première phase de métabolisation a lieu majoritairement au niveau de l'intestin et de différents organes parenchymateux et est catalysée par des lipases et estérases (Calafat et al., 2006; Rusyn et al., 2006; Frederiksen et al., 2007). Les métabolites sont excrétés dans les urines. Cependant les phtalates à longues chaînes tel que le DEHP et le DINP subissent après hydroxylation une oxydation. La phase II, conjugaison (catalysé par l'uridine 5 diphosphoglucuronyl transférase) entraîne la formation de glucuronides conjugués hydrophyles facilement excrétés dans les urines (Frend et al., 2007).

En raison de sa grande consommation et ses effets sur le système reproducteur le métabolisme du DEHP a été largement étudié. Koch et al (2006), ont décrit les différentes réactions de métabolisation de ce toxique. Le MEHP est le métabolite primaire, les métabolites secondaires sont MEHHP, MEOHP, 5cx MEPP, 2 cxMMHP. Environ 76% des métabolites sont excrétés dans les urines après 24 h d'ingestion, le MEHP représente seulement 6% des métabolites éliminés. Koch et al ont calculé la demi vie de cinq métabolites : MEHP (5 h), MEHHP (10 h), MEOHP (10 h), 5cx MEPP (12-15h) 2 cxMMHP (24 h). MEHP métabolite primaire qui est transformé très rapidement en métabolites oxydés secondaires après de multiples oxydations, La chaîne latérale libérée lors de la métabolisation du DEHP se transforme en 2 ethylexanoïque (2 EHA) via le 2 ethylexanol.

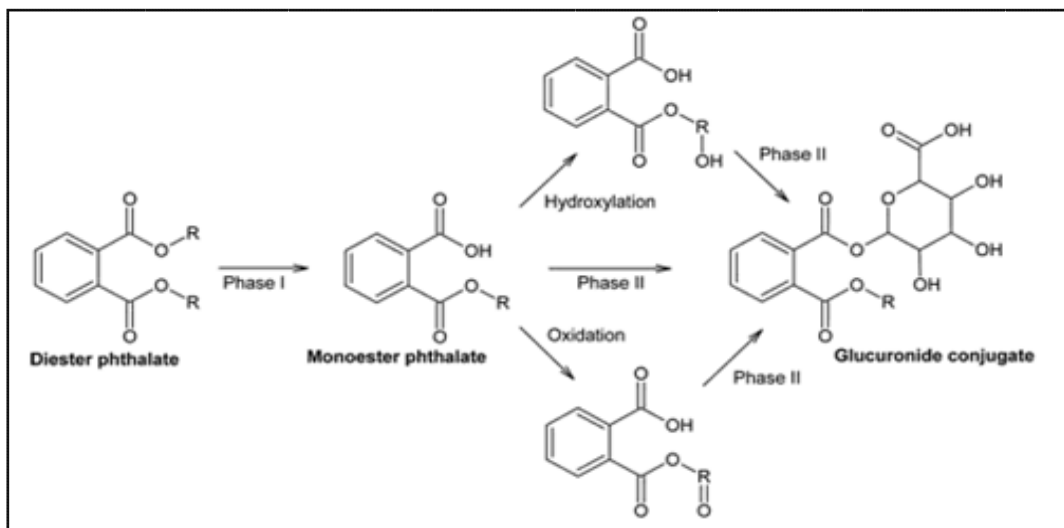


Fig 3 : Métabolisme des phtalates

1.4 Distribution.

La distribution des phtalates dans l'organisme est rapide et dépend de la voie d'administration. Dans le cas du DEHP, les résultats expérimentaux recueillis chez l'animal indiquent que les résidus (DEHP inchangé + métabolites) sont principalement localisés dans

le foie, l'intestin, le tissu adipeux et le rein, sans que soit observé différence importante entre les différents tissus, ni une accumulation de la molécule (ATSDR., 2002). Les concentrations retrouvées dans le cerveau et les testicules sont faibles. Le DEHP a été également détecté dans le foie des foetus issus de rattes mères ayant été traitée par gavage durant la gestation, démontrant la capacité du DEHP à traverser la barrière placentaire (Srivastava et al., 1989 ; Stroheker et al., 2006). Lors d'expositions par inhalation ou par injection intraveineuse, c'est généralement le poumon qui est le principal tissu cible, suivi par le foie et le rein.

1.5 Biomarqueurs d'exposition aux phtalates

L'exposition individuelle aux phtalates est très variable dans le temps. Elle dépend de plusieurs facteurs tels que le régime alimentaire, les types de produits cosmétiques et de soins corporels utilisés, et les activités quotidiennes, en particulier professionnelles. Des études réalisées chez l'Homme ont montré que les populations générales des pays développés étaient exposées à plusieurs phtalates tels que le DEP, le DBP, le BBzP, ou le DEHP.

Le choix pertinent d'un biomarqueur, du moment du (des) prélèvement(s) et la connaissance des divers facteurs pouvant influencer la toxicocinétique ou le métabolisme (âge, sexe, habitudes personnelles...) sont des éléments cruciaux pour une évaluation correcte de l'exposition. L'étude de Preau et al. (2010) démontre une variabilité importante intra-individuelle de l'excrétion urinaire du MEP et du MEHHP, biomarqueurs respectifs du DEP et du DEHP, en particulier au cours de la journée. Dans le cas des phtalates de haut poids moléculaire tel que le DINP, le dosage de MNP n'a pas montré une exposition importante. Ceci est expliqué par la faible sensibilité de l'indicateur biologique (MNP), puisqu'il est rapidement métabolisé et excrété dans les urines. Une autre étude sur le DINP et DIDP confirme l'intérêt d'utiliser des métabolites oxydés comme biomarqueurs, notamment le MCOP, par rapport aux mono-esters correspondants (Calafat et al., 2011). L'étude de Silva et al. (2011) met en évidence l'intérêt d'utiliser le MHPP en tant qu'indicateur biologique d'exposition DDP.

1.6 Exposition en population générale.

L'exposition aux phtalates, calculée sur la base des métabolites urinaires (Wittasek et al., 2007) montre que les niveaux médians pour la population générale (60 sujets âgés de 20 à 28 ans) en 2003 atteignaient en Allemagne 2,4 µg/kg pc/j pour le DEHP, 1,9 µg/kg pc/j pour le

Tableau 3 :Concentration des principaux métabolites des phtalates dans des échantillons d'urines humains dans différents pays

Pays	population	MMP	MEP	MBP	MiBP	MDEHP	Unité	References
Canada	2000 femmes 1 ^{er} trimestre		32.02	11.59	7.01	10.63	µg/L	Arbuckle.,2016
China	108 jeunes adultes	31.8	37.5	67	52.2	65.3	µg/L	Gao., 2016
Allemagne	30 filles et 30 garçons	2.8	13.5	8	9.8	12.3	µg/L	Koch., 2017
Iran	56 enfants et adoecents (6-18 ans)	17.4	28.2	42.9		44.9	µg/L	Jeddi et al. , 2018
Irland	120 enfants		38	26	41.4	32.8	µg/L	Cullen et al., 2017
Korée	305 femmes			41		23	µg/L	Jo, A., 2016
Korée	1676			39.5		44	µg/L	Kim et al., 2018
Korée	6480 adultes			44.2		88	µg/L	Choi et al., 2017
Korée	6003 adultes			24.2		52.2	µg/L	Park, et al., 2017
Korée	171 enfants		2.71	12.4	5.25	12.3	µg/L	Kim et al., 2017
Norvege	61 adultes			24.2	13.4	12.8	µg/L	Giovanoulis et al., 2016
Norvege	116femmes enceintes		55	25	20	26	µg/L	Sabaredzovic et al., 2015
Portugal	112 enfants		59.4	12.7	16.9	40.4	µg/L	Correia-Sa., 2018
L'arabie S	130 individus	8.65	47	38	38		µg/L	Asimakopoulos ., 2016
Slovénie	129		202	110	39	55	µg/L	Petrovicova., 2016
Slovenie	68			103	61.4	82.7	µg/L	Kolena., 2017
Spain	391 femm enceintes		246	27	28	87	µg/L	Valvi.,2015
Spain	120 enfants		198.9			63	µg/L	Cutanda., 2015
Spain	120 mères		150			33.3	µg/L	Cutanda,2015
US	446 femmes enceintes		41.1	41	47	48.4	µg/L	Polinski.,2018
US	378 femmes enceintes		47	13.7	9.47	14	µg/L	Wenzel.,2018

DBP, 1,4 µg/kg pc/j pour le DIBP, 0,4 µg/kg pc/j pour le DINP et 0,2 µg/kg pc/j pour le BBP. L'étude de Wittassek et Angerer (2008) réalisée chez 102 sujets allemands âgés de 6 à 80 ans révèlent des résultats similaires. Il a été démontré des concentrations urinaires plus élevées de métabolites de phtalates chez les enfants que les adultes (**Wormuth et al., 2006 ; Hartmann et al., 2015**), mais peu de différences entre hommes et femmes.

Les concentrations de métabolites du DEHP étaient similaires chez les mères et les enfants (**Haug et al., 2018 ; Cutanda., 2015**).

Lors d'une étude pilote « Elfe » réalisée en France (octobre 2007), les dosages des phtalates chez les femmes enceintes ont révélé que trois métabolites du DEHP étaient détectés dans plus de 95% des échantillons d'urine de 10 ml, (5-OH-MEHP) ; 2-éthyl-5-oxo-hexylphtalate (5-oxo-MEHP) ; mono-2-éthyl-5-hexylphtalate (MEHP)]. Les concentrations de ces métabolites s'étendaient de 0,3 à 768,1 µg/l (concentration médiane 13,7 µg/l) pour le MEHP ; de 0,3 à 1 587,9 µg/l (concentration médiane de 50,7 µg/l) pour le 5-OHMEHP, et de 0,2 à 924,5 µg/l (concentration médiane de 28,3 µg/l) pour le 5-oxo-MEHP (**Vandentorren et al., 2007**).

1.7 Exposition fœtale et néonatale aux phtalates.

Dans une étude pilote initiée par l'Agence Fédérale Allemande de l'Environnement (**Wittassek et al., 2009**), des échantillons de liquide amniotique et d'urine maternelle correspondante, ont été collectés pour mesurer les concentrations en métabolites (MnBP, MiBP, MBzP, MEHP, 5OH-MEHP, 5oxo-MEHP, 5cx-MEPP, 2cx-MMHP, OH-MiNP, oxo-MiNP, cx-MiNP) issus de 5 phtalates. Les résultats obtenus montrent que les niveaux mesurés dans les échantillons d'urine sont nettement plus élevés que ceux mesurés dans les de liquide amniotique. Pour la première fois, des métabolites secondaires sont détectés dans le liquide amniotique. Parmi eux, deux métabolites issus du DEHP présents dans tous les échantillons.

Les niveaux urinaires, plus élevés, s'avèrent plus adaptés pour l'évaluation d'une longue période d'exposition fœtale et maternelle que le liquide amniotique qui, lui, se renouvelle continuellement et de ce fait ne représente qu'une durée d'exposition courte.

En néonatalogie le DEHP est retrouvé dans de nombreux DM, tels que les tubulures de ventilation, le matériel de perfusion, les poches de transfusion, les circuits de dialyse ou de circulation extracorporelle, les gants, etc. Il est également présent dans les préparations lactées infantiles et, dans une moindre mesure, dans le lait maternel. Le DEHP n'est pas lié covalentement à la paroi plastique, il s'en libère et migre dans l'environnement, particulièrement sous certaines conditions (température élevée dans les incubateurs, pH alcalin, solutions

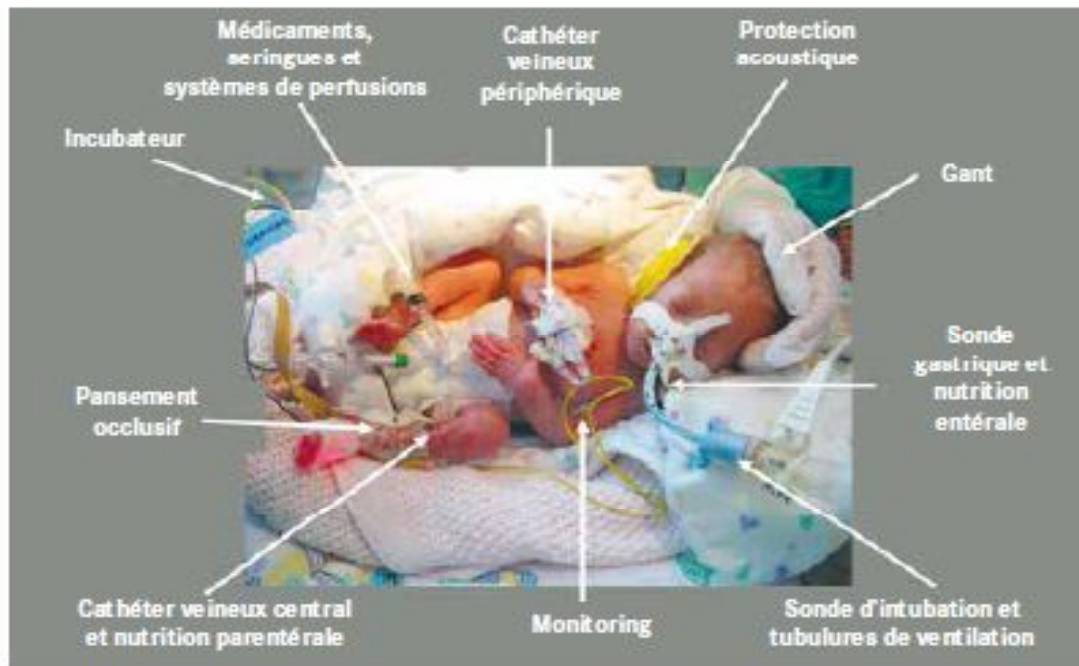


Figure 4: Sources possibles d'exposition au DEHP en neonatologie

Il peut ainsi entrer en contact avec les patients par voie parentérale, entérale, respiratoire ou cutanée.

Les nouveau-nés prématurés en milieux de soins intensifs reçoivent des doses qui dépassaient celles toxiques chez l'animal, particulièrement pour certaines procédures comme la circulation extracorporelle ou l'alimentation parentérale avec lipides. (Fischer et al., 2013)

Tableau 4: Matériel utilisé en néonatalogie pouvant contenir du DEHP (Fischer et al 2013)

Ventilation	Tubes endotrach eaux Masques/canules pour CPAP ou oxygénothérapie Tubulures (CPAP, ventilateurs, oxygène, humidification) Sondes & aspiration Masques et réservoirs d'insufflateur
Intraveineux	Cathéters: périphériques/ombilicaux/centraux percutanés Tubulures Conditionnement des dérides sanguins Alimentation parentérale Médicaments, perfusions (surtout lipophiles)
Enteraï	Sondes gastriques, sondes & alimentation Tubulures d'alimentation Systèmes d'extraction et collection du lait
Contact	Sondes urinaires Drains thoraciques, autres drains Sacs plastiques Pansements occlusifs Gants Monitoring Bracelets (identification)

1.8 Exposition pendant la période d'allaitement aux phtalates (Italie du sud).

La connaissance sur l'exposition aux phtalates des femmes allaitantes est limitée. Lors d'une étude américaine de l'USEPA (**Hines *et al.*,2009**) les concentrations en métabolites de phtalates MCPP , MECPP , MEHHP ,MEOHP , MBP , MBzP , MEHP , MEP , MMP, MiBP ont été mesurées dans le lait, le sérum, la salive et les urines de 33 femmes durant leur lactation. L'objectif est d'évaluer la distribution des phtalates dans ces différents fluides corporels pendant l'allaitement afin d'élucider leur impacts sur les nourrissons *via* la nutrition. La majorité des métabolites (7 sur 10) est retrouvée dans presque tous les échantillons d'urine, où le MEP était le plus élevé. Peu de métabolites sont détectés dans le lait et la salive. Un seul métabolite (MECPP) est essentiellement retrouvé dans le sérum de 80 % des échantillons. Les résultats indiquent ainsi que les métabolites secondaires de phtalates sont essentiellement détectés dans les urines.

L'étude de **Latini *et al.*,2009** s'est intéressée à l'exposition des femmes aux phtalates pendant l'allaitement. les métabolites (MnBP , MiBP, MBzP, MEHP, 5OH-MEHP,5oxo-MEHP, 5cx-MEPP , 2cx-MMHP , OH-MiNP , oxo-MiNP,cx-MiNP) issus de 5 phtalates ont été mesuré chez 62 femmes dans le lait maternel. Les résultats indiquent la présence de métabolites primaires,et notamment de deux d'entre eux, le MiBP et le MEHP (issus duDiBP et du DEHP), dans tous les échantillons. Bien que les métabolites secondaires soient généralement considérés comme les biomarqueurs d'exposition aux phtalates les plus fiables dans tous les milieux biologiques, les résultats de cette étude suggèrent que ceux-ci, de part leur caractère hydrophile, seraient de moins bon biomarqueurs dans le lait que les métabolites primaires (monoesters).

Enfin, la mise en perspective de ces résultats avec d'autres données publiées, confirme que le lait maternel constitue une source d'exposition additionnelle potentielle aux phtalates pour les nourrissons. Quelques publications font état des teneurs en phtalates dans le lait maternel (**Main *et al.*, 2006; Högberg *et al.*, 2008 ; Latini *et al.*, 2009**). Ainsi, les teneurs en DEHP dans le lait prélevé chez 42 femmes suédoises entre la 2e et la 3e semaine qui a suivi l'accouchement varient de 0,45 à 305 µg/l, avec une valeur médiane de 9 µg/l Högberg *et al.* (2008). En général, les équipes recherchent les métabolites, en particulier les monoesters vu les difficultés analytiques concernant la quantification des composés parents . Ces monesters sont en effet suffisamment lipophiles pour être éliminés dans le lait, par exemp les concentrations de MEHP, métabolite du DEHP, varient de 0,5 à 6,5 µg/l (Högberg *et al.*, 2008). Elles sont comprises entre 1,8 et 109 µg/l dans une étude conduite sur 62 femmes italiennes (**Latini *et al.*, 2009**).

Exposition de l'enfant en bas âge aux phtalates

Dans l'étude réalisée par Main et al. (2006) soixante-huit garçons en bonne santé ont été comparés à 62 garçons atteints de cryptorchidie (absence de descente des testicules dans le scrotum avant la naissance) afin de voir la possibilité d'une influence des phtalates dans le lait maternel sur les niveaux d'hormones de reproduction chez ces garçons âgés de trois mois.. Cette étude n'a pas révélé pas de lien direct entre l'exposition aux phtalates et l'incidence de la cryptorchidie, cependant elle montre que des taux plus élevés de métabolites des phtalates comme le MMP, le MEP, le MnBP et le MiNP dans le lait maternel, et par conséquent, une exposition plus importante des nouveaux-nés, étaient associés à des altérations de leurs niveaux d'hormones de reproduction. Ces résultats confirment que les testicules humains sont vulnérables à l'exposition aux phtalates lors de leur développement, même si la cryptorchidie n'est pas une conséquence prévisible.

Tableau 5: Exposition de l'enfant en bas âge aux phtalates

Population	N	MMP	MEP	MBP	MBzP	Pays/ référence
6-11 ans	328	-	91.	341.	49.4	USA/CDC(2005)
6-11 ans		1.45	85.	131	.133.4	USA/CDC(2005)
2-28 mois	393	-	64.5	19.	214.9	USA/Sathyanarayana(2008)
6.4-9.2 ans			75.7	28.2	118.4	USA/Wolff et al (2007)
Nouveau-nés prématurés	163	3.2	7.79	40.9	2.46	USA/Calafat et al. (2009)
2.1-10.5 ans filles		96.5	18.11	7.4	30	Taiwan /Lin non publié
Moy 6.7 ans TP fille	90	-	-	12.7	26	Taiwan/Chou et al.(2009)
Moy 8.0 ans CCP fille		52.2	172.5	3.3	33	Taiwan/Chou et al.(2009)
Moy 8.2 ans filles	6	26.4	-	-	254	Taiwan/Chou et al.(2009)
control		---	303	19.7	239	Germany/Becker et al. (2004)
3-14 ans	52	--	-	-	-	Germany/Koch et al. (2007)
2-14 ans			174	-	-	

1.9 Exposition professionnelle

Une étude réalisée dans une usine chinoise de fabrication de revêtement de sol en PVC (**Pan et al., 2006**) a porté sur l'équilibre hormonal de 74 hommes exposés à des niveaux élevés de DEHP et de DBP. Les résultats obtenus indiquent des niveaux 5-100 fois supérieurs en métabolites urinaire en comparaison avec les salariés non exposés (prélèvements spots), avec une moyenne de 644 ug/g de créatinine pour le MBP et 566 ug/g de créatinine pour le MEHP. Une association a été établie entre une légère diminution de la concentration sérique en testostérone et l'exposition combinée au DEHP et au DBP. La quantité de DEHP absorbée par

les sujets exposés a été estimée à environ 48.2 ug/g/jour (0.5 ug/g/jour pour les témoins non exposés).

Une autre étude a porté sur des salariés suédoise exposés à une concentration moyenne ≤ 0.5 mg / m³ de DEHP (0.2-2.1 mg/ m³), dans trois usines produisant ou utilisant du DEHP (**Modigh et al., 2002**). Aucun allongement du délai à concevoir n'a été observé (193 hommes et 326 grossesses éligibles pour l'étude).

Doses toxiques.

Les seuils de tolérance sont fonction de l'espèce étudiée, du mode d'administration et du composé considéré. La toxicité aiguë peut s'exprimer de manière classique par les doses létales (DL). Des expériences effectuées dans des circonstances se rapprochant des conditions réelles ont permis de déterminer des doses seuils.

Tableau 6: Valeurs toxiques de certains phtalates D'après (NINCAS, 2008b, c, d)

Voie d'exposition	espèce	DEP	DEHP	DBP	BBP
Oral (LD50)	Sourie	6.2x10 ² mg/kg bw	>4.0x10 ⁴ mg/kg bw	4.8x10 ³ mg/kg bw	6.2x10 ³ mg/kg bw
	Rat	>5.6x10 ² to 3.1x10 ³ mg/kg bw	>2.0x10 ⁴ mg/kg bw	6.3x10 ³ mg/kg bw	2.0x10 ⁴ mg/kg bw
	>4.0x10 ² to 8.6x10 ² mg/kg bw	2.6x10 ⁴ mg/kg bw		>1.4x10 ⁴ mg/kg bw
	lapin	1.0x10 ² mg/kg bw	3.4x10 ⁴ mg/kg bw		
	Chien	5.0x10 ² mg/kg bw	2.5x10 ⁴ mg/kg bw		
cutanée	Rat	>1.1x10 ³ mg/kg bw			6.7x10 ³ mg/kg bw
	Porc	3.0x10 ² mg/kg bw			/
	sourie	/			3.2x10 ³ mg/kg bw
	lapin	/		>2.0x10 ⁴ mg/kg bw	>1.0x10 ⁴ mg/kg b
Inhalation (4h) (LC50)	Sourie	4.9 mg/L			
	rat	7.5 mg/L		>15.7 mg/L	

1.10 Mécanisme d'action des phtalates.

Implication des récepteurs nucléaires.

Rappel sur les récepteurs nucléaires.

Les récepteurs nucléaires forment une superfamille de récepteurs intracellulaires qui fonctionnent comme des facteurs de transcription. Ils sont stimulés par liaison de ligands de nature lipophile et modulent l'expression de gènes cibles. Le signal extracellulaire est apporté par une substance hydrophobe, comme une hormone stéroïde, capable de traverser la membrane cellulaire. Le récepteur contrôle l'expression de gènes cibles après avoir reconnu et fixé son signal permettant ainsi la régulation de nombreuses fonctions biologiques comme la croissance, la reproduction et le métabolisme énergétique .

Structure et fonction des récepteurs nucléaires

Les récepteurs nucléaires ont une taille variant de 40 à 100 kilodaltons et présentent la même structure générale, comprenant généralement quatre domaines fonctionnels notés de A à E.

Un cinquième domaine (F) peut être décrit pour certains récepteurs nucléaires . Au nombre d'une quarantaine, ils se rangent en trois classes principales: l'une d'elles (NR3 pour nuclear receptor 3) qui contient en particulier les récepteurs des hormones stéroïdes : œstrogènes (ER..et ER..ou ESR1 et ERS2), progestérone PGR, androgène AR , glucocorticoïdes GR,

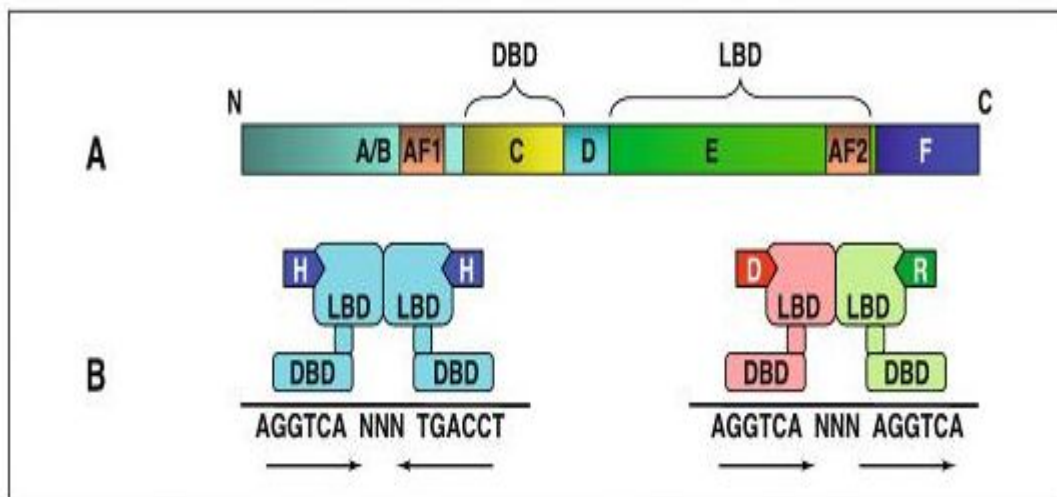


Figure 5: structure générale des récepteurs nucléaires

minéralocorticoïdes MR. Une autre classe NR1 rassemble les récepteurs des hormones thyroïdiennes TR et de la vitamine D VDR

Récepteurs PPAR

Un ensemble de molécules endogènes et exogènes exercent un effet sur la prolifération des peroxyosomes. Comme les autres récepteurs nucléaires, les Récepteurs PPAR exercent en absence de ligand une répression de la transcription au niveau de PPPE (peroxyosome-proliferator responsive element) par l'intermédiaire de NCOR, qui est levée après fixation du ligand par l'intermédiaire de NCOA. Ils sont activés par la liaison de certains acides gras et/ou de leurs métabolites lipidiques et peuvent ainsi jouer un rôle déterminant en signalant, au niveau de l'expression génique, un changement de l'apport nutritionnel et, en particulier, de sa composition lipidique.

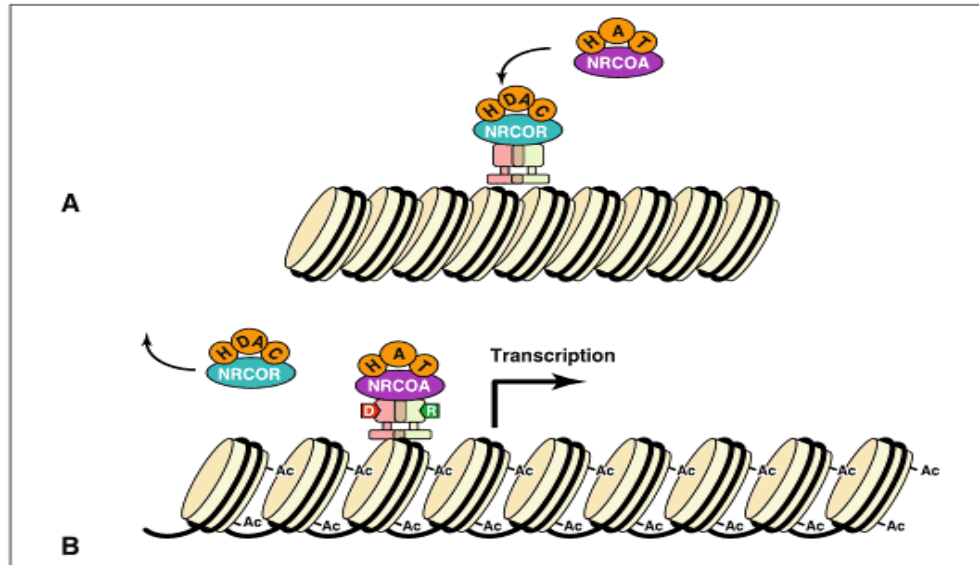


Figure 6 : activation de la transcription par les récepteurs nucléaires

En absence de ligand, l'activité transcriptionnelle du récepteur nucléaire est inhibée par des corépresseurs associés à une activité, la chromatine est compacte et ne permet pas la transcription.

Récepteurs des xénobiotiques

Ils sont principalement exprimés dans le foie, le rein et l'intestin et jouent un rôle majeur contre les effets néfastes de l'accumulation des composés toxiques endogènes et exogènes.

Ils jouent un rôle majeur dans la détoxification des xénobiotiques et de produits endogènes toxiques (bilirubine, acides biliaires) en activant l'expression des gènes codant pour des protéines de métabolisme des médicaments, comme les cytochromes. Comme les autres récepteurs de la famille NR1, ils s'hétérodimérisent avec un récepteur RXR, se fixent en absence de ligand sur leur responsive element et répriment la transcription des gènes cibles ; en présence de ligand, l'inhibition est levée et la transcription peut avoir lieu.

Les récepteurs des œstrogènes

Les effets génomiques des œstrogènes résultent de l'action de deux récepteurs nucléaires des œstrogènes ($RE\alpha$ et $RE\beta$). Le $RE\alpha$ est préférentiellement exprimé dans l'utérus, les glandes mammaires, hypophyse, etc, alors que le $RE\beta$ est exprimé dans un grand nombre de tissus tel que le colon, le système vasculaire, le poumon et les fibroblastes, mais majoritairement dans la prostate, les ovaires et les testicules.

Récepteurs AR

Le récepteur des androgènes (AR, NR3C4) est le récepteur des hormones sexuelles mâles, la testostérone et son métabolite, la dihydrotestostérone. L'AR est principalement exprimé dans

le testicule, il est présent dans la prostate, les glandes surrénales, les reins, le cerveau et l'hypophyse. Les androgènes humains comme la testostérone ou la dihydrotestostérone sont des agonistes. La grande majorité des ligands environnementaux de ce récepteur sont des molécules antagonistes (Paris et coll., 2002 ; Korner et coll., 2004). Très peu d'androgènes environnementaux sont des agonistes excepté le retardateur de flamme bromé TBECH (Khalaf et a., 2009).

Mécanismes

De nombreuses études ont démontré que les récepteurs nucléaires PPAR (*peroxysome proliferator activated receptor*) sont des cibles privilégiées des phtalates chez les mammifères. Les phtalates les plus actifs sur ces récepteurs sont le DEHP et son métabolite le MEHP, le BBP, le DBBP et le DIBP. Il a été démontré que le MEHP était un agoniste partiel de PPARc (SnuRM ou SPPARM pour *selective PPAR modulator*) (Feige et al., 2007) et que son activité était plus faible sur le PPARc de souris que sur le PPARc humain. En plus le MEHP en interagissant avec PPARa induisait une carcinogenèse hépatique chez la souris (Feige et al., 2010). Les récepteurs des oestrogènes a et b, le récepteur des androgènes, les récepteurs des xénobiotiques CAR (*constitutive activated receptor*) et PXR (*pregnan X receptor*) sont également des cibles des phtalates.

En effet, les phtalates sont des activateurs de faible affinité des récepteurs des oestrogènes (Ghisari et al., 2009) et des anti-androgènes de très faible affinité *in vitro* (Stroheker et al., 2005 ; Kruger et al., 2008) et *in vivo* (Jarfelt et al., 2005).

La perturbation endocrine des phtalates semble donc être majoritairement due à leur activité d'agonistes des récepteurs PPAR (alpha et gamma).

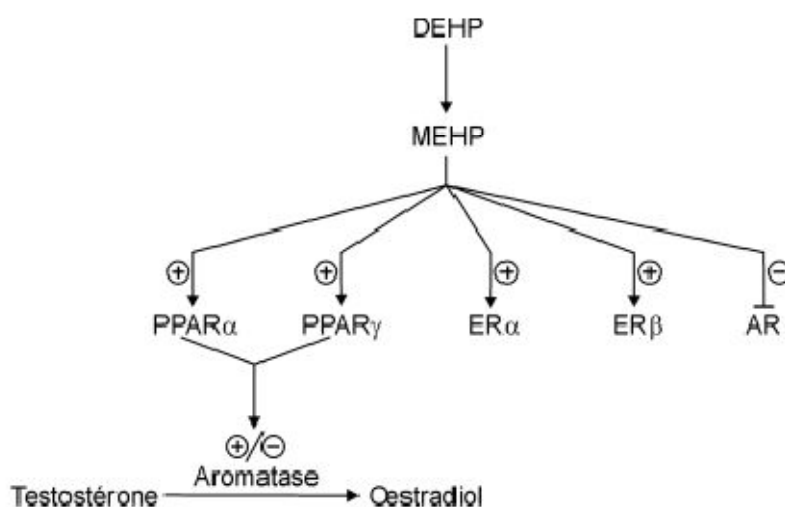


Fig 7 : cibles des phtalates

1.11 Effets des phtalates démontrés chez les animaux ou in vitro.

1.11.1 Effets des phtalates sur le développement et les fonctions du testicule chez les rongeurs : études in vivo

Chez le rat les études ont montré que l'exposition in utero au di(n-butyl)phtalate (DBP) ou DEHP conduit à une altérations du développement des cellules testiculaires : cellules de Leydig et les cellules Sertoli (Sharpe., 2008 ;Foster., 2006). L'exposition in utero aux phtalates entraine la prolifération subnormale des cellules de Sertoli avec modification de leur fonction, une agrégation anormale des cellules de Leydig, une diminution de la production de testostérone fœtale et de l'Insl3. Cela conduit à une réduction de la distance anogénitale, un hypospadias et une cryptorchidie. (Fisher., et al 2003 ; Auharek et al, 2010)

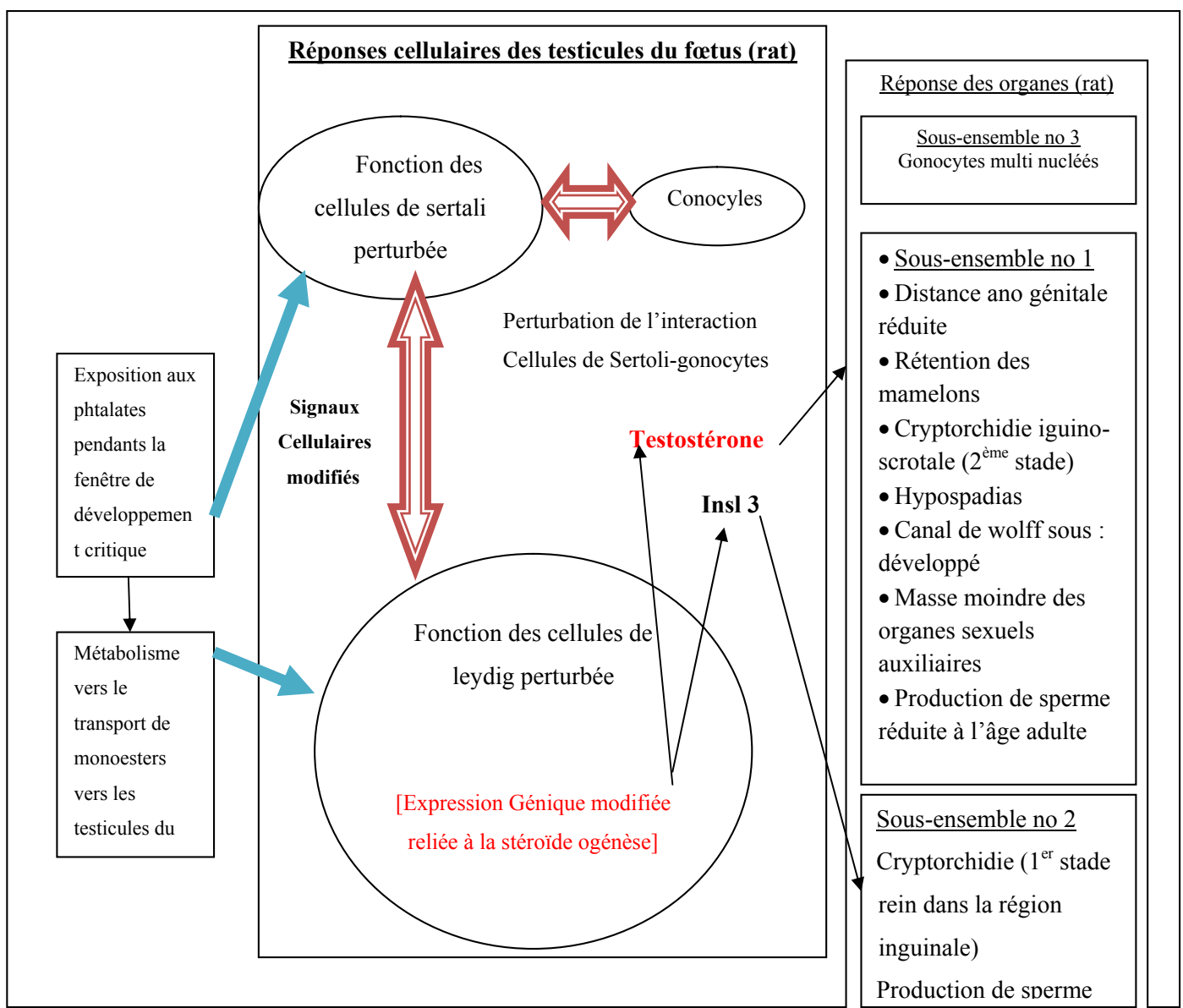


Fig 8 : Effets des phtalates sur le développement et les fonctions du testicule chez les rongeurs

Enfin, une formation de gonocytes multinuclés durant la vie néonatale et une réduction de la spermatogenèse chez l'adulte ont été décrites (Fisher et al., 2003 ; Ferrara et al., 2006).

L'effet d'un mélange de phtalates sur la production de testostérone testiculaire chez les fœtus des rats

Bien que les effets de perturbateurs endocriniens de certains phtalates aient été démontrés chez les animaux, les effets de mélange de phtalates, eux, ont été peu étudiés (NRC., 2008). Howdeshell *et al.* (2008) ont exposé des femelles Sprague-Dawley gestantes entre les jours 8 et 18 de la grossesse à six phtalates BBP, DBP, DEHP, DEP, DiBP et DPP, pris individuellement ou en mélange, et ont mesuré le taux de testostérone testiculaire des foetus au 18ème jour. Les doses administrées lors des expositions individuelles étaient équivalentes pour le BBP, le DEP, le DEHP et le DiBP (100 à 900 mg/kg/jour) alors qu'elles étaient différentes pour le DBP (33 à 600 mg/kg/jour) et le DPP (25 à 900 mg/kg/jour). Pour ce qui est des expositions au mélange, sept différentes doses de phtalates ont été administrées (65-1300 mg/kg/jour, à une proportion de 3 :3 :3 :3 :1 deBBP : DBP : DEHP : DiBP : DDP). Les résultats obtenus suite à des expositions aux phtalates individuels montrent que le DEP n'a aucun effet sur la production de testostérone aux doses journalières tolérables.

La diminution de la production de testostérone a été observée à partir d'une dose de mélange équivalente à 260 mg/kg/jour de phtalates et pour les doses plus fortes.(Howdeshell *et al.*, 2008) .

1.11.2 Perturbation de la fonction thyroïdienne.

Les études entreprises chez le rat montrent que l'administration de fortes doses (2 g/kg de masse corporelle) de DEHP réduit les taux circulants de T4 (Sekiguchi et al., 2006). De même, le DBP abaisse le taux de T3 et T4 des rongeurs de façon dose-dépendante (O'Connor et al., 2002). Une augmentation transitoire de T3 et T4 Il a été observé après l'injection intraveineuse de DEHP à une concentration équivalente à celle présente dans les poches de transfusion sanguine (Gayathri et al., 2004). Des modifications histologiques de la glande thyroïde ont été décrites chez des rats traités au DEHP (Howarth et al., 2001). La seule étude des effets des phtalates réalisée à ce jour chez l'homme repose sur le suivi de 19 adolescents ayant été exposés au DEHP en service de néonatalogie par le biais d'un système d'oxygénation à membrane extracorporelle (Rais-Bahrami et al., 2004). Il n'a pas été constaté de dysfonctionnement thyroïdien une quinzaine d'années après la période d'exposition.

1.11.3 Effets sur le foie

Un effet sur le foie est commun à l'ensemble des phtalates. Par exemple le DEHP administré à la dose de 5 à 5000 ppm dans la nourriture, provoque une hépatomégalie, l'absorption orale du toxique, chez le rat, induit la prolifération des cellules du foie et des peroxysomes. Cette prolifération des peroxysomes occasionne une surproduction de peroxyde d'hydrogène, créant ainsi un stress oxydatif pour les cellules. Ce stress peut causer des dommages à l'ADN et augmente les probabilités d'apparition d'un cancer du foie.

Moore et al. (2002) ont rapporté chez le Rat et la Souris, après traitement avec le DEHP, une élévation du contenu hépatique en CYP 4A1 suggérant une induction des monoxygénases à Cyt P-450. Ces effets, qui ont été observés chez le rongeur, seraient liés à l'activation des récepteurs *P-PAR alpha* (*peroxisomes proliferator-activated receptors*). Il semblerait que ces récepteurs soient beaucoup moins actifs et présents en plus faibles quantités dans les hépatocytes humains par rapport à ceux des rongeurs, rendant l'homme moins sensible à l'action cancérigène du DEHP.

Dans le cas du DINP les études expérimentales montre que le foie est l'organe le plus sensible. L'exposition des rats et des souris à des doses élevées de cette substance dans la nourriture (336 mg/kg/j pour les souris femelles, 700 à 900 mg/kg/j chez des rats et souris males induit un effet hepatocarcinogénique en augmentant l'incidence de tumeur dans le foie. L'hépatomégalie, la prolifération des cellules (conséquence de la prolifération des peroxysomes) ont été également mis en évidence (Moore., 1998 ; Valles., 2003 ; Smith., 2000 ; Kauffman., 2002).

Toxicité du développement. Appareil reproducteur

L'exposition au DEHP pendant le premier trimestre chez la femme enceinte entraîne une diminution de la distance anogénitale, en particulier chez les garçons nouveau-nés (Swam et al., 2005 ; Swan et al., 2015). Les phtalates ont potentiellement autres effets chez l'homme tel que l'hypospadias, cryptorchidie (si exposition *in utero*), et chez la femme ils peuvent induire une puberté précoce (Raison Peyron., 2011). Des études ont associé la présence de résidus de phtalates et de leur métabolites dans les urines à des altérations de la qualité du sperme (MBP-monobutylphtalate, MBzP), des lésions d'ADN spermatique (phtalate de monoéthyle) et des modifications équivoques d'hormones sexuelles (inhibine B avec le MBP et FSH avec le MBzP, marqueurs de la spermatogénèse) (Hauser et Calafat., 2005 ; Matsumoto et al., 2008 ; Wirth et al., 2008 ; Herr et al., 2009 ; Meeker et al., 2009).

Etudes chez la femme

Troubles de l'appareil de reproduction féminin

L'endométriose

Une étude a mis en évidence le fait que les femmes atteintes d'endométriose ont dans leur sang des taux de phtalates DEHP supérieurs à la normale des autres femmes. De plus, on a détecté du DEHP et/ou le métabolite MEHP dans le liquide péritonéal de 92,6% de ces femmes. Cela suggère que le DEHP peut participer à provoquer l'endométriose (**Corbellis et al., 2003**).

Puberté précoce

Chez des jeunes filles portoricaines des taux élevés des phtalates dans le sang, dont le DEHP et de son métabolite le MEHP, connus pour leur activité oestrogénique et anti-androgénique ont été associé à un développement mammaire précoce (**Colon et al., 2000 ; Mc Kee., 2004 ; ECB 2008**). Il a été remarqué que Porto Rico importe beaucoup de nourriture emballée dans du plastique qui, combiné à d'autres facteurs, pourrait contribuer à une exposition globale importante à des phtalates. Au niveau de l'ovaire le DEHP affecte la croissance du follicule par une réduction des taux d'E2 in vitro (**Kalo et al., 2015**).

Durée de gestation et prématurité

Les travaux beaucoup moins nombreux, chez la femme font état de grossesses moins nombreuses et de fausses couches chez des ouvrières exposées de façon chroniques à des doses élevées de phtalates.

Une relation significative entre l'exposition aux phtalates pendant la grossesse et la durée de gestation a été décrite dans plusieurs études. Dans son étude Latini et al 2003 ont mesuré le taux du DEHP, MEHP chez 84 nouveaux nés. Ces toxiques ont été détectés dans 65 échantillons parmi les 84 étudiés. Les résultats obtenus confirment que l'exposition des humains aux phtalates peut se produire pendant la vie fœtale, les résultats montrent également une durée de gestation plus courte (**Latini et al., 2003**).

Chez l'enfant. Troubles du comportement

Les données, peu nombreuses et récentes, concernent surtout les jeunes enfants. Une exposition prénatale entraînerait des désordres psychiques associés à une hyperactivité chez des enfants de 4-9 ans exposés aux phtalates (**Engel et al., 2010**). Des concentrations sériques de MEHP et de DEHP ont été rapportées chez des enfants autistes (**Kardas et al., 2016**).

Système immunitaire

1.11.4 Système immunitaire.

Les phtalates se distinguent par leur action sur le système immunitaire (**Kimber et al., 2010**).

Des études in vivo montrent des atteintes respiratoires à différentes doses (**Kwak., 2009**); elles identifient des effets sur des médiateurs chimiques du système immunitaire (cytokines proinflammatoires), ainsi que des modifications de l'expression des IgE et IgG lors d'expositions chroniques à faibles doses (10µg/kg/j).

Les études épidémiologiques établissent un lien entre la présence de PVC dans les chambres (revêtements muraux et sols, huisseries), la contamination des poussières domestiques en phtalates, et les allergies respiratoires, en particulier chez les enfants (**Kwak ES,2009**). Les concentrations en MEHP sont corrélées avec l'asthme chez les enfants (**Wang et al., 2015**).

Maladies cardiovasculaires et métaboliques

Plusieurs études établissent des liens entre les taux circulants de phtalates et d'autres pathologies, dont des maladies cardiovasculaires, des désordres métaboliques hépatiques et le diabète. Des taux urinaires des phtalates sont corrélés à une insulino-résistance chez l'adulte et à une surcharge pondérale, suggérant des effets obésogènes; la présence de métabolites du DEHP serait plus particulièrement associée à des désordres thyroïdiens (**Meeker et al., 2009**).

Effets sur le foie

Selon la fiche technique du DEHP produite par l'INRS, l'absorption orale du toxique, chez le rat, induit la prolifération des cellules du foie et des peroxyosomes (organites cellulaires chargées de la détoxification). Cette prolifération des peroxyosomes occasionne une surproduction de peroxyde d'hydrogène, créant ainsi un stress oxydatif pour les cellules. Ce stress peut causer des dommages à l'ADN et augmente les probabilités d'apparition d'un cancer du foie. Cependant, il est confirmé que cet effet est négligeable chez l'être humain puisque nous sommes moins sensibles que les souris ou les rats à une induction de la prolifération des peroxyosomes. En effet, il existe une grande variabilité de sensibilité hépatique entre les espèces, ce qui permet de ne pas considérer le DEHP comme cancérigène pour le foie. De plus, l'INRS affirme de façon plus générale, qu'il ne peut pas classer le DEHP comme cancérigène à cause d'un manque d'étude spécifique à l'homme.

Effets épigénétiques

Plusieurs études rapportent des effets de divers phtalates (BBP, DBP, DEHP, MBP) et de leurs métabolites actifs (MEHP) sur l'expression de gènes impliqués dans des fonctions de reproduction et sur les profils de méthylation génomiques. Une étude de 2005 sur des cellules humaines de cancer mammaire a montré que le BBP induit une augmentation de l'expression de l'ARNm du récepteur ER α , en raison d'une diminution du niveau de méthylation de l'ADN de la région promoteur du récepteur. Dans une autre étude réalisée sur des souris, **Ge et al, (2002)** a mis en évidence une hypométhylation du proto-oncogène *c-myc* dans le foie des animaux exposés au DnBP.

L'exposition prénatale au DEHP chez les souris induit une augmentation de la méthylation de l'ADN dans les testicules et de l'expression de la méthyltransférase (**Wu et al., 2010**).

Tableau 7 : Effets sanitaire chez le nourrisson et l'enfant (SWAN, 2008)

Système	exposition	sexe	conséquences	Phtalates ou métabolites mesurés dans les urines	références
Reproducteur femelles	prénatale	males/	période de grossesse réduite	MEP MEHP	Latini et al (2003)
	prénatale	males	distance anogénitale	MEHP MEOHP	Swam (2008)
			réduite	MEHHP MEP MBP	
			taille de pénis réduite	MEHP	
			décente incomplète	MEHP MEHHP	
			des testicules	MEOHP	
	lactation		diminution du SHBG	MEP MBP	Main (2006b)
			diminution LH	MMP MEP MBP	
			diminution LH	MiNP	
	Respiratoire	Enfance	femelles	puberté précoce	DEHP
enfance		males/ femelle	rhinite et eczema	BBzP	Bornehag et al(2004)
			Asthme	DEHP	Bornehag et al
			Rhinite eczema	DEHP	Kolarik (2008)

Tableau 8 : Effets sanitaire chez l'adulte (SWAN, 2008)

Système	sexe	conséquences	Phtalates ou métabolites mesurés dans les urines	références
Reproducteur	males/	altération de l'ADN spermatique	MEP, MEHP	Hauser et al (2007)
		altération de l'ADN spermatique	MEP	Duty et al (2003b)
	males	diminution de la motilité	MEP	Duty et al (2003a)
		réduction de la concentration du sperme	MBP, MBzP	
	males	diminution de la motilité	DBP, DEHP	Zhang (2006)
	males	diminution T libre	MBP	Pan et al (2006)
		diminution LH		
males	diminution LH/T libre			
	diminution du FSH	MBzP	Duty et al (2005)	
		diminution mobilité, diminution LH	MEP	
Respiratoire	males	altération fonction pulmonaire	MEP, MBP	Hopin et al (2004)
Métabolisme	males		MEHHP, MEOHP	Stalhut et al (2007)
			MBzP, MEP	
Thyroïde		diminution T3 et T4	MBP, MBzP, MEP MEHP	Meeker et al (2007b)

Chapitre II

L'épithélium intestinal

2. Structures de l'intestin grêle

2.1 Anatomie

1) Le duodénum

Le duodénum est la première portion de l'intestin grêle. Le canal cholédoque, venant de la vésicule biliaire, et le canal de Wirsung, issu du pancréas, débouchent dans le duodénum. Ces deux canaux, déversant respectivement la bile et les enzymes pancréatiques, ont souvent un orifice duodénal commun, l'ampoule de Vater. Le duodénum histologique est plus court que le duodénum anatomique, s'arrêtant au niveau de l'ampoule de Vater. La muqueuse duodénale est pourvue de villosités plus lamellaires que cylindriques.

Le duodénum reçoit le **chyme gastrique** (substance semi-liquide, épaisse et visqueuse produite au niveau de l'estomac lors de la digestion de la nourriture), imprégné des enzymes salivaires et gastriques. Dans cet organe, le chyme subit l'action du suc pancréatique, de la bile et du suc intestinal. Les aliments sont dégradés en nutriments ou métabolites pouvant franchir la barrière intestinale. Les résidus non digérés restent dans la lumière intestinale et sont évacués dans le côlon où ils constituent les fèces.

2) Le jéjunum et l'iléon La plupart des phénomènes digestifs sont réalisés dans le duodénum, les autres segments participent principalement à l'absorption des nutriments et des ions. Le **jéjunum** fait suite au duodénum et possède une paroi interne constituée d'une muqueuse tapissée de nombreux replis qui augmentent la surface totale interne et permettent une plus grande absorption des (Reichardt, 2008)

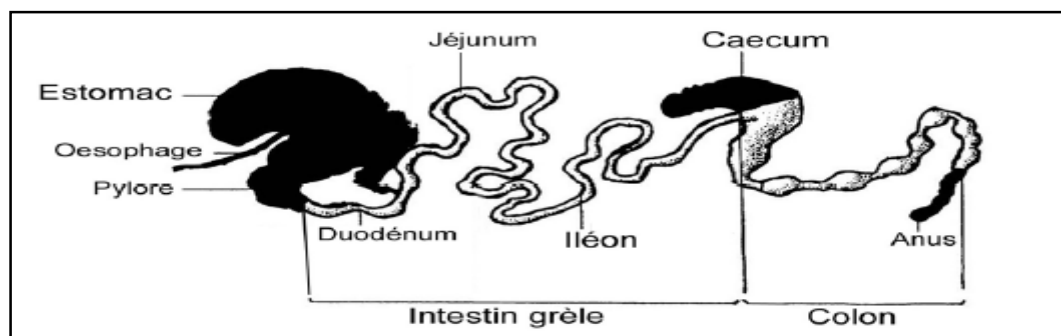


Figure 09 Schéma représentant le tube digestif chez le rat. En blanc l'ensemble intestin grêle - gros intestin (côlon).

2.2 L'épithélium intestinal

Structure et organisation

2.2.1 Paroi

La paroi de l'ensemble du tube digestif présente une organisation complexe, constituée de quatre tuniques successives de l'extérieur vers l'intérieur : la séreuse, la musculuse, la sous-muqueuse et la muqueuse (Figure 10).

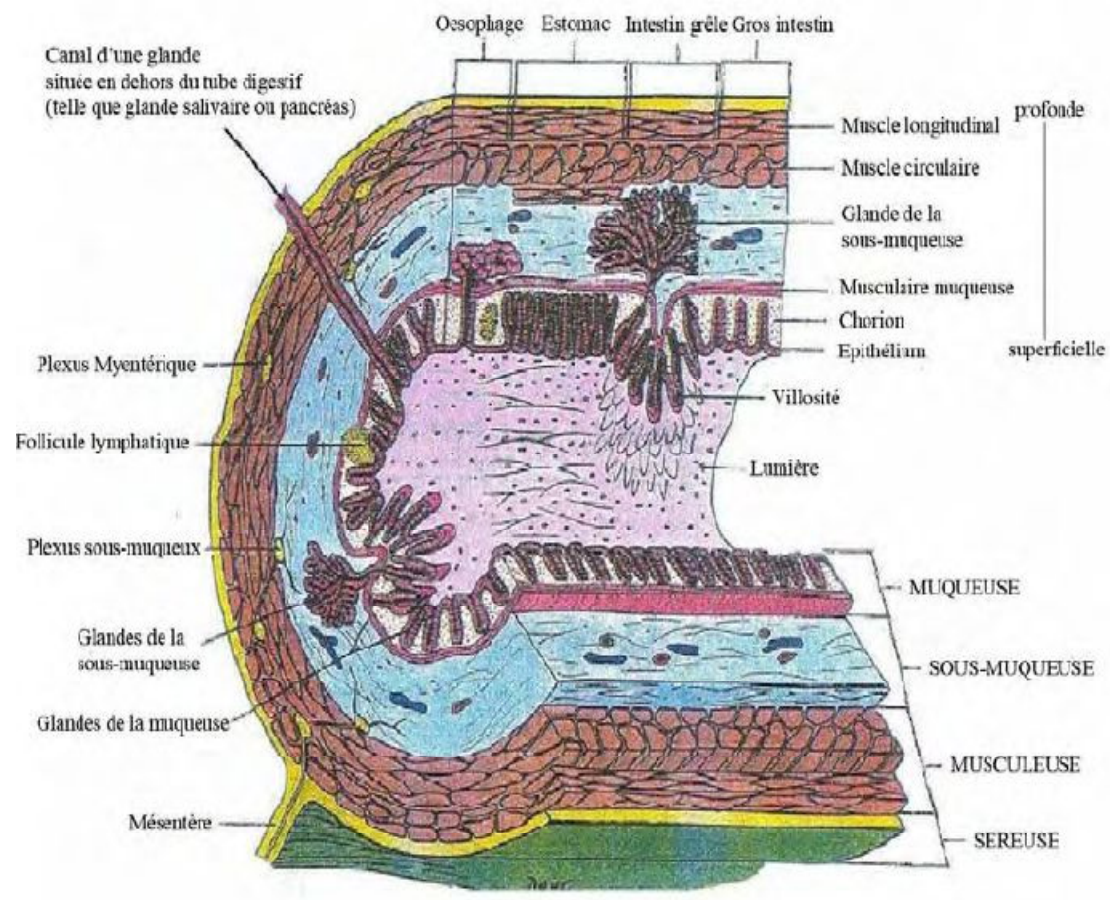


Figure 10 : Schéma d'une coupe transversale de la paroi du tube digestif

La séreuse est une tunique fine, formée de cellules endothéliales en continuité avec le mésentère, recouvrant un tissu lâche, et adhérent de façon intime à la musculuse sur les faces et le bord libre du conduit. Cette disposition est favorable aux changements de diamètre associés à la motilité intestinale.

La musculuse est constituée de fibres musculaires lisses disposées en deux couches de cellules musculaires : une circulaire interne et une longitudinale externe. Entre ces deux couches se trouve le plexus nerveux myentérique (plexus d'Auerbach).

La sous-muqueuse se compose d'un tissu conjonctif lâche à fibres de collagène et des fibres élastiques, permettant le glissement de la muqueuse par rapport aux couches musculaires. La sous-muqueuse abrite un riche réseau artériel, veineux et lymphatique, ainsi que le plexus nerveux sous-muqueux (plexus de Meissner).

La structure de la **muqueuse** diffère considérablement d'une extrémité à l'autre du tube digestif, reflétant les différences d'activités et de fonctions de chaque segment du tractus. La muqueuse est constituée de trois couches successives : la *muscularis mucosae*, la *lamina propria* et l'épithélium.

- La *muscularis mucosae* est composée de deux couches fines de muscles lisses : longitudinale externe et circulaire interne.
- La *lamina propria* est un tissu conjonctif fin et réticulé très riche en capillaires sanguins et lymphatiques et en leucocytes.
- L'épithélium monostratifié est composé d'une seule assise d'entérocytes, entre lesquels s'intercalent, en nombre plus restreint, les cellules caliciformes à mucus, les cellules entérochromaffines, les cellules endocrines sécrétrices et les cellules de Paneth exocrines (**Braniste, 2007**).

Tout au long de l'intestin grêle, la muqueuse est formée de trois types de structures qui sont, de la lumière du tube vers la muscularis mucosae : 1) les villosités, 2) les cryptes intestinales et 3) les organes lymphoïdes qui présentent une concentration élevée de lymphocytes.

2.2.2 Les cryptes intestinales

Les cryptes sont des replis invaginés dans le chorion entre les villosités. Ce sont des structures hautement hiérarchisées qui comprennent des cellules souches ainsi qu'une population intermédiaire de cellules déterminées, en croissance rapide et en voie de différenciation. Elles contiennent les glandes de Lieberkühn qui sont des glandes tubuleuses simples droites, serrées dans la partie profonde du chorion, et qui s'ouvrent dans la lumière intestinale entre les villosités. Chez la souris, la crypte de l'intestin émerge vers le 14^{ème} jour postnatal. Les mécanismes par lesquels les domaines embryonnaires intervillus donnent naissance à la crypte postnatale / adulte sont totalement inconnus. Cependant, l'émergence des cryptes coïncide avec la différenciation des cellules de Paneth dans l'intestin .

2.2.3 Les villosités

Les villosités sont des replis de la muqueuse et du tissu conjonctif sous-jacent de l'intestin grêle permettant l'amplification des processus d'absorption par augmentation de la surface intestinale. L'épithélium prismatique simple, ou monostratifié, qui recouvre les villosités, est essentiellement constitué de cellules cylindriques munies d'un plateau strié, les entérocytes, entre lesquelles sont présentes quelques cellules caliciformes.

Chez l'homme les villosités commencent à se former entre le jour 51 et 54 de développement embryonnaire, ce qui correspond au début de la morphogénèse des villosités à E14,5 chez l'embryon de souris (B.S. de Bakker,.,2016 ; K.D. Walton et al., 2012 ; L. Karlsson et al.,2000). Chez les souris, les villosités émergent dans une onde proximale à distale, apparaissant d'abord dans le duodénum et se propageant dans l'iléon en l'espace de 36 h [K.D. Walton et al.,2012), et cette tendance semble être constante dans l'intestin du fœtus humain ^{B.S.} (de Bakker et al 2016),

Les entérocytes

L'épithélium intestinal est majoritairement composé d'entérocytes qui sont spécialisés dans l'assimilation des nutriments et dans l'absorption de l'eau (Middendorp et al., 2014). Les entérocytes sont des cellules polarisées. C'est-à-dire que la distribution des structures cellulaires et des complexes protéiques est asymétrique entre la face apicale, en contact avec la lumière intestinale, et la face basale, orientée vers la lamina propria (Lee et al., 2006). Le pôle apical est recouvert de microvillosités qui sont de fins prolongements cellulaires qui augmentent la surface d'absorption pour les nutriments et forment une structure appelée bordure en brosse des entérocytes. Elle est riche en hydrolases, en canaux et en transporteurs de peptides (Thomson et al., 2003 ; Ubelmann et al., 2013). Elle exprime fortement la sucrase-isomaltase (SI), une enzyme qui hydrolyse l'amidon, le sucrose et l'isomaltose (Thomson et al., 2003 ; Drozdowski et al 2006). Le pôle apical des CEIs est en perpétuel contact avec la flore intestinale et pour se protéger, les CEIs expriment la phosphatase alcaline (Chistiakov et al., 2014 ; Yang et al., 2012). Cette enzyme diminue l'affinité du lipopolysaccharide (LPS) de la paroi bactérienne des bactéries à gram négatif pour son récepteur immunitaire, le *Toll Like Receptor 4* (TLR4), se trouvant à la surface des CEIs. Le LPS est un puissant inducteur de l'immunité innée et des voies pro-inflammatoires (Yang., 2012 ; Lalles ., 2010).

Le pôle basolatéral des entérocytes adhère fermement à la matrice extracellulaire (MEC) *via* les hémidesmosomes (Byron., 2013). Le pôle basolatéral des entérocytes se trouve à proximité des cellules immunitaires résidentes de la lamina propria et soutient la fonction

immunitaire. Des pores dans la membrane basale des entérocytes permettraient l'échantillonnage d'antigènes par les lymphocytes T, les macrophages et les cellules dendritiques (cDs) (Farache et al., 2013 ; McDole ., 2012).

Les cellules caliciformes

Encore appelées cellules à mucus ou «Goblet cells», se situent davantage dans les deux tiers supérieurs des villosités dans l'intestin grêle, et dans le côlon. Ces cellules dispersées entre les entérocytes, renferment des globules de mucines libérées sous forme de mucus à la surface de l'épithélium; lors de cette libération, le mucus s'hydrate fortement, augmente de volume et forme un hydrogel . Elles secrètent également dans le mucus d'autres types de protéines comme des peptides trifoliés (Tripeptides Factor Family -TFF) impliqués dans les liaisons non-covalentes aux mucines (Tomasetto et al., 2000 ; Ruchaud-Sparagano., 2004). Ce mucus forme des couches stratifiées et recouvre toute la surface de l'épithélium ; Il joue un rôle de lubrifiant et de véhicule, peut «engluer» des microorganismes et influencer également l'absorption de certains peptides (Johansson., 2011).

Cellules entéro-endocrines

Les cellules entéroendocrines englobent plusieurs types de cellules localisées dans tout le système gastro-intestinal leur rôle principal est la sécrétion d'hormones en réponse à des stimuli alimentaires (45). Les principales hormones intestinales sont la cholécystokine (CCK), la sécrétine, la somatostatine et le peptide insulino-trope dépendant du glucose (GIP) (Rindi *et al.*, 2004). Les cellules entéroendocrines représentent moins de 1% des cellules épithéliales de l'intestin (Schonhoff *et al.*, 2004).

Il existe une interaction entre le système immunitaire et les cellules entéroendocrines (Worthington JJ., 2015). Par exemple, les cellules entéro-endocrines expriment des TLR et, en conséquence, peuvent libérer des chimiokines et des défensines en réponse à des antigènes bactériens, suggérant que ces cellules jouent un rôle dans le maintien de l'homéostasie intestinale vis à vis la colonisation bactérienne (Palazzo et al 2007 ; Bogunovic et al .,2007). L'interaction avec le microbiote intestinal ne se limite pas à l'expression des TLR par les cellules entéro-endocrines. Il existe plutôt plusieurs mécanismes par lesquels ces cellules coopèrent avec le microbiote (Cani et al PD., 2013). Par exemple, les cellules L sont un sous-ensemble de cellules entéro-endocrines sécrétant les peptides 1 et 2 de type glucagon (GLP-1 et GLP-2) (Gribble., 2016). Les acides gras à chaîne courte (SCFA) dérivés du

microbiote intestinal peuvent activer des récepteurs spécifiques des cellules L, influençant ainsi le métabolisme énergétique et la fonction de barrière intestinale via la sécrétion de GLP-1 et de GLP-2 (49). En conséquence, les cellules entéroendocrines ont une interaction unique avec le microbiote intestinal. De plus, les cellules entéro-endocrines ont également été impliquées dans les MICI. Friedrich et al. (Friedrich et al., 2015) ont constaté que les patients avaient une IL-17c pro-inflammatoire sérique et colique élevée et avaient découvert que les cellules entéroendocrines et, dans une moindre mesure, les cellules caliciformes étaient les principaux producteurs d'IL-17c.

Cellules Tuft

Un quatrième type cellulaire issu du lignage sécrétoire a été caractérisé (Gerbe et al., 2011). Ces cellules appelées cellules Tuft avaient déjà été décrites dans plusieurs organes par leur morphologie particulière présentant une bordure en brosse très développée (Sato., 2007). Ces cellules sont également réparties dans l'intestin grêle et dans le côlon où elles représentent environ 0,4% de la population épithéliale. Leur fonction n'est encore pas connue, on sait cependant qu'elles expriment les enzymes impliquées dans la biosynthèse des prostanoïdes et des β -endorphines, suggérant un rôle dans l'inflammation, la motricité et la douleur digestive (Gerbe et al., 2011) et l'immunité (Harris., 2016). Il a été récemment démontré leur rôle dans les infections parasitaires, ils génèrent des réponses de cellules T auxiliaires de type 2 afin de stimuler l'immunité contre de telles infections (Howitt., 2016 ; von Moltke., 2016).

Cellules de Paneth Chez l'homme, la différenciation des cellules de Paneth a lieu vers la 20^e semaine de gestation. Les cellules Paneth émergent initialement entre la 5^e et la 7^e position de la crypte, puis migrent vers la base de la crypte adjacente aux cellules souches LGR5 + (T.-H. Kim., 2012).

Elles sont caractérisées par la présence de nombreuses granules de sécrétion dans leur cytoplasme et produisent des protéines solubles telles que des facteurs de croissance (TGF α , de l'EGF, du Wnt3 et le ligand de Notch Dll4), des protéines de la matrice extracellulaire et des peptides antimicrobiens (défensine) (C.L. Bevins., 2011 ; Sato et al., 2011). Ces cellules jouent en effet un rôle important dans la réponse immunitaire innée au niveau de l'intestin (Elphick et Mahida., 2005).

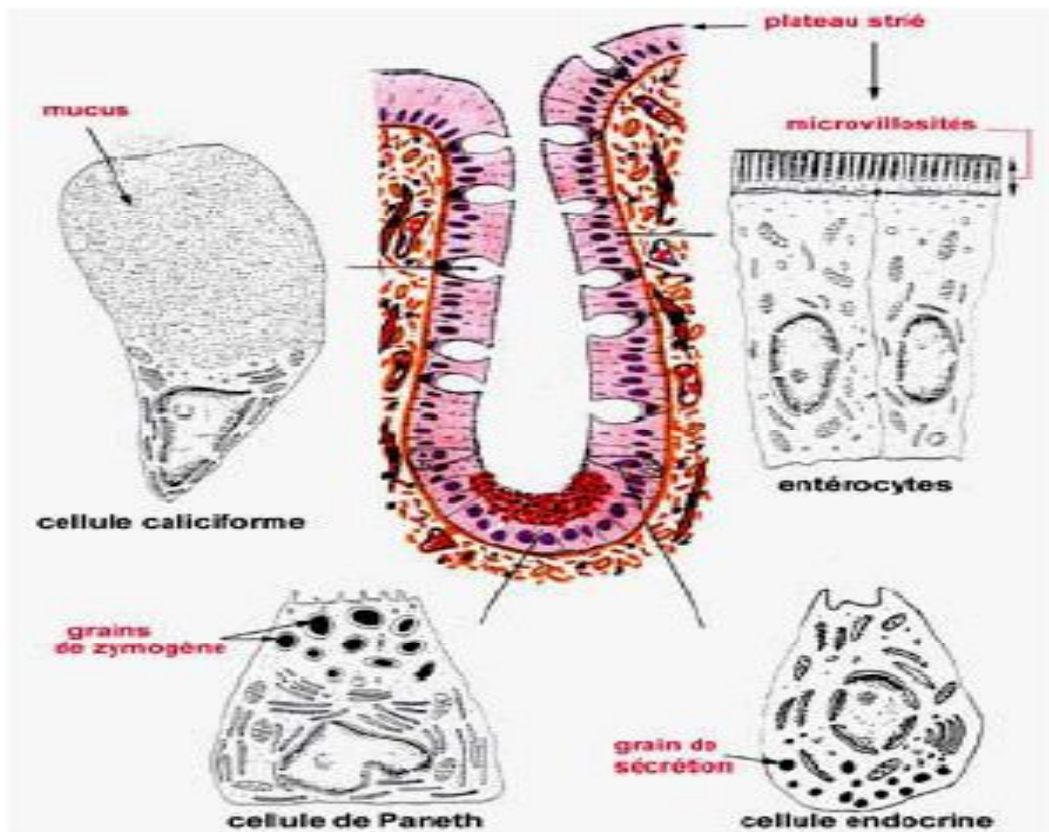


Figure 11. Schéma des différentes cellules retrouvées dans l'intestin grêle. (Vacheret., 2008)

1.1.2.1. Les cellules souches épithéliales intestinales

Chez les mammifères, les cellules souches intestinales assurent l'homéostasie par le renouvellement de l'épithélium intestinal, ainsi l'épithélium est remplacé tous les 2-7 jours (Clevers., 2013a; Crosnier et al., 2006). L'identité exacte des cellules souches intestinales a été controversée depuis ces 30 dernières années et deux modèles sont principalement envisagés (Figure 12). Un premier modèle (« +4 position ») suggère que les cellules souches intestinales sont situées spécifiquement en position +4 au niveau de l'axe cripto-villositaire ce qui implique que le fond des cryptes est exclusivement constitué de cellules de Paneth différenciées (Man et al., 2002). Le deuxième modèle appelé « stem tell zone » suggère que de petites cellules indifférenciées et en division (appelées « crypt base coluninar cens >>) situées entre les cellules de Paneth sont les réelles cellules souches intestinales (Figure 12).

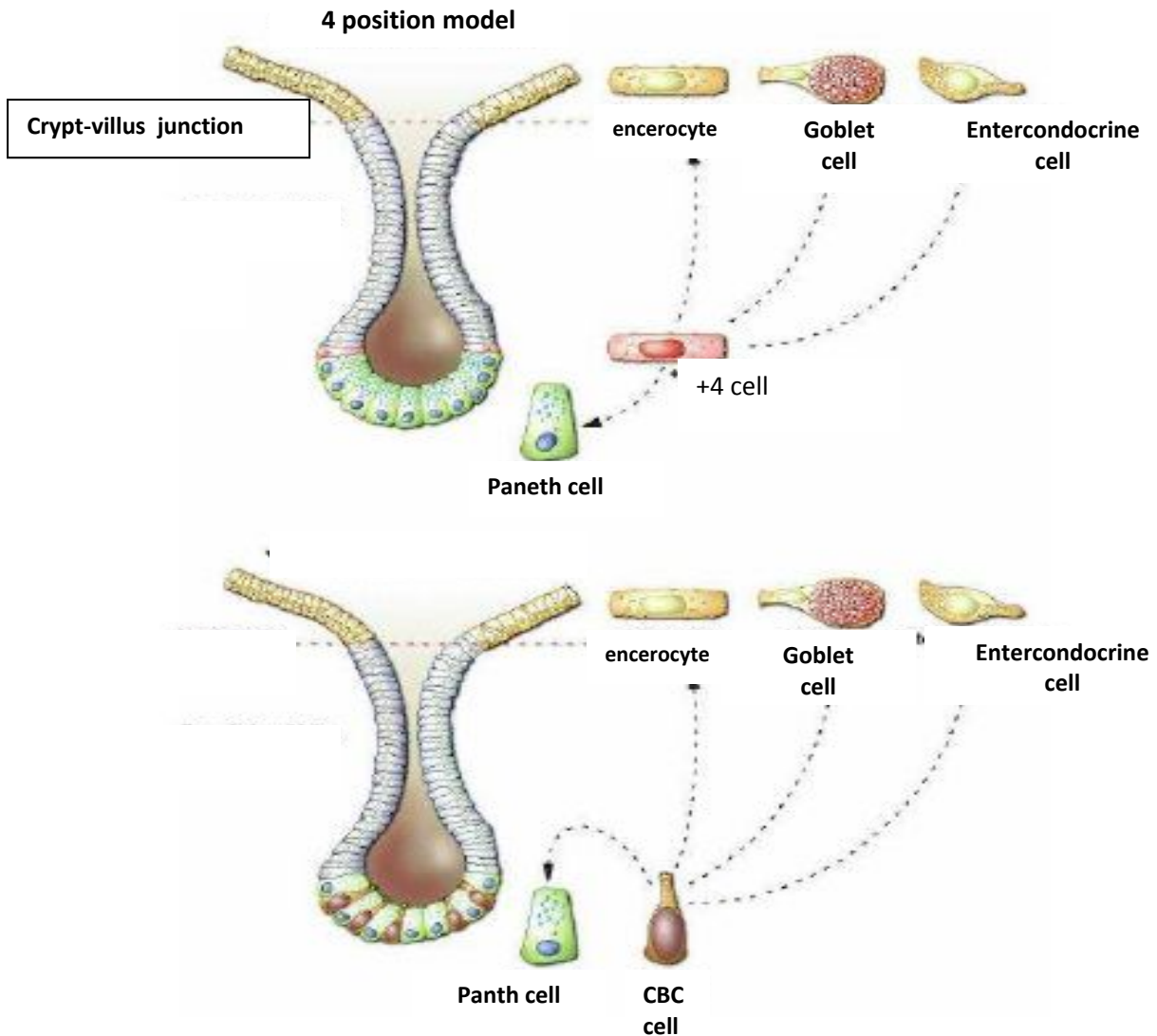


Figure 12: les deux modèles de lieu de résidence des cellules souches de l'intestinales (Barker et al., 2008)

Les cellules souches sont généralement étudiées avec des marqueurs de prolifération tels que Ki67, BrdU. Musashi-1 ou Sox-4. Lgr. gène cible de la voie des `Wnt ou encore l'oncogène Bmi ont été identifiés comme marqueurs des cellules souches intestinales supportant respectivement le modèle de la « stem tell zone » et celui de la position +4 (Barker et al., 2008; Sangiorgi and Capecchi., 2008).

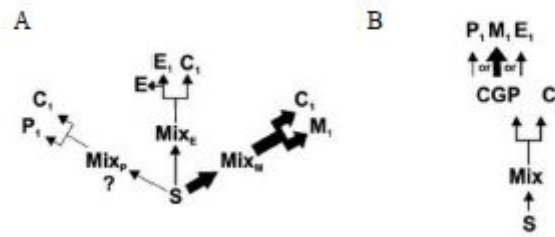


Figure 13: Deux modèles du lignage cellulaire des cellules épithéliales intestinales

Il existe une étape intermédiaire de différenciation entre cellules souches et cellules différenciées spécialisées qui n'est pas complètement décrite (Bjerknes et al., 2006) (figure 13). À chaque division, les cellules souches engendrent des progéniteurs qui s'amplifient, puis se différencient dans les différents types cellulaires de l'épithélium intestinal. Il existe 2 théories concernant ces progéniteurs. A. la première théorie est que les cellules souches (S) donnent 3 sortes de cellules progénitrices bi-potentes (MixE, MixP et MixM) qui se différencieront en entérocytes (C₁ pour Columnar) ou en cellules à activité sécrétoire (Paneth P₁, Endocrine E₁ ou Mucosécrétante M₁). B. La deuxième théorie est que les cellules souches (S) donnent des cellules progénitrices communes à toutes les cellules (mix) qui se différencieront soit 1: en entérocyte (C₁), soit 2/ en une deuxième génération de cellules progénitrices (CGP pour Common Granulocytic Progenitor) communes aux lignées de CEI à activité sécrétoire (Paneth P₁ Endocrine E₁ ou Mucosécrétante M₁). (Bjerknes et al., 2006). (figure 13 B).

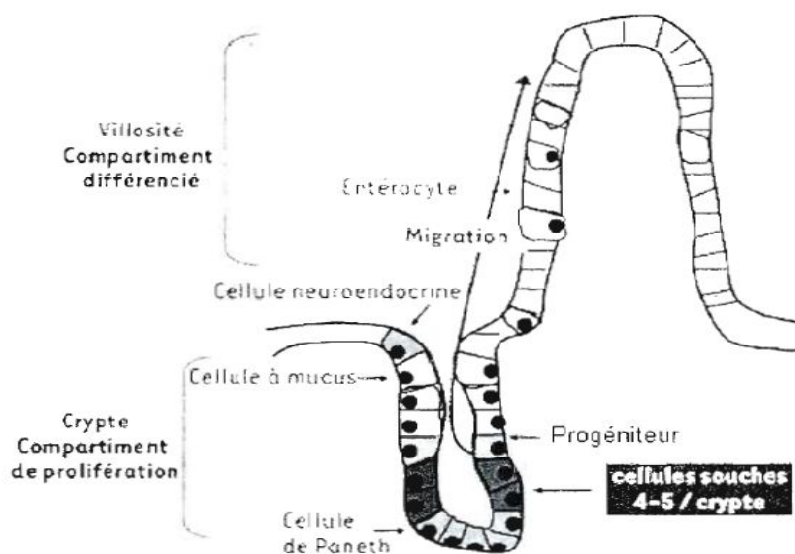


Figure 14 : Organisation des quatre types de cellules différenciées et des cellules souches de cryptes, le long de l'axe crypte-villosité dans l'intestin grêle. (Andreu et al., 2006)

2.4 Programme autonome de développement de l'intestin

Les résultats obtenus chez la drosophile et chez les rongeurs indiquent que le mésenchyme est l'élément inducteur initial de la régionalisation de l'endoderme, puis que l'endoderme ayant subi l'induction du mésenchyme devient le principal détenteur du programme ontogénique de l'intestin. De plus, l'utilisation du modèle des greffes d'associations hétérologues a permis de mettre en évidence le caractère réciproque des interactions épithélio-mésenchymateuses. En effet, outre l'action du mésenchyme sur l'endoderme, l'endoderme délivre des signaux au mésenchyme sous-jacent comme en témoigne l'hétérodifférenciation de fibroblastes fœtaux de

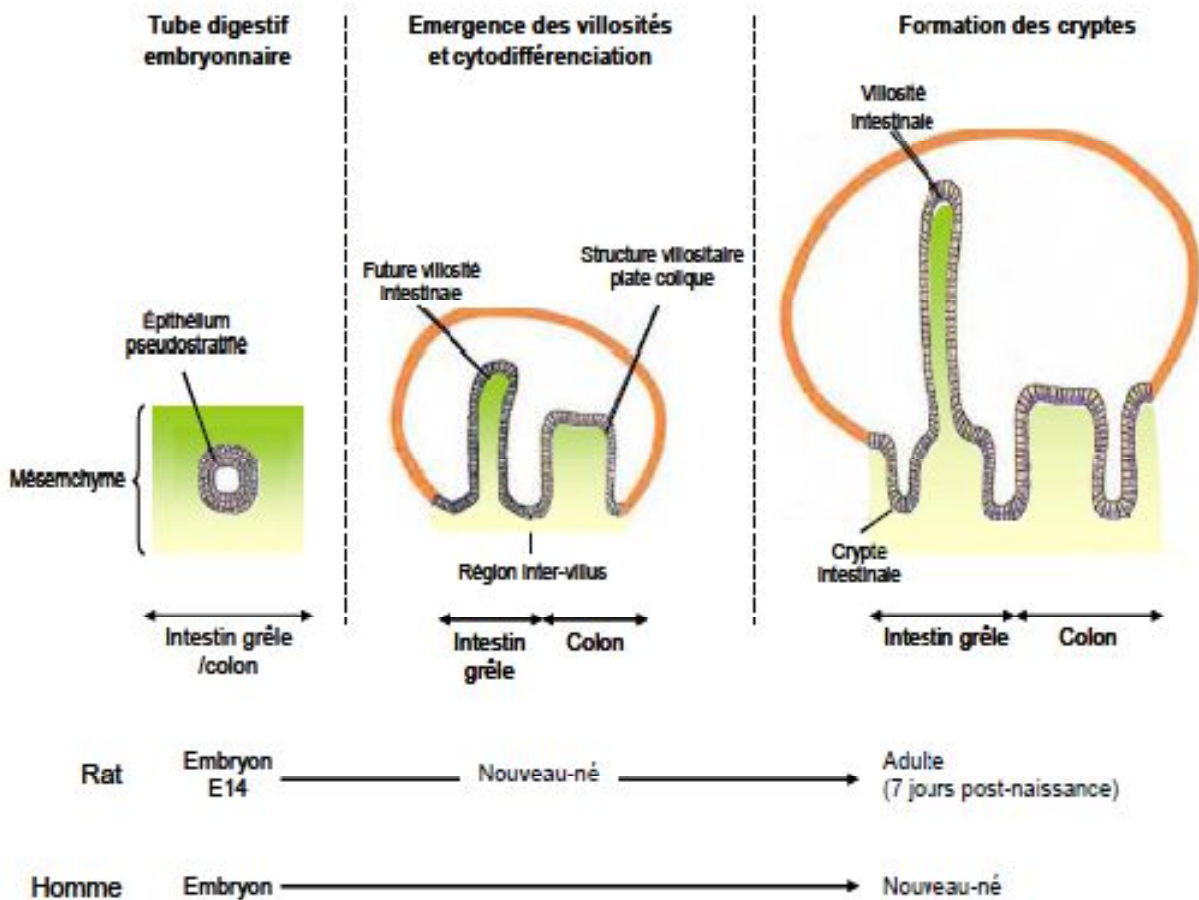


Figure 15 – Développement de l'épithélium intestinal. (De Santa Barbara & al. , Crosnier et al.) .Comparaison du développement embryonnaire et postnatal de l'épithélium intestinal chez le rat et l'Homme. En vert, le mésenchyme prend son origine dans les feuillets du mésoderme. En gris, l'épithélium du tube digestif provient des feuillets de l'endoderme.

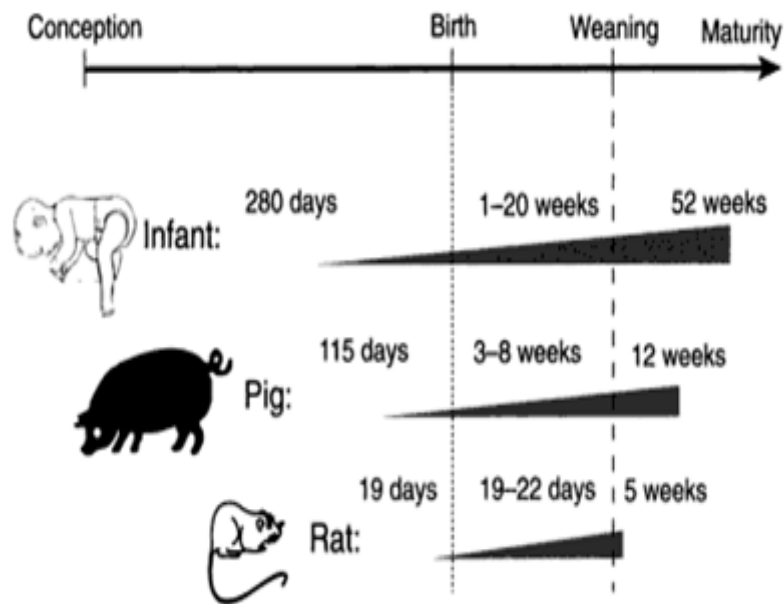


Fig 16 : Maturation intestinale chez trois espèces (le rat, le porc et l'être humain) (Sangild, 2001).

2.6 Perméabilité de l'épithélium intestinal

La fonction première de l'intestin est l'absorption des nutriments issus de l'alimentation pour l'ensemble des cellules du corps humain. La perméabilité intestinale décrit le passage de molécules de tailles diverses au travers de l'épithélium intestinal. L'épithélium intestinal est polarisé avec un pôle apical au contact de la lumière intestinale et un pôle basolatéral coté muqueux. Cette polarité est maintenue grâce aux nombreuses jonctions intercellulaires permettant le passage des molécules d'intérêt et limitant celui des microorganismes. On distingue trois types de jonctions intercellulaires en partant du pôle apical vers le pôle basal: les jonctions serrées, les jonctions adhérentes (constituées principalement par les cadhérines) et les desmosomes. Il existe également les jonctions gap ou communicantes, structure composée de canaux intercellulaires regroupés en plaque, qui permettent la circulation du cytoplasme entre deux cellules.

Deux voies de passages des composés luminaux à travers l'épithélium intestinal sont décrites: une voie paracellulaire et une voie transcellulaire.

2.6.1. La voie paracellulaire

Les jonctions serrées sont des structures dynamiques qui assurent la régulation de la perméabilité paracellulaire (entre les cellules) (Turner et al., 2000) et la détermination de la taille des pores permettant le passage des molécules (Li et al., 2011). Ce complexe jonctionnel est constitué de protéines transmembranaires (occludine, claudine et JAM pour

junctional adhesion molecule) reliées à des protéines intracellulaires (ZO pour *zonula occludens*) qui sont rattachées à l'actine, composant du cytosquelette de la cellule (figure 17).

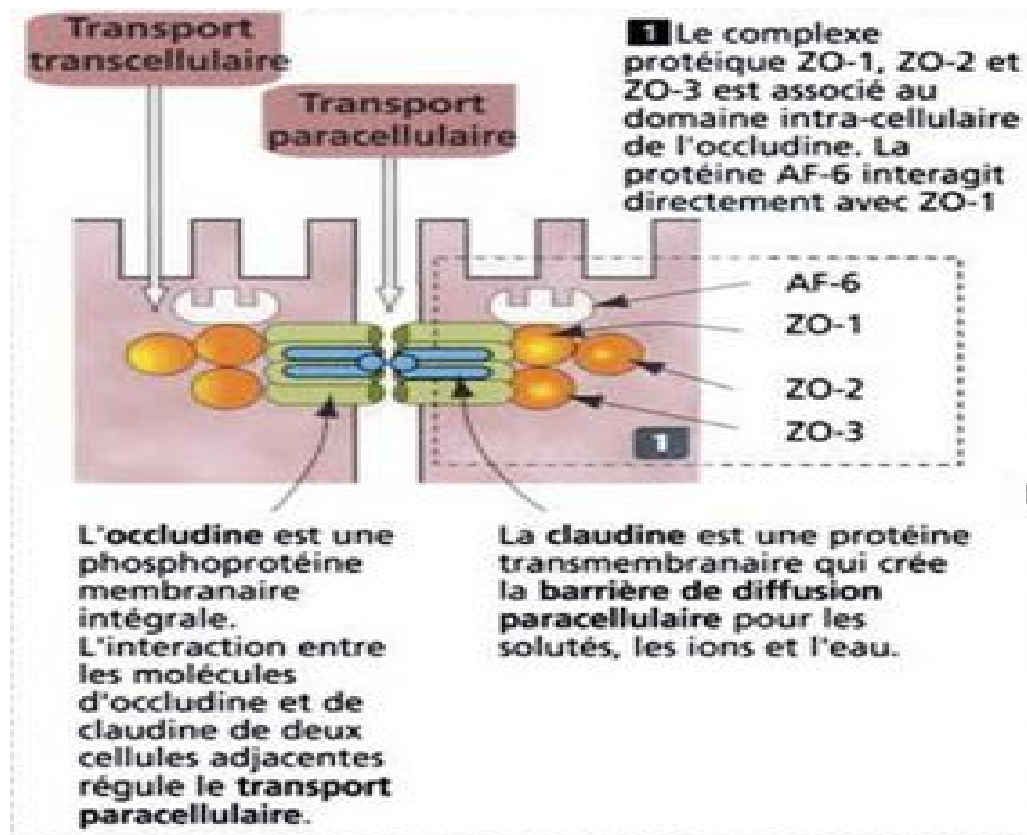


Figure 17 : Perméabilité intestinale par la voie paracellulaire et structures associées

Les claudines (Figure 17 a) représentent une famille protéique de 27 membres (Mineta *et al.*, 2011). Elles sont composées de quatre domaines transmembranaires qui forment deux boucles extracellulaires et deux domaines terminaux cytoplasmiques N-terminal et carboxy-terminal. Ce dernier possède les résidus sérine/thréonine sur lesquels peuvent avoir lieu des phosphorylations, ainsi que des motifs permettant la liaison aux protéines cytoplasmiques, telles que la ZO (Hu *et al.*, 2013). Les fonctions des claudines sont diverses. Certaines renforcent la barrière physique de l'épithélium alors que d'autres sont responsables de la formation des pores conférant une perméabilité sélective aux cations de petites tailles. Ainsi, la claudine-2 constitue des pores laissant passer les cations alors que la claudine-16 ne laisse passer que les ions Mg^{2+} (Gonzalez-Mariscal *et al.*, 2008).

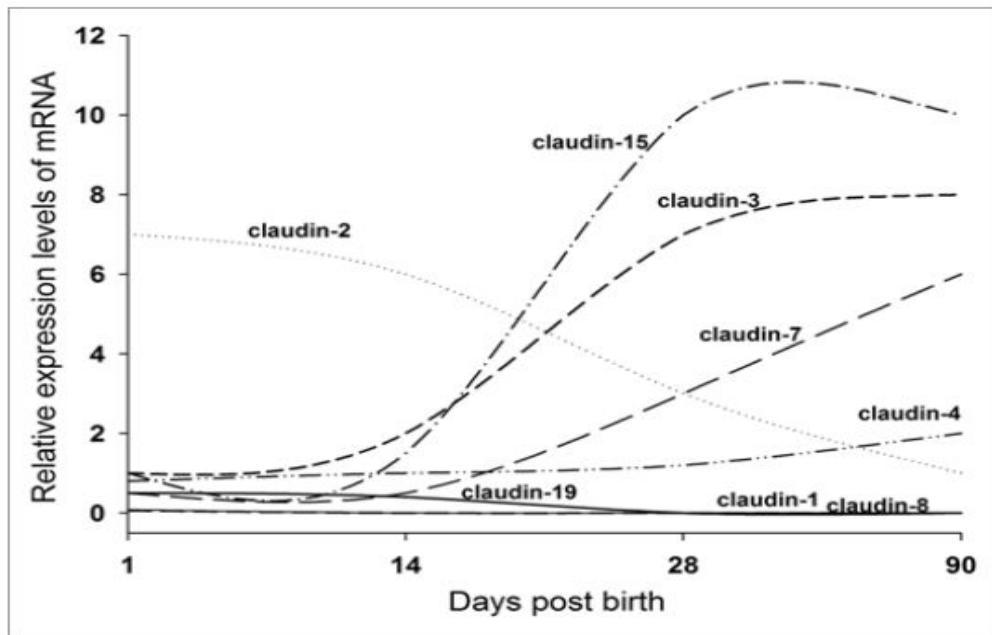


Fig 18 : Maturation de l'expression des claudines

L'occludine est une protéine transmembranaire constituée de quatre sous unités, et deux boucles extracellulaires. Ses extrémités C- et N-terminales sont cytosoliques (**Bazzoni et al., 2004**). L'occludine interagit avec quatre protéines principales :ZO-1 ZO-2 ZO-3 et AF-6.

Bien que l'absence d'occludine dans les jonctions serrées soit rare, sa fonction physiologique dans les jonctions serrées reste encore peu connue. Cependant, il a été suggéré un rôle de l'occludine dans la signalisation cellulaire. En effet, l'occludine pourrait également agir dans la régulation de divers événements de signalisation, notamment avec Raf-1 (**Li et al., 2000; Wang et al., 2005**). De plus, l'occludine peut être impliquée dans l'activation de RhoA (Ras homolog gene family member A) par GEF-H1/Lfc, un facteur d'échange de nucléotide guanine associé aux jonctions serrées (**Aijaz et al., 2006; Benais-Pont et al., 2003**). L'occludine pourrait également jouer un rôle important dans la localisation des récepteurs du TGF (Transforming Growth Factor) aux jonctions serrées (**Barrios-Rodiles et al., 2005**).

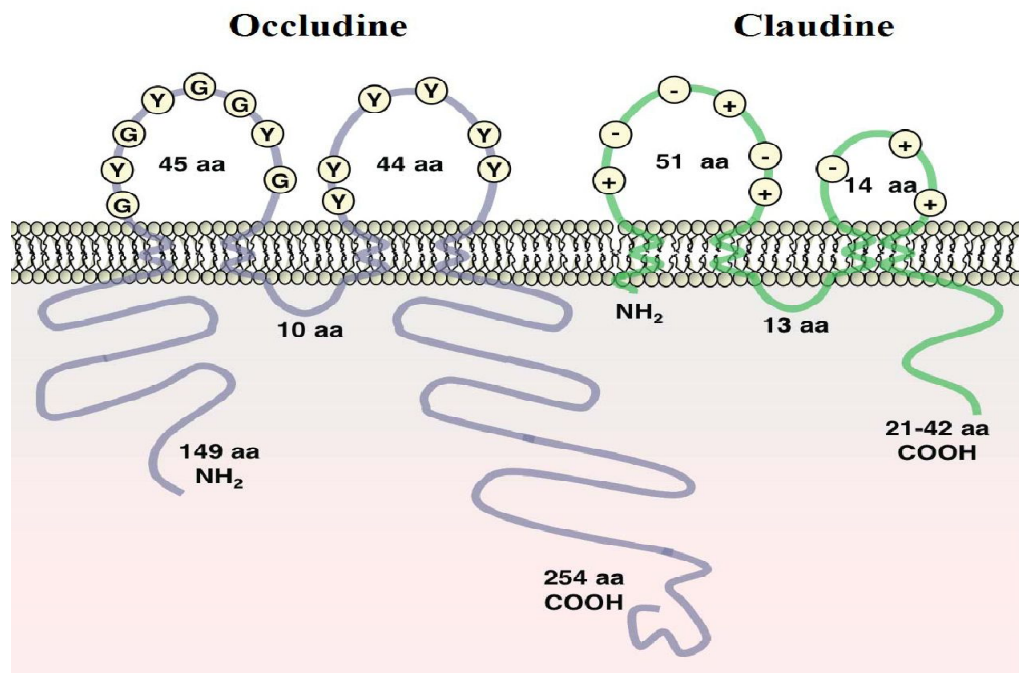


Figure 19: Représentation schématique de l'occludine et de la claudine.
(Gonzalez-Mariscal et al., 2003).

Les boucles extracellulaires de l'occludine sont approximativement de la même taille: elles ne possèdent pas de résidus chargés et sont très riches en tyrosine (Y). Plus de la moitié des résidus de la première boucle sont des tyrosines et glycines (G). Quant aux claudines, la première boucle extracellulaire est plus longue que la deuxième. Les deux boucles des claudines démontrent des résidus chargés qui pourraient influencer le passage des ions à travers l'espace paracellulaire.

Les JAM sont une superfamille d'immunoglobulines transmembranaire, constituée de 5 membres : JAM-A, JAM-B, JAM-C, JAM-4 et JAM-like. La JAM-A, qui est la protéine majoritaire, est constituée d'un peptide signal N-terminal, de deux domaines *Ig-like* extracellulaires, d'un domaine unique intra-membranaire et d'une courte queue cytoplasmique (40 acides aminés). Elle joue un rôle fondamental dans le maintien de l'intégrité de la barrière en contrôlant la perméabilité intestinale *via* des interactions avec les autres membres de cette superfamille ou aux autres complexes formés par les OCLN et les claudines mais également à la protéine adaptatrice ZO-1 (Laukoetter et al., 2007 ; Severson et al., 2008 ; Nava et al., 2011 ; Monteiro et al., 2013).

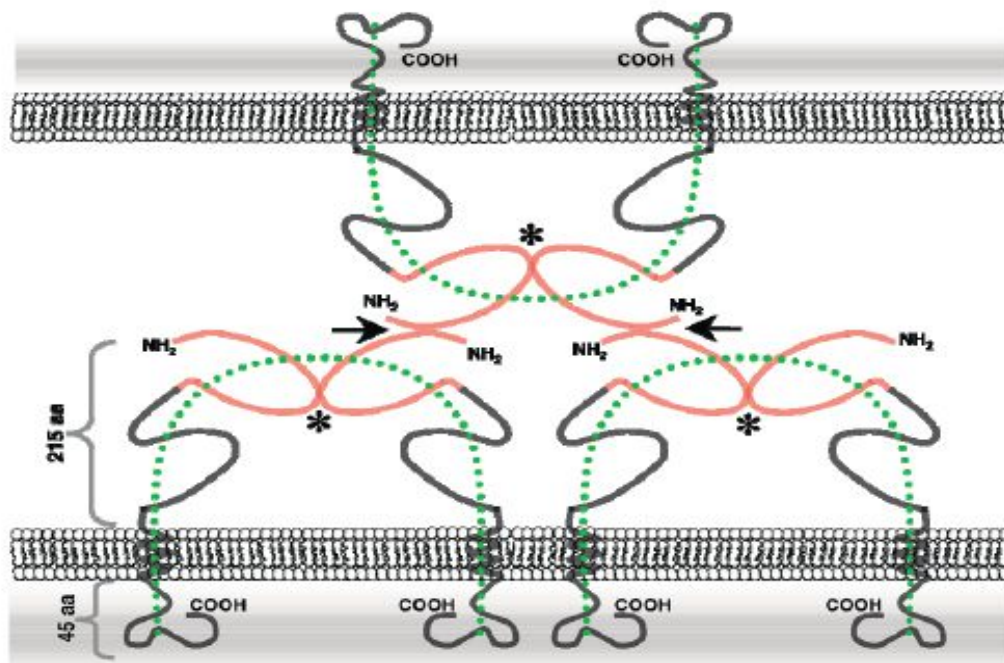


Figure 20: Représentation schématique de protéines JAM (Gonzalez-Mariscal et al., 2003)

L'ensemble de ces jonctions permet donc la mise en place d'une perméabilité paracellulaire intestinale sélective entre les cellules de l'épithélium intestinal. En conditions physiologiques, le diamètre des molécules capables de traverser l'épithélium intestinal par voie paracellulaire est compris entre 4 et 9 Å dans les villosités et de 50 à 60 Å dans les cryptes (**Sjoqvist et al., 2000**). Le passage par la voie paracellulaire permet le passage des ions et des molécules hydrophiles jusqu'à un poids moléculaire de 600 Da (**Rowland et al., 2001**). Cette voie est utilisée par les petites molécules qui ne peuvent traverser la membrane plasmique hydrophobe de manière passive. La voie paracellulaire est déterminée non seulement par la taille des pores formés par les protéines de jonctions mais aussi par les mouvements d'eau par voie transcellulaire conduisant à un gradient osmotique. Un défaut ou une perte de certaines protéines de jonctions permettrait le passage de molécules avec un poids moléculaire supérieur entre les cellules de l'épithélium.

Le cytosquelette est décrit comme un acteur important dans le maintien structural de la monocouche des cellules épithéliales. Il se compose de deux types de protéines : l'alpha intégrine qui se polymérise en microtubules et l'actine qui forme des filaments d'actine.

Les microtubules jouent un rôle important dans le maintien de l'intégrité cellulaire, l'orientation du transport et de la sécrétion intracellulaire et dans la coordination des

mouvements des organelles. Les filaments d'actine s'associent avec la chaîne légère de myosine (MLC) et d'autres protéines pour former un anneau périjonctionnel d'actino-myosine (Turner., 2000). Celui-ci interagit avec les jonctions adhérentes et les jonctions serrées telles que la claudine et l'occludine (Turner., 2009).

La perméabilité para-cellulaire peut être régulée directement au niveau des protéines de ces jonctions ou indirectement *via* le cytosquelette (Shen *et al.* , 2011). Un mécanisme central de cette régulation est la kinase MLCK (*myosin light chain kinase*). Elle module les interactions entre le cytosquelette et les protéines des jonctions serrées au niveau de la liaison actine- ZO-1, conduisant à l'augmentation de la perméabilité. Mais d'autres voies de régulation peuvent conduire à la disruption des jonctions serrées et à l'augmentation de la perméabilité.

2.6.2 La voie transcellulaire

Elle est décrite comme étant le passage de molécules avec un poids moléculaire supérieur à 600 Da au travers des cellules épithéliales. Les composés lipophiles ont la capacité de diffuser au travers de la membrane plasmique et empruntent ainsi majoritairement la voie transcellulaire. En plus de cette diffusion passive, il existe des transports actifs faisant intervenir des transporteurs spécifiques comme pour les acides aminés ou le glucose. D'autres substances peuvent être transportées au sein de l'épithélium puis redirigées vers le côté luminal *via* des protéines d'efflux actifs, telles les P-gp qui permettent l'excrétion de xénobiotiques toxiques et de leurs métabolites (Konig *et al.*, 2013).

Au sein du passage transcellulaire, il a été décrit une voie qui implique les mécanismes d'endocytose/exocytose médiés ou non par des récepteurs membranaires. Il s'agit pour les cellules épithéliales d'absorber les antigènes alimentaires pour les adresser vers deux voies différentes : **a**) par la voie endosomale où l'antigène est redirigé vers la lamina propria, **b**) l'antigène partiellement dégradé est chargé en molécules de CMH de classe II pour être dirigé par exocytose vers la lamina propria, où l'interaction avec les cellules de l'immunité (cellules dendritiques) est favorisée (Raposo *et al.*, 1996). Le transport de grosses molécules comprend également celui des microorganismes dont le site majeur d'absorption est attribué aux cellules « M » et aux follicules lymphoïdes isolés. Les cellules dendritiques peuvent aussi directement échantillonner les bactéries dans la lumière intestinale, en projetant des extensions dendritiques entre les cellules (Rescigno *et al.*, 2001)

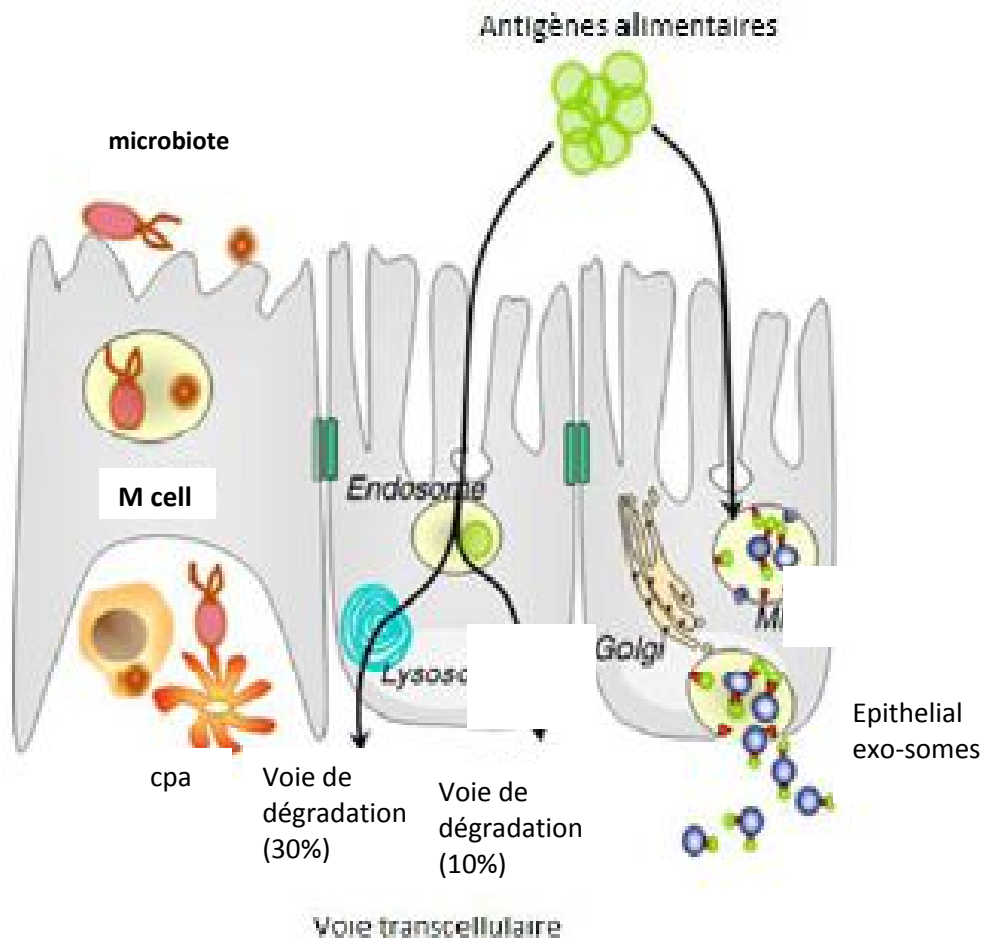


Figure 21: Perméabilité intestinale par la voie transcellulaire (Menard et al., 2010)

2.6.3 Maturation des complexes de jonctions serrées :

Les modèles rongeurs contribuent largement à l'acquisition de connaissances sur le développement de la barrière épithéliale, tout particulièrement sur la régulation de sa perméabilité. Il a été notamment décrit le profil d'évolution périnatale de protéines de jonctions serrées impliquées dans la régulation de la voie paracellulaire (Moussaoui, 2015). Chez la souris, le profil d'expression de l'occludine, des claudines, de la JAM et de la ZO-1 a été caractérisé par qRT-PCR (Quantitative real-time PCR) et la localisation des protéines par la technique d'immunohistochimie au sein du tractus intestinal en cours de développement (Holmes et al., 2006). Les résultats obtenus indiquent que seule l'expression et la localisation des protéines de la famille des claudines sont fortement modifiées de la naissance à l'âge adulte. L'expression de la claudine 1, 2 et 8 diminue au cours de la période postnatale alors que celle des claudines 3, 7 et 8 augmente (Holmes et al., 2006; Patel et al., 2012). Le profil d'expression de ces protéines dépend aussi du segment intestinal (celui de la claudine-8 augmente progressivement à partir de l'intestin grêle jusqu'au côlon tandis que celui de la claudine-15 diminue le long du même axe (Holmes et al., 2006).

Les fortes différences d'expression observées se situent entre le 14ème et le 28ème jour, période qui coïncide avec le sevrage.

Tableau 9. Expression des claudines dans l'intestin des mammifères

Segment intestinal	Expression des claudines chez l'homme	References	Expression des claudines (sourie)	references
duodenum	1, 2, 3, 4, 5, 7, 12, 15,	Lameris.,2013 Sapone., 2011 Szakál., 2010	2, 3, 7, 15	Holmes., 2006 Lei., 2012
jejunum	Not determined	Lameris 2013	2, 3, 7, 12, 15	Holmes., 2006 Fujita., 2006 Wada., 2012 Lei.,2012
ileum	2, 7, 8, 12, 15	Lameris 2013	1, 2, 3, 4, 7, 8, 12, 15	Holmes., 2006 Wang.,2012 Escaffit., 2005
Large intestine	1, 3, 4, 7, 8, 12, 15	Lameris., 2013, BertiauxVanda èle.,2011 Yang., 2011, Oshima.,2008	1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 12, 13, 15	Holmes., 2006 Lei., 2012 Lin.,2012 Vetrano., 2011 Lu., 2011 Xia., 2011 Wang., 2012

L'étude de Patel et al. en 2012 a permis de décrire l'évolution de la perméabilité intestinale à la macromolécule de Dextran 4 KDa en période postnatale chez la souris (**Patel et al., 2012**). Le niveau de perméabilité est stable durant les deux premières semaines de vie puis diminue brutalement au cours de la troisième semaine pour évoluer vers une diminution plus progressive à la 4ème semaine et à l'âge adulte (*Figure 22*).

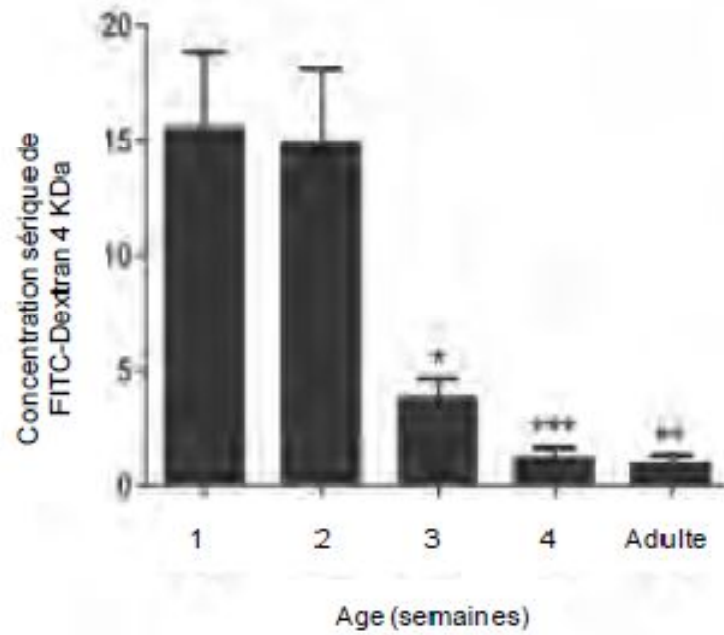


Figure 22 : Perméabilité intestinale au Dextran 4 KDa durant les huit premières semaines de vie chez la souris. (Patel *et al.*, 2012)

2.7 Méthodes d'évaluation de la perméabilité intestinale

La perméabilité paracellulaire peut être établie par la mesure de la résistance transépithéliale ou par l'évaluation du passage de molécules marquées du pôle muqueux au pôle séreux. Ces deux techniques sont complémentaires.

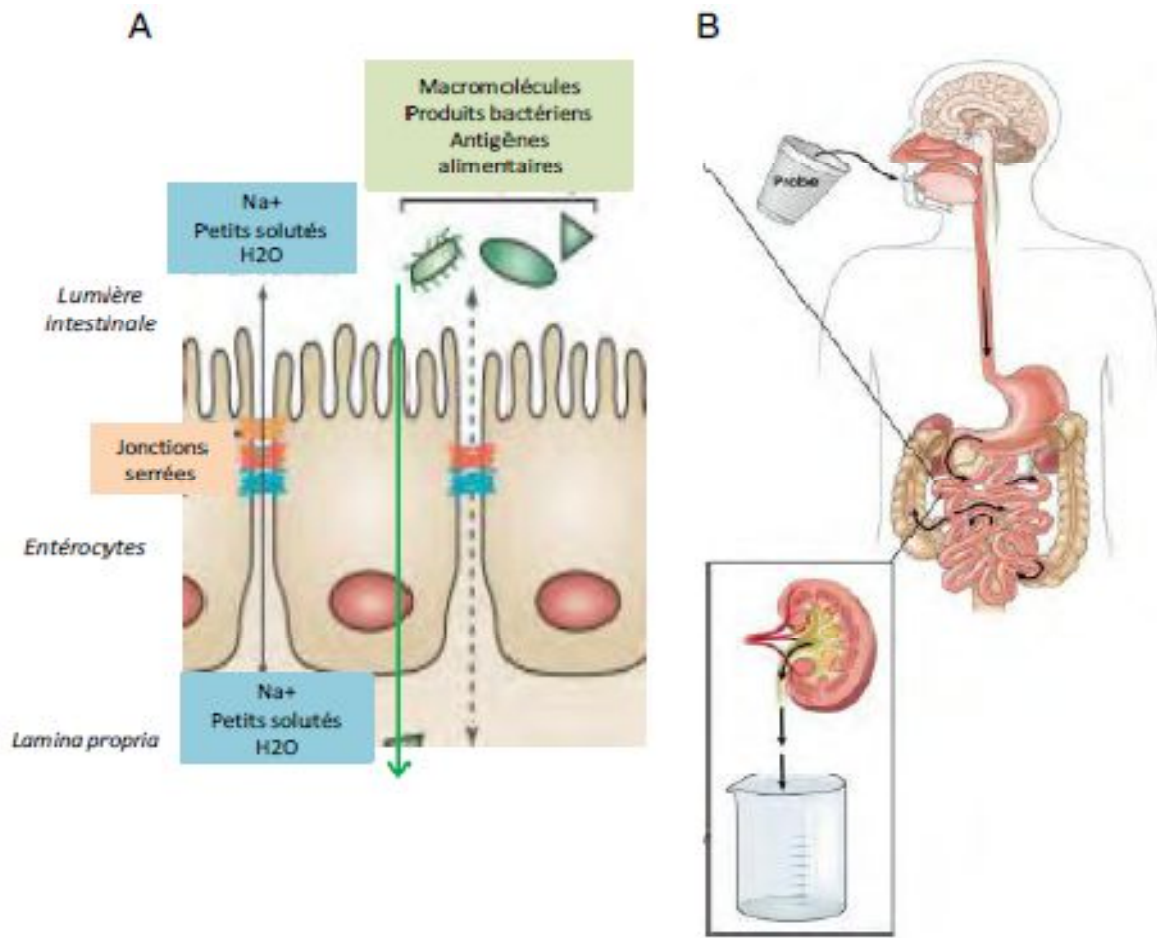


Figure 23 : Méthode d'analyse de la perméabilité intestinale chez l'homme.

A L'épithélium intestinal fournit une barrière efficace aux macromolécules, aux produits bactériens et antigènes (Ag) alimentaires, mais un petit pourcentage peut traverser les jonctions serrées (flèche en pointillé). Les molécules de haut poids moléculaire et les bactéries empruntent préférentiellement la voie transcellulaire (flèche verte).

B La perméabilité intestinale est le plus souvent estimée chez l'homme par la mesure de l'excrétion urinaire de marqueurs ingérés par voie orale (Turner., 2009 ; Odenwald et Turner ; 2013).

La mesure de la résistance transépithéliale (TER) permet de détecter rapidement et continuellement la perméabilité transépithéliale. La TER résulte de la résistance de la voie transcellulaire corrélée aux résistances de la voie paracellulaire. La résistance transcellulaire est représentée par des résistances en série de la membrane apicale et basolatérale. La résistance paracellulaire est constituée de la résistance au niveau du complexe apical (jonctions serrées) et la résistance de l'espace intercellulaire. Cette dernière étant très faible, est souvent négligée. Tenant compte que les résistances au niveau des membranes sont très élevées, c'est la variation des résistances au niveau des jonctions serrées qui détermine si l'épithélium est lâche ou non. Un épithélium lâche est caractérisé par une TER d'approximativement $100 \Omega \cdot \text{cm}^2$, et un épithélium serré possède une TER supérieure à $100\,000 \Omega \cdot \text{cm}^2$.

La TER varie tout au long du tractus gastro-intestinal, en étant plus faible au niveau de l'intestin grêle, élevée au niveau du côlon et l'antré gastrique et très haute au niveau de l'oesophage et du fundus gastrique. La barrière intestinale au niveau du grêle est lâche pour assurer le transport bidirectionnel des fluides. Par contre au niveau du côlon la TER est élevée pour permettre un passage sélectif de certains électrolytes et d'eau, tout en empêchant le passage accru des antigènes bactériens et toxines. Le désavantage de cette technique est qu'elle fournit des informations seulement concernant le passage des particules chargées et ne peut être utilisée pour des mesures *in vivo*.

La deuxième méthode consiste à suivre la perméabilité à des macromolécules, capables essentiellement d'un passage paracellulaire. La mesure *in vivo* consiste à administrer des substances non métabolisables de masse moléculaire différente comme le lactulose et le mannitol grâce à une surcharge orale. La quantification par chromatographie de gaz, du pourcentage d'élimination des deux substances dans les urines donne des informations sur le pourcentage d'absorption. Le bon choix du marqueur est un facteur très important à prendre en compte. Les marqueurs classiquement utilisés sont divisés en trois groupes :

- les sucres – mannitol, rhamnose, lactulose, cellobiose, inuline
- les isotopes – ⁵¹Cr-EDTA, dextran-FITC (fluoro-isothiocyanate)
- polyéthylène glycols (PEG- 400 et PEG -1000)

Les polyéthylène-glycols et les isotopes ne sont ni métabolisés ni produits par l'organisme.

Le désavantage des sucres est qu'ils sont dégradés par les bactéries au niveau de l'intestin et induisent la libération endogène de créatinine.

L'évaluation de la perméabilité intestinale est effectuée de manière indirecte par le dosage du marqueur dans les urines collectées pendant 6 ou 24 heures après l'ingestion.

Le mannitol est un monosaccharide (182.17 Da) dont la voie de passage préférentielle à travers la BEI est le transport transcellulaire, par diffusion passive à travers la membrane plasmique des entérocytes . Le lactulose est un disaccharide qui est très faiblement absorbé en conditions physiologiques. Son transport à travers la BEI s'effectue par la voie paracellulaire et est donc limité par les jonctions serrées. Ces deux sucres, non métabolisés par l'organisme, atteignent la circulation sanguine et sont excrétés intacts dans les urines et dosés par chromatographie en phase gazeuse.

Chez l'animal de laboratoire, le dosage du marqueur (ex. dextran-FITC) peut être effectué après 4 heures dans le plasma (Giannone et al., 2006; Laukoetter et al., 2007).

Mesure *in vitro*

b)- Les sacs intestinaux éversés :

Cette technique a été mise au point par WILSON et WISEMAN en 1954, sur des rats et des hamsters, pour l'étude du transport de sucres et d'acides aminés de la muqueuse à la surface de la séreuse. L'intestin de l'animal prélevé puis retourné sous forme de sacs, plongés dans un milieu salin avec les molécules à étudier (transport des molécules, paramètres cinétiques). L'oxygénation du milieu permet d'augmenter la viabilité du tissu au-delà de 2h. L'avantage de cette technique est de permettre l'étude des mécanismes d'absorption de molécules qui sont réalisés par des transports actifs ou des diffusions passives. En plus c'est une méthode simple et rapide, mais elle présente quelques inconvénients, comme l'absence de vascularisation et d'innervation, l'éversion du tissu intestinal qui peut provoquer des lésions morphologiques.

c)- Un modèle de tissus isolés : La chambre de Ussing

La chambre d'Ussing (Figure 24) est une méthode qui évalue le transport intestinal des électrolytes, nutriment et des molécules. Elle a été développée par Hans Ussing qui étudiait le transport actif du chlorure de sodium (Clarke., 2009). Le principe de la méthode consiste à placer un morceau de tissu intestinal entre 2 demi-chambres de manière à délimiter 2 compartiments. Le compartiment muqueux, en contact avec la bordure en brosse des cellules épithéliales et d'autre part le compartiment basolatéral ou séreux, en contact avec la couche musculaire du tissu basolatérale strippé. L'ensemble de la chambre de Ussing est alimenté par un fluide biologique tamponné à 7,4 (Ringer Bicarbonate Krebs). Un mélange de gaz constitué à 95% d'oxygène et 5% de gaz carbonique barbote le milieu tamponné. La viabilité du tissu intestinal monté est objectivée par la prise de son potentiel électrique grâce à des électrodes au Calomel. Ce potentiel peut varier entre -2 et 20 mV (Clarke., 2009).

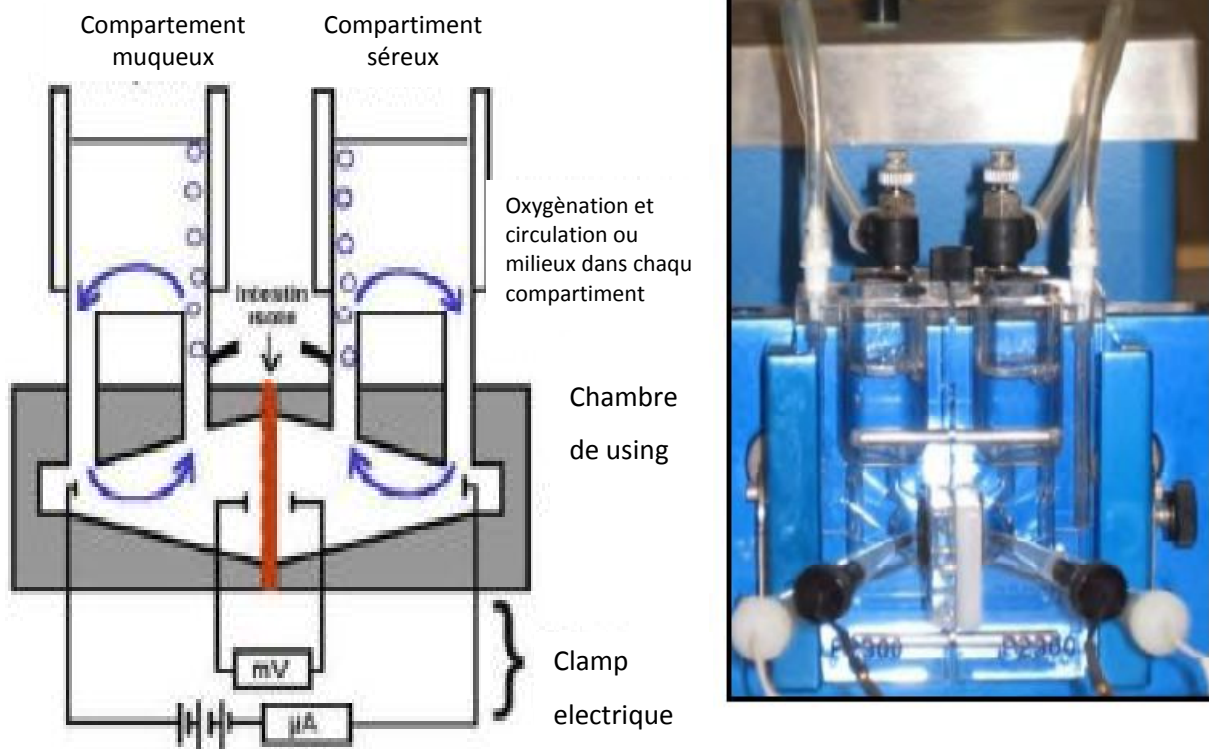
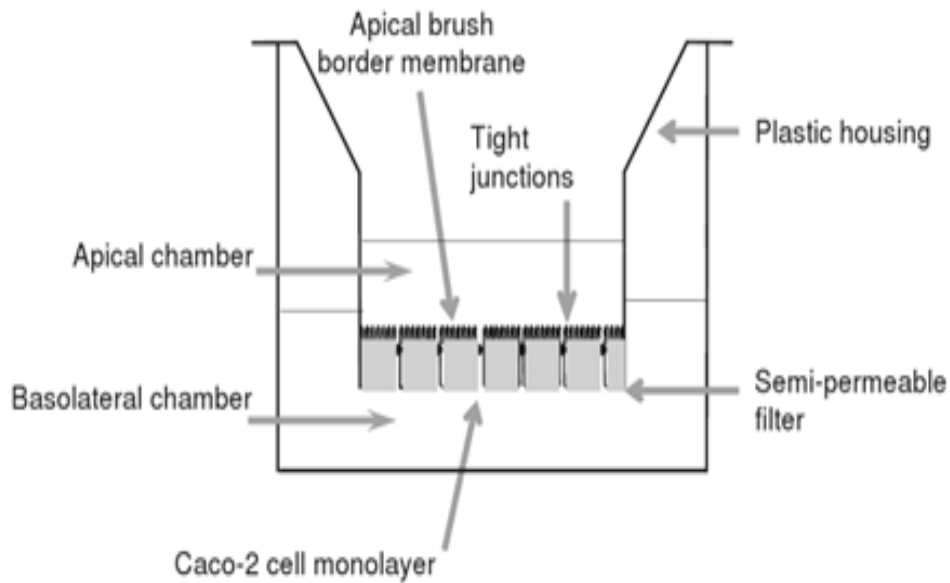


Figure 24 : Montage en chambre de Ussing

Le modèle cellulaire Caco2

Cette ligné cellulaire a été établie en 1974 (Fogh et al., 1977). Elle provient de cellules cancéreuses de colon humain. En 1983 Pinto démontre que cette lignée possède un potentiel de différenciation de type entérocytaire. Les cellules en culture se différencient pour former un épithélium mimant la barrière intestinale. Elles expriment alors les caractéristiques morphologiques et fonctionnelles de l'épithélium intestinal (microvillosités, jonctions serrées, enzymes spécifiques...). En général, les cellules sont cultivées sur un support poreux, habituellement pendant une période de 15 à 21 jours dans un milieu Eagle modifié de Dulbecco additionné de 20% de sérum de veau foetal, 1% d'acides aminés non essentiels et 2 mM de L-glutamine. Les cellules sont cultivées dans une étuve à 37°C en présence de 10% de dioxyde de carbone et d'une humidité relative de 95%. Le milieu de culture est changé au deux jours. L'étude de transport est réalisée lorsque les cellules sont à confluence en modifiant le milieu de culture par une solution saline balancée de Hanks ajustée à un pH de 6,5 du côté apical et de 7,4 du côté basolatéral.



**Fig 25 : Diagramme d'une monocouche de cellules Caco-2 cultivées sur un filtre
(Neidele., 2011)**

-Patch-clamp - permet de détecter les courants ioniques traversant un canal individuel.

L'hyperperméabilité

L'hyper perméabilité intestinale est retrouvée dans toutes les pathologies suivantes, même si ce n'est pas le seul mécanisme en jeu car ce sont le plus souvent des pathologies multifactorielles, mais il doit absolument être pris en considération :

Maladie inflammatoire de l'intestin, maladie alcoolique du foie, syndrome de l'intestin irritable.

La cirrhose hépatique, l'insuffisance rénale chronique

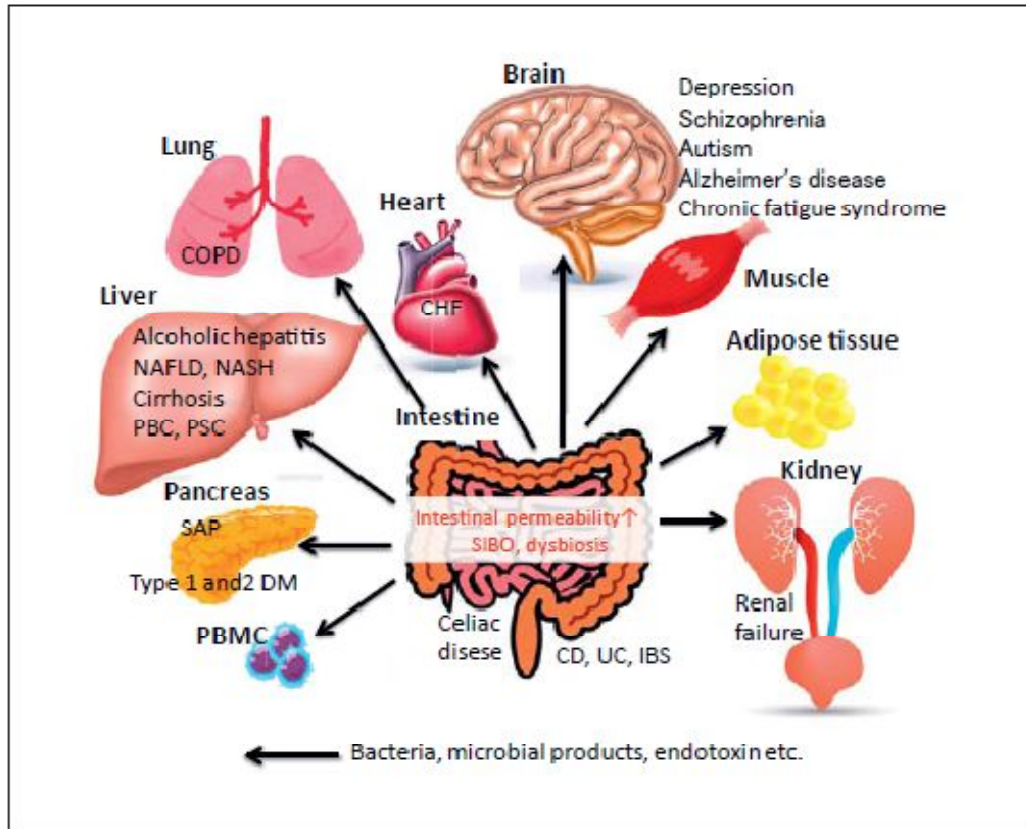


Fig 26 : Les principales maladies entraînant une hyperperméabilité intestinale

Tableau 10: (Hiroshi Fukui., 2016)

Maladie	Test de perméabilité	Changements épithéliales	Inflammation dans les organes
IBD	IP↑ in CD (L/M test) IP↑ in CD (active > inactive) (L/M test) IP↑ in inactive UC (L/M test) IP↑ in 50% CD and 31% UC	Expression de PrP(c) ↓ au niveau de l'épithélium colique (CD and UC patients)	LBP et sCD14 sérique↑ corrélié Avec disease activity et cytokines proinflammatoires
maladie alcoolique du foie	IP ↑ (51Cr-EDTA test) L'hyperperméabilité est associée A une dysbiose (51Cr-EDTA test) IP ↑ ↑ (L/M test)	ZO-1 et occludin dans le duodenum ↓	IL-8 sérique↑, granulocytose Corrélie à une endotoxemie Hepatite alcoolique TNF-α sérique↑ corrélie avec endotoxemie dans la cirrose alcoolique
IBS	IP ↑ particulièrement chez les PI-IBS et D-IBS IP ↑ associée à IBS	expression ZO-1 ↓ corrélie avec IP paracellulaire augmentée[17] expression ZO-1 et	TNF-α, IL-1β, IL-6 sérique↑ Notament in D-IBS LPS-induced TNF-α production

	interférence avec le travail, anxiété et dépression (L/M test)	occludine ↓	
La cirrhose hépatique	IP ↑ (L/M test, 51Cr-EDTA test, PEG test)	Occludin et claudin-1 ↓ dans le duodenum corrélié négativement avec taux d'endotoxine sérique	TNF, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8 et IFN-γ ↑ particulièrement chez ceux avec massive ascites
NAFLD	IP ↑ (51Cr-EDTA test) IP ↑ (L/M test) chez les enfants steatohepatite	ZO-1 dans les villosités ↓ Nuclear ZO-1 dans les crypt cell ↓ corréliée avec IP	expression de la protéine TLR4 dans le foie ↑ in NASH [23] TLR4 mRNA et TNF-α sérique ↑ in NAFLD TLR4 mRNA ↑ (NASH > NAFL)
Obstructive jaundice	IP ↑ (L/M test) IP ↑ (PEG test)	Occludin, claudin-1, -7 protéins ↓ dans le duodenum	TNF, IL-6, IL-8 ↑
SAP	IP ↑ (L/M test) IP ↑ (PEG test)	TJPs dans le colon ↓ occludin et ZO-1 ↓ chez les patients ayant BT	Cytokines Inflammatoires ↑ IL-6, TNF-α, CRP, CT

2.8 Absorption des nutriments, de l'eau, et des électrolytes

L'absorption est le processus qui permet le passage sélectif des nutriments vers le milieu intérieur, le sang et la lymphe. Elle a lieu pour l'essentiel dans l'intestin grêle (dans des régions variables selon les nutriments. Les mécanismes d'absorption diffèrent selon les substances absorbées. Ils peuvent être passifs (par simple diffusion selon un gradient de concentration sans dépense d'énergie), actifs (impliquant un transporteur et un apport d'énergie) ou facilité (par des transporteurs).

*Materiel et
Méthode*

3.1. ANIMAUX

Conditions d'élevage et de traitements

Les animaux utilisés dans cette étude sont des rats Wistar, après accouplement les femelles gestantes sont isolés de leurs congénères, et élevées dans un environnement contrôlé à 23°C avec un cycle jour/nuit de 12h/12.

Nature des cages et biberons : Toute utilisation de plastiques est écartée pour éviter des contaminations en phtalates. Les animaux sont hébergés en cages de polycarbonate, et les biberons sont en verre

Régimes: les femelles sont nourries avec un régime *low phyto-estrogènes* 2918 (Harland, tableau 1). Ce régime a une teneur réduite en phyto oestrogènes (250 mg/kg) par rapport à un régime standard, il est préconisé pour l'étude des perturbateurs endocriniens dont les phtalates font partie. Les animaux ont de l'eau *ad libitum*.

Les rattes gestantes sont exposées aux phtalates (DEHP, DINP et DEP) jusqu'au sevrage. Ces produits sont administrés par gavage tous les jours et à heure fixe à raison de 388 et 830 mg/kg/j respectivement.

Les rates gestantes témoins sont gavées avec le véhicule : l'huile de Mais dans les mêmes conditions. Les animaux sont pesés tous les jours avant administration des produits, la prise alimentaire hebdomadaire est également mesurée. A la naissance les portées sont égalisées à 8-9 ratons.

Nous obtenons donc 4 groupes expérimentaux :

- groupe témoins (n=48), constitué des ratons issus de mères contrôles ayant reçu uniquement le véhicule.
- groupe (n=48), constitué des ratons issus de mères traitées au DINP.
- groupe (n=48), constitué des ratons issus de mères gavées avec le DEP.
- groupe (n=36), constitué des ratons issus de mères soumises au DEHP.

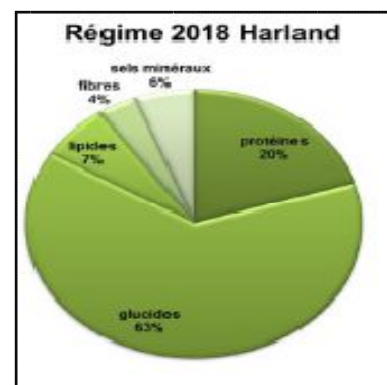
Matériels et méthodes

Tableau11 : Composition de l'aliment 2018

Macronutrients		
Crude protein	%	18.6
Fat(ether extract)	%	6.2
Carbohydrate(available)	%	44.2
Crude fiber	%	3.5
Neutral detergent fiber	%	14.7
ash	%	5.3
Energy density	Kcal/g(kg/g)	3.1(13.0)
Calories from protein	%	24
Calories from fat	%	18
Calories carbohydrate	%	58
Minerals		
calcium	%	1.0
phosphorus	%	0.7
Non-phosphorus phosphorus	%	0.4
Sodium	%	0.2
Potassium	%	0.6
Chloride	%	0.4
Magnesium	%	0.2
Zinc	Mg/kg	70
Manganese	Mg/kg	100
Copper	Mg/kg	15
Iodine	Mg/kg	6
Iron	Mg/kg	200
selenium	Mg/kg	0.23
Amino acids		
Aspartic acid	%	1.4
Glutamic acid	%	3.4
alanine	%	1.1
glycine	%	0.8
threonine	%	0.7
Proline	%	1.6
Serine	%	1.1
Leucine	%	1.9
Isoleucine	%	0.8
Valine	%	0.9
Phenylalanine	%	1.0
Tyrosine	%	0.6
Methionine	%	0.4
Cystine	%	0.3
lysine	%	0.9
Histidine	%	0.4
Arginine	%	1.0
tryptophan	%	0.2



Fig27 : aliment 2018(from de bouchons)



Matériels et méthodes

vitamins		
Vitamin A	IU/g	15.0
Vitamin D ₃	IU/g	1.5
Vitamin E	IU/Kg	110
Vitamin K ₃ (menadinne)	Mg/Kg	50
Vitamin B ₁ (thiamin)	Mg/Kg	17
Vitamin D ₂ (riboflavin)	Mg/Kg	15
Niacin (nicotine acide)	Mg/Kg	70
Vitamin B ₆ (pyndoxine)	Mg/Kg	18
Pantothenic acid	Mg/Kg	33
Vitamin B ₁₂ (cyanocobalamin)	Mg/Kg	0.08
biotan	Mg/Kg	0.40
folate	Mg/Kg	4
choline	Mg/Kg	1200
Fatty acids		
C18 : di palmitic	%	UI/
C18 : di stearlic	%	0.2
C18 : 1w9 oleic	%	1.2
C18 : 2w6 linoleic	%	3.1
C18 : 3w3 linoleic	%	0.3
Total caturated	%	0.9
Total monounsaturated	%	1.3
Total pioyunsaturated	%	3.4
Other		
Cholesterol	Mg/Kg	--

Les rats sont allaités par leur mère durant toute l'expérience. Ils sont pesés quotidiennement jusqu'au sacrifice qui a lieu à la naissance (T0), 8,(T8) , 14, (T14),T21 et 30 jours post- natal.

3.2 . DISSECTION

Les animaux sont sacrifiés et simple laparotomie est pratiquée, l'intestin grêle est prélevé immédiatement et lavé dans une solution de NaCl (0,9%) à 4°C. Le duodénum est éliminé jusqu'à l'anse de Treitz. L'intestin grêle est divisé en deux fragments de longueurs égales, dénommés respectivement jéjunum et iléon.

Matériels et méthodes

Une portion de chacun des organes est homogénéisée dans de l'eau physiologique (4,15 ml/g de poids frais) grâce à un homogénéisateur (Ultra-Turrax T8, Ika). Les homogénats sont maintenus à -20°C. Ils pourront servir à l'analyse d'activités enzymatiques. Une autre portion de chacun des organes est incubée pendant 24 h dans une solution de RNA *later* (Sigma Aldrich, USA) à 4°C puis congelés à -20°C pour l'analyse génique. Un centimètre de chaque fragment est rapidement plongé dans un fixateur (formaldéhyde 10%) en vue de l'analyse histologique,

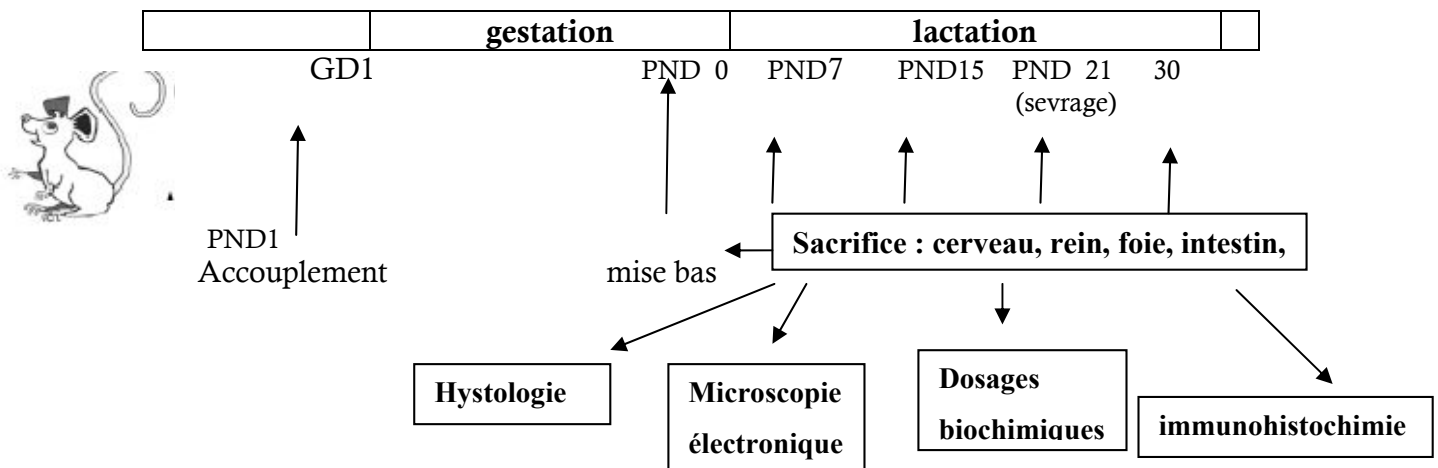


Figure 28 : Protocole d'exposition de rats à différents phtalates. GD : (jour de gestation), PND : (jour postnatal)

3.3 DOSAGES D'ACTIVITES ENZYMATIQUES

Dosage des activités disaccharidasiques

Les activités de la lactase, sucrase et maltase ont été déterminées selon la méthode de *Dahlqvist (1964)*, en utilisant respectivement le lactose, le saccharose et le maltose comme substrats. Le glucose libéré après 1 heure d'incubation à 37°C a alors été révélé en utilisant l'enzyme glucose oxydase-peroxydase

Matériels et méthodes

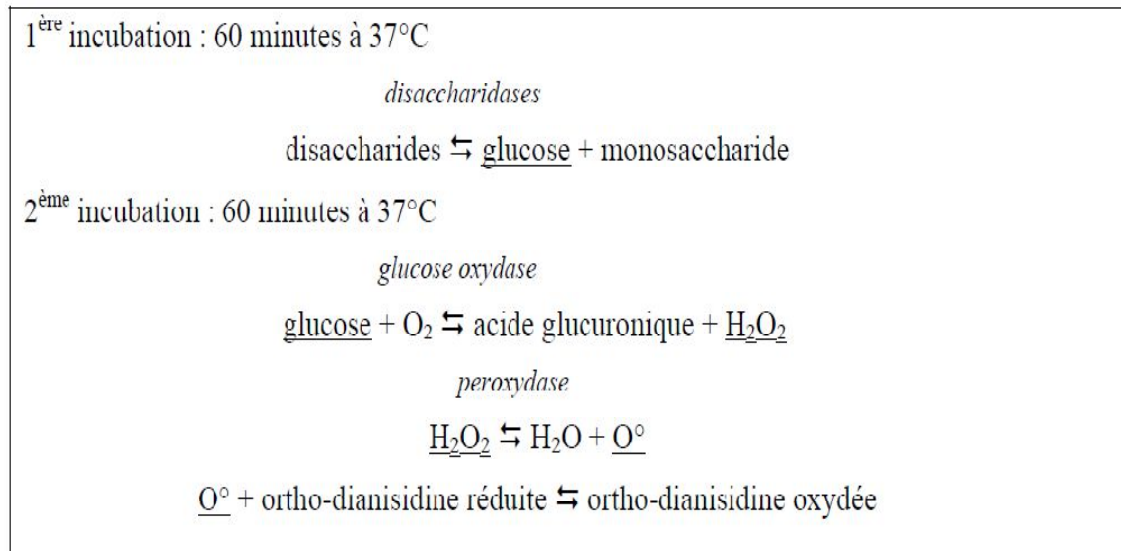


Fig29 : principe du dosage des disaccharidases.

Solution de TRIS-Glucose Oxydase (TGO)

2 mg de glucose oxydase sont solubilisés dans 60 ml de TRIS-HCl (0,5 M ; pH 7) auxquels sont ajoutés 500 µl de solution d'ortho-dianisidine (10 mg/ml, préparée extemporanément lors de la réalisation du TGO), 500 µl de solution de peroxydase (1 mg/ml) ainsi que 1 ml de Triton X-100 (0,25 g/g d'éthanol). Le volume est amené à 100 ml avec du tampon TRIS-HCl (0,5 M ; pH 7). Le réactif TGO est conservé à l'abri de la lumière, à 4°C, pendant une semaine maximum.

Substrat-maléate

Les solutions de substrat-maléate (lactose-maléate, saccharose-maléate ou maltose-maléate) sont des solutions de lactose, de saccharose ou de maltose (0,056 M) dissous dans du tampon maléate (0,1 M ; pH 6).

Tampon maléate

Le tampon maléate est une solution d'acide maléique (0,1 M) dont le pH est amené à la valeur de 6 grâce à une solution de NaOH (1 M).

Méthode

Au temps « 0 minute », on ajoute 50 µl d'une solution de substrat-maléate aux 50 µl d'homogénat dilué. Les tubes BL, BS et BM reçoivent, à la place des solutions de substrat-maléate, 50 µl de tampon maléate (0,1 M ; pH 6). Tous les tubes sont vigoureusement agités puis placés dans un bain-marie réglé à la température de 37°C. Cette incubation dure 60 minutes et permet l'hydrolyse des substrats en monosaccharides.

Matériels et méthodes

Après 60 minutes d'incubation, tous les tubes reçoivent 1,5 ml du réactif « TGO » de manière à stopper l'hydrolyse des substrats dans les tubes destinés à mesurer l'activité des disaccharidases et afin d'initier la mesure de la quantité de glucose libérée par cette hydrolyse. Afin d'obtenir des volumes identiques dans tous les tubes, 50 µl d'eau, 50 µl de solution de substrat-eau et 50 µl de tampon maléate sont ajoutés respectivement aux tubes destinés à mesurer l'activité des disaccharidases, aux tubes «blancs» et aux tubes de la courbe étalon. Après une agitation vigoureuse, les tubes sont incubés pendant 60 minutes à 37°C.

Après cette 2^{ème} incubation, tous les tubes sont centrifugés à 1 000 g pendant 3 minutes afin de précipiter d'éventuels débris cellulaires.

L'absorbance des surnageants est mesurée au moyen d'un spectrophotomètre réglé à la longueur d'onde d'émission de 420 nm.

Les activités spécifiques des disaccharidases sont exprimées en µmol de substrat hydrolysé par minute et par g de protéines.

Dosage de la phosphatase alcaline

La phosphatase alcaline est dosée selon la méthode de Bessey et al. (1946) utilisant le *para*-nitro phényl phosphate (PNPP) comme substrat. Le substrat est composé de PNPP à 5 mM et de MgCl₂ à 1 mM dans un tampon carbonate/bicarbonate 30 mM, pH 9.8. 20 µL d'échantillon dilué sont alors ajoutés à 1 ml de substrat préchauffé à 37°C et la cinétique d'apparition du *para*-nitro phénol (PNP), de couleur jaune, est suivie pendant 3min (mesure tous les 30 secondes) à 407 nm.

3.4 Dosage des protéines

La concentration en protéines contenues dans les homogénats intestinaux est estimée par la méthode de Lowry. Celle-ci est basée sur deux réactions colorimétriques :

- la réaction de Biuret, dans laquelle Cu²⁺, en présence d'une base, réagit avec la liaison peptidique en donnant une couleur bleu-profond,
- et la chimie de Folin-Ciocalteu, dans laquelle un mélange complexe de sels inorganiques réagit avec les résidus tyrosine et tryptophane des protéines en donnant une intense couleur bleu-vert (Lowry *et al*, 1951).

Matériels et méthodes

Méthode

Les homogénats intestinaux sont dilués à l'aide d'eau distillée, de manière à ce que leur concentration en protéines soit comprise entre les points extrêmes de la courbe étalon. 1 ml de réactif C est ajoutés à 50 µl des échantillons dilués, le mélange est agité, après 10 min, 0.1ml de réactif E sont ajoutés et le mélange est agité. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, l'absorbance des échantillons est mesurée au moyen d'un spectrophotomètre réglé à la longueur d'onde d'émission de 795 nm comparée à celle d'une gamme étalon d'albumine sérique bovine (BSA).

3.5 Etude histologique

Les coupes histologiques ont été réalisées à l'hôpital de Meslem Etayeb à Mascara, Service de l'Anatomie Pathologique. La technique utilisée est celle décrite par (Houlod, 1984) qui comporte les étapes suivantes :

1/Fixation : La fixation des échantillons a été faite dans le formaldéhyde 10%. Les prélèvements réalisés sont alors mis dans des cassettes spéciales à parois tournées afin de permettre le passage des liquides.

2/L'inclusion et réalisation des blocs

La paraffine utilisée pour l'inclusion des prélèvements n'étant pas miscible à l'eau, une étape de déshydratation est nécessaire avant l'inclusion. Les échantillons ont été déshydratés dans des bains successifs d'éthanol à 80%, 90% et absolu puis dans 4 bains successifs de toluène. Les échantillons ont ensuite été inclus transversalement dans des moules métalliques. Cette étape a été réalisée à l'aide d'un distributeur de paraffine liquide à 55°C.

3/Réalisation des coupes

Après refroidissement à -20°C des blocs de paraffine contenant les prélèvements, trois niveaux de coupes de 4 µm d'épaisseur ont été réalisés à l'aide d'un microtome manuel. Ces coupes sont étalées sur des lames, dépliées dans un bain d'eau gélative chaude, puis les lames ont été déposées sur une plaque chauffée à 55°C permettant le collage du prélèvement sur la lame.

4/La coloration

Pour la coloration, on a utilisé la technique à l'Hématoxyline-Eosine ou (Hématéine-Eosine) ; qui nécessite la présence de l'alcool acide (100 ml d'alcool éthylique à 70% + 50 ml d'acide HCl), eau ammoniacale (100 ml d'eau distillée + 2 ml Ammoniaque) et solution d'Eosine

Matériels et méthodes

(100ml Eosine solution aqueuse à 3%, 125 ml alcool éthylique à 95%, 375 ml d'eau distillée et 2 gouttes d'acide acétique).la coloration est effectuée selon les étapes suivantes :

3.6 Microscopie électronique à balayage

Préparation d'échantillons:

- Fixation** : au glutaraldéhyde à 2,5% tamponnée (PH7.4) pendant 2heures à 4°C
- Rinçage** : au tampon phosphate (0.2M/PH7.4)
- Post-fixation**:au tétroxyde d'osmium 1% dans le tampon phosphate (0.1M) pendant 1heure
- Rinçage** : au tampon phosphate (0.2M/PH7.4)
- Déshydratation dans des bains d'alcool à degré croissant** (70°,90°,100°) puis dans l'oxyde de propylène.
- Observation au M.E.T**

3.7 Préparation des membranes de la bordure en brosse (Homogénat)

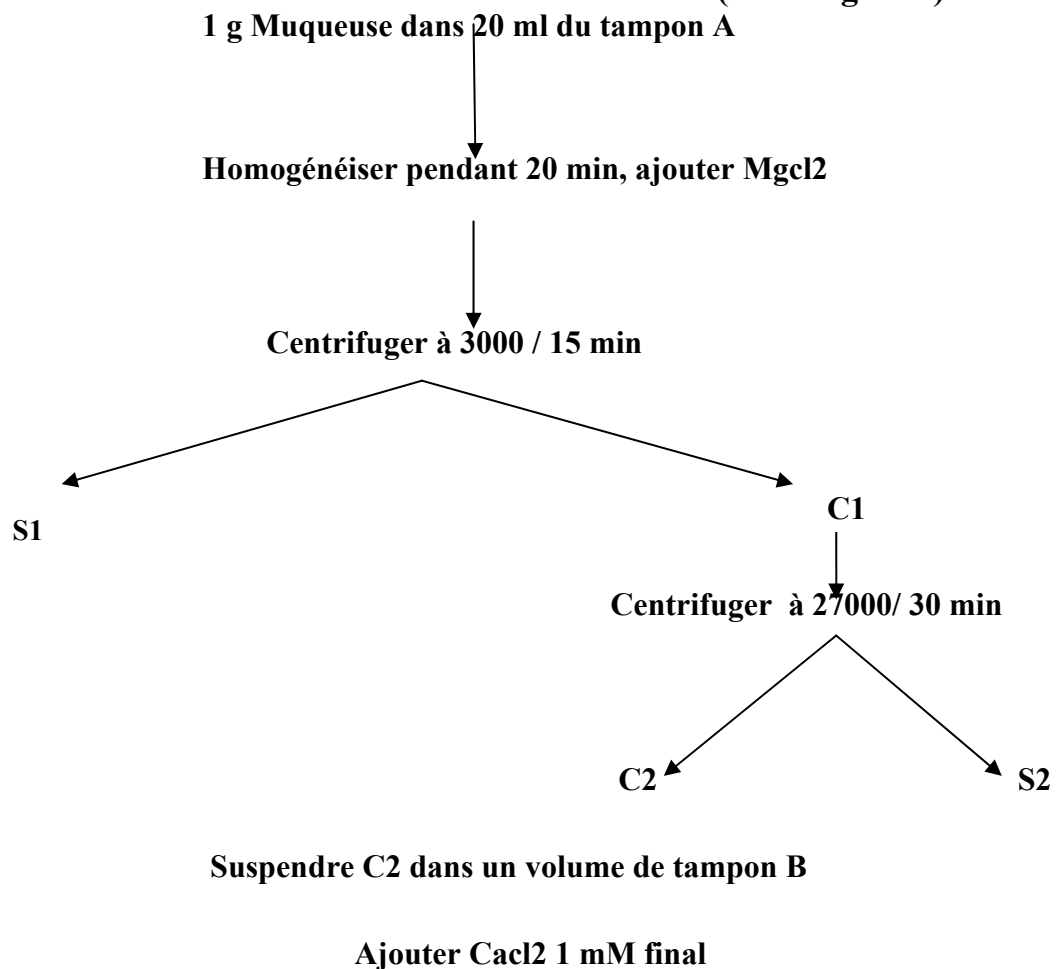


Fig 30 : préparation des membranes de la bordure en brosse

Composition des tampons : Tampon A 50mM mannitol, 2 mM Tris/HCl, pH 7.5, 1 mM Nylmethylsulfonylfluoride (PMSF), 5 g/ml leupeptin, 1 g/ml pepstatin, and 5 g/ml

Matériels et méthodes

aprotinin

Tampon B 50 mMmannitol and 10 mM HEPES/Tris, pH 7.5

Tampon C 300 mMmannitol, 10 mM HEPES/Tris, pH 7.5, 1 mM PMSF, 5 μ /ml leupeptin, 1 g/ml pepstatin, and 5 g/ml aprotinin with

Dosage des lipides

Cette méthode permet de déterminer la quantité de lipides totaux d'un échantillon (Folch et al., 1957). Le principe de cette séparation est fondé sur le caractère hydrophobe des lipides. Dans un premier temps, les lipides sont extraits en utilisant un mélange chloroforme/méthanol (2/1 ; v/v) à raison de 20 volumes par volume de matériel. Après une heure d'agitation, 0,2 volume de KCl (0,8% dans l'eau) par volume du mélange d'extraction est ajouté afin de séparer des phases hydroalcoolique et chloroformique. Le mélange est mis sous agitation pendant 5 minutes avant d'être centrifugé (4°C, 5 min, 1120 g). La phase chloroformique est récupérée et lavée trois fois par un volume équivalent de la phase hydro alcoolique précédemment éliminée (CHCl₃/MeOH/KCl à 0,8% (3/48/47 ; v/v/v). La phase chloroformique finale est "éclaircie" par ajout de méthanol puis filtrée sur papier pasteur en utilisant un mélange chloroforme/méthanol (2/1 ; v/v). Le filtrat est séché par un évaporateurrotatif, mis en solution dans du chloroforme, refiltré en utilisant du chloroforme sur un filtre Whatmann afin d'éliminer toute trace d'eau puis évaporé sous courant d'azote. L'extrait sec est remis en solution dans un mélange chloroforme/méthanol (2/1 ; v/v) et conservé à -20°C jusqu'aux analyses.

mis en solution dans un mélange de solvants organiques (chloroforme/méthanol, mélange 2/1, vol/vol). La solution est ensuite filtrée afin de séparer la phase solide délipidée de la phase liquide contenant les lipides. A cette dernière fraction est ajouté du chlorure de potassium 0,9 % (un volume pour 5 volumes de phase organique). Deux phases se forment alors : une phase inférieure chloroformique contenant les lipides et une phase aqueuse supérieure constituée de méthanol et de la solution de KCl, comprenant les lipoprotéines ainsi que des sels minéraux. La phase supérieure est éliminée par aspiration pour ne garder que la phase chloroformique que l'on traite au Rotavapor. Sous l'effet d'une dépression et à une température de 44°C, le chloroforme est évaporé puis condensé dans un flacon de récupération. Il ne reste alors plus dans le récipient initial que les lipides totaux,

dont la masse est déterminée par pesée (m lipides). Le pourcentage de lipides contenus dans l'échantillon peut être calculé selon la formule suivante :

Matériels et méthodes

$\% \text{ lipidique} = (\text{m lipides} / \text{m échantillon}) \times 100$

3.8 PROTOCOLE DU TEST LACTULOSE / MANNITOL:

Après une nuit de jeûne, les rats sont gavés par un mélange composé des 2 marqueurs mannitol / lactulose (120 mg et 80 mg respectivement dans 1 ml). Les urines sont recueillies au cours de 24 heures dans des cages métaboliques, leur volume est mesuré. Le dosage se fait par chromatographie.

5. TECHNIQUE DE DOSAGE:

La clairance du mannitol et du lactulose est calculée après dosage des oses par chromatographie liquide. La technique comporte l'ajout d'étalons internes.

Les échantillons d'urine sont centrifugés puis filtrés. Deux solutions d'étalonnage contenant des quantités variables de lactulose et de mannitol sont préparées. Dans le chromatographe, le mélange, réalisé à partir des échantillons d'urine des rats âgés de 21 jours, est passé dans la colonne. Chaque sucre est repéré en fonction de son temps de rétention par rapport aux étalons internes. Les sucres sont détectés dans l'ordre suivant : mannitol, lactulose. Ceci est visualisé sur un chromatogramme obtenu en 12 minutes. Les aires sous la courbe des différents sucres sont mesurées et servent au calcul des concentrations.

Cette technique permet ainsi d'établir une comparaison entre les clairances urinaires des deux sucres ingérés.

Chaîne HPLC Perkin Elmer série 200 équipée d'un injecteur automatique, d'une pompe quaternaire d'un four à colonne à effet Peltier et d'un dégazeur. Détecteur à diffusion de lumière S.E.D.E.R.E. France Sedex 55. Logiciel de traitement de résultats Chrom version 6.3.1(Perkin Elmer). Colonne Luna NH2 100 A (Phenomenex) 250*5
Um maintenue à 40 c

Eluant A eau distillée

Eluant B Acetonitril (VWR)

GRADIENT 0-15 min à 18% A

15-17 min 18% A

17-18 min 18 à 15% A

18-23 min 15% A

Débit 3ml /min

Volume injecté : 25 ul

Détecteur à 25 % C

Etalonnage externe avec D-mannitol et lactulose en solution de

Matériels et méthodes

Préparation des échantillons par dilution au $\frac{1}{2}$ (échantillon 5 et 6) et au $\frac{1}{10}$ échantillon (1-4) dans l'eau distillée centrifugation 10 min à 10 000 rpm et filtration sur filtre nylon 0.45 μm

3.9 Immunohistochimie

L'immunohistochimie (IHC) est réalisée sur tissus fixés montés sur lame et repose sur la détection du peptide ou de la protéine qui va être reconnue par un anticorps spécifique. Cet anticorps est lui-même reconnu par un anticorps secondaire couplé à une enzyme (la peroxydase dans notre cas).

La révélation se fait alors à l'aide du substrat de l'enzyme (diaminobenzidine pour la peroxydase). Nous avons utilisé des anticorps primaire, anti-ki67, anti-occludines développés chez le lapin. L'anticorps secondaire utilisé était l'anticorps biotinylé anti-lapin, qui se fixe sur l'anticorps primaire. A ce complexe, nous avons rajouté les protéines : avidine, biotine et peroxydase qui vont permettre à la fois une amplification du signal et une détection des sites expression et ce, après addition du substrat de l'enzyme peroxydase, le DiAminoBenzidine (DAB). Ce substrat chromogène va traduire une réaction positive par une coloration marron aux sites d'expression de la protéine recherchée. Le principe est illustré dans la [figure n 28](#).

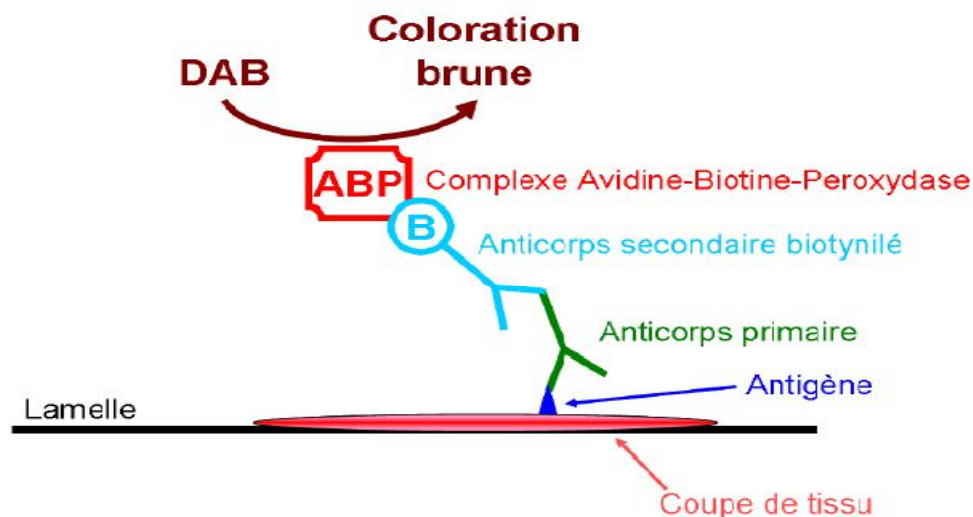


Figure31: Principe de l'immunohistochimie.

Brièvement, à partir des coupes de paraffine, nous réalisons une étape de déparaffination qui consiste en une succession de bains. Le premier est un bain de xylène, suivi d'alcool 100%, d'alcool 90%, d'alcool 70% et enfin d'alcool 50%. Les coupes sont ensuite placées dans un mélange de 3,5 ml d' H_2O_2 30% complété à 100 ml avec du méthanol

Matériels et méthodes

pendant 30 minutes, étape nécessaire pour inhiber les peroxydases endogènes présentes dans le tissu. Les sites non spécifiques sont ensuite bloqués pendant 1 heure avec du sérum normal de chèvre (NGS) : 120 µl de NGS complétés à 10 ml avec du PBS 1X (Phosphate Buffer Solution).

L'anticorps primaire : anti-ki67 ou anti-occludine humain dilué au 1/100 dans du PBS 1X est alors rajouté et reste au contact des sections tissulaires pendant toute une nuit à 4°C. Le lendemain, 2 rinçages au PBS 1X sont effectués avant de rajouter pendant 2 heures l'anticorps biotinylé dilué au 1/250. Deux lavages au PBS 1X sont effectués et le tissu est incubé avec le complexe avidine-biotine-peroxidase pendant deux heures.

Deux derniers lavages au PBS 1X sont réalisés avant la révélation de la réaction finale suite à l'addition substrat DAB.

Enfin, nous faisons un contre marquage pendant 1 minute à l'hématoxyline de Carrazzi, qui colore les noyaux en bleu. Finalement, nous procédons à l'étape de déshydratation qui consiste à refaire plusieurs bains croissants d'alcool (50%, 70%, 90%, 100%) puis de xylène avant de les monter avec le milieu de montage pour microscopie.

3.10 Dosage des cytokines

Kits

TNF- α and IL-6 ELISA kits were purchased from Biosource International (Camarillo, CA, USA). The lower detection limits of these kits are 4 pg/ml. The optical density was measured by using an automatic plate reader (Spectra Image; Tecan) at 450 and at 620 nm for reference.

Cytokines Assay

Plasma TNF- α and IL-1 β were measured by ELISA method in accordance with the manufacturer's instructions and were expressed in pg/ml.

3.11 Détermination du statut oxydant/antioxydant

1. Détermination de l'activité des superoxide dismutase (SOD)

Les SOD sont des métalloprotéines possédant une activité enzymatique. Elles représentent une des premières lignes de défense contre le stress oxydant puisqu'elles assurent l'élimination de l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) par une réaction de dismutation, en le transformant en peroxyde d'hydrogène et en oxygène.

L'activité des SOD a été déterminée au niveau de l'intestin à l'aide d'un kit commercial selon la méthode de Nishikimi *et al.* (1972).

2. Détermination de l'activité de la Gluthation peroxidase (GPx)

La GPx est une sélénoprotéine (cinq isoformes) possédant une activité enzymatique, qui réduit les peroxydes aux dépens de son substrat spécifique, le glutathion réduit (GSH). Son rôle principal consiste en l'élimination des peroxydes lipidiques résultant de l'action du stress oxydant sur les acides gras polyinsaturés.

L'activité de la GPx a été déterminée au niveau du de l'intestin à l'aide d'un kit selon la méthode de Paglia et Valentine (1967).

3. Détermination de l'activité du malondialdéhyde (MDA)

Le MDA, ou dialdéhyde malonique, est un composé chimique de formule $\text{CH}_2(\text{CHO})_2$. Il est présent naturellement dans les tissus, où il est une manifestation du stress oxydant. Il est issu notamment de l'action des dérivés réactifs de l'oxygène sur les acides gras polyinsaturés. Il réagit avec la désoxyadénosine et la désoxyguanosine pour former des adduits à l'ADN (Nair *et al.*, 2008).

Principe

La méthode est basée sur la formation d'un complexe fluorescent entre deux molécules d'acide thiobarbiturique (TBA) et une molécule MDA. Le chromophore ainsi formé (MDA-TBA), présentant une absorbance à 515 nm et une émission à 550 nm est quantifié par H par spectrophotométrie (Baudrimont *et al.*, 1997).

Méthodes

Le dosage spectrométrique du MDA a été effectué selon la méthode décrite par Ohkawa *et al.*, (1979). A 400 μl d'extrait protéique de l'intestin ont été ajoutés 1,5 ml d'acide acétique 20 %, 1,5 ml du TBA 0,8 %. Les échantillons ont été chauffés à 95 °C pendant 20 min puis refroidis dans la glace. 5 ml d'un mélange de n-butanol+pyridine (15 :1 V/V) ont été ajoutés à chaque échantillon. Après agitation vigoureuse et centrifugation (3000 rpm, 5 min), le surnageant a été isolé et la DO a été lue à 546 nm. Un tube blanc contenant 400 μl de H_2O sera traité en parallèle. La concentration du MDA a été calculée en utilisant le coefficient d'extinction du complexe MDA-TBA ($\epsilon = 1.56 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{cm}^{-1}$ à 546 nm).

4. Détermination de l'activité catalase (CAT)

L'activité catalase est déterminée par la méthode de Aebi *et al.*, 1984. A 3 ml de H_2O_2 (54 mM de H_2O_2 dans 52 mM de Tompan phosphate, pH=7), 5 ml de solution catalase est ajouté. La diminution de H_2O_2 est mesurée par spectrophotométrie à 240 nm et 258 nm 60s après. Les hémolysas de la préparation intestinale sont centrifugés à 3200 RPM est l'estimation de l'activité catalase est déterminée à partir de 1ml de l'hémolysa une unité de l'activité catalase dégrade 1 mmol de peroxyde d'hydrogène pendant 60s.

Matériels et méthodes

Kits:

Superoxide dismutase (SOD) kit	Biodiagnostic, Giza, Egypte
Glutathione Peroxidase (GPx) kit	

3.12

Traitement statistique des résultats

les résultats sont exprimées sous forme de moyenne \pm écart type. L'analyse statistique des différences obtenues entre les valeurs observées chez les groupes traités et le groupe témoins a été réalisée par une analyse de variance (ANOVA) . Le seuil de significativité statistique est de $p < 0.05$.

Résultats

4. RESULTATS

4.1 Influence de l'exposition au phtalates sur l'évolution de la prise alimentaire chez les mères, le poids corporel et le poids des organes des ratons

Dans cette partie nous évaluons les conséquences de l'exposition aux phtalates par gavage chez les rats femelles gestantes et en période de lactation sur l'évolution de leur poids corporel, leur gain de poids et leur prise alimentaire journalière. Le tableau 11 montre une diminution de la consommation d'aliment par les femelles traitées en périodes de gestation et lactation par des phtalates, se traduisant par une diminution du gain moyen quotidien.

Si l'on évalue la quantité de nourriture ingérée par semaine pendant la période de gestation et lactation, on constate une différence entre les femelles traitées au phtalates et celles témoins, la prise de nourriture hebdomadaire (exprimée en g/g poids corporel) est significativement réduite, et ce dès la 2^{ème} semaine de gestation chez les femelles traitées, est devenue 2 fois inférieure ($P < 0,001$) à celle des femelles témoins..

Tableau 12 : Effet des phtalates sur la prise alimentaires hebdomadère (g).

Groupe	Gestation(j)			Lactation (j)		
	1-7	8-14	15-21	1-7	8-16	16-21
Témoin	22	26	28	31	40	45
DINP	19	19*	17*	16*	19*	23*
DEHP	17g	12*	15*	16*	15*	14.7*
DEP	20	20	18*	17	17	19

Pendant l'expérience, on observe une évolution régulière du poids corporel des 4 groupes. Cependant, dès le 8^{ème} jour de gestation, l'évolution du poids corporel chez les femelles traitées est significativement diminuée (24%, $p < 0.05$), à t 20 j le poids des femelles témoins s'accroît pour atteindre 290g, alors que chez les rats traitées les valeurs sont au alentours de 221 et 210 g pour les groupes DINP, DEHP et DEP à cause des mises-bas prématurés qui ont lieu au 17^{ème} jour de gestation (258g, et 273g), il est à noter que le DINP s'avère plus puissant que le DEHP. Après la naissance, cette différence de poids persiste significativement.

4.2 . Effet de l'exposition aux DINP, DEHP et de DEP sur le poids des ratons :

La baisse du poids chez les animaux ayant subit un traitement au phtalates est apparente et devient significative à partir de la deuxième semaine postnatale ($p < 0.001$). La masse

Résultats

corporelle diminue d'environ 50 % suite à l'effe des phtalates comparés aux témoins et sans différence notable entre les trois traitements..

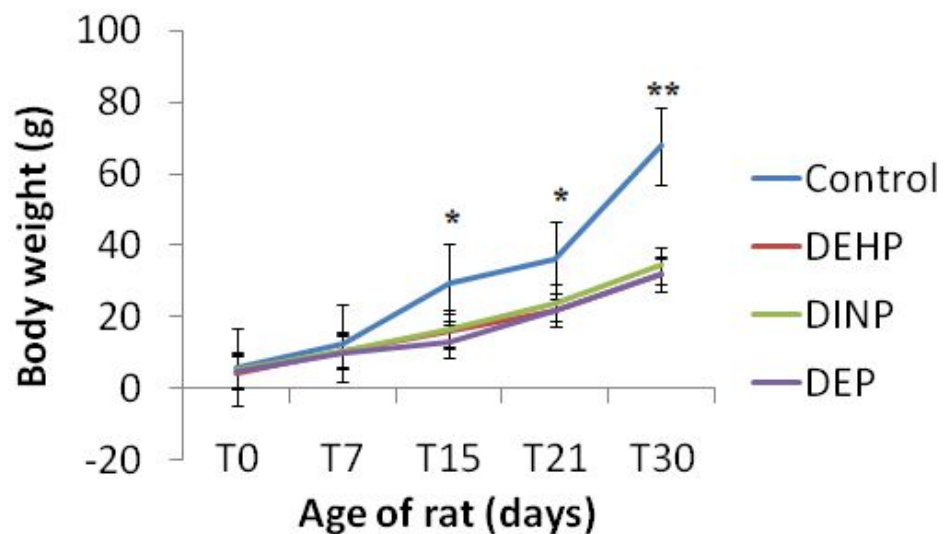


Fig 32 : Effets des phtalates sur le poids des rats. ($p < 0.001$).

Effet sur le poids des organes

Le poids des organes (cerveau et reins) est significativement diminué, il est important de noter que chez les rats adultes traités au DEHP ou DINP, la masse du foie est augmentée, nos résultats indiquent le contraire, ce qui laisse penser que les effets dépendent non seulement de la dose mais aussi la période de l'exposition. Nous avons également observé une diminution significative du poids de l'intestin (duodénum et jéjunum) chez les rats issus de mères traitées au DINP et DEP en comparaison avec ceux issus de mères témoins ou exposé au DEHP ($p < 0,0001$). Après 30 jours d'exposition, les trois phtalates avaient induit une augmentation du poids du cerveau et des reins ainsi qu'une réduction de la taille du foie (tableau 12)

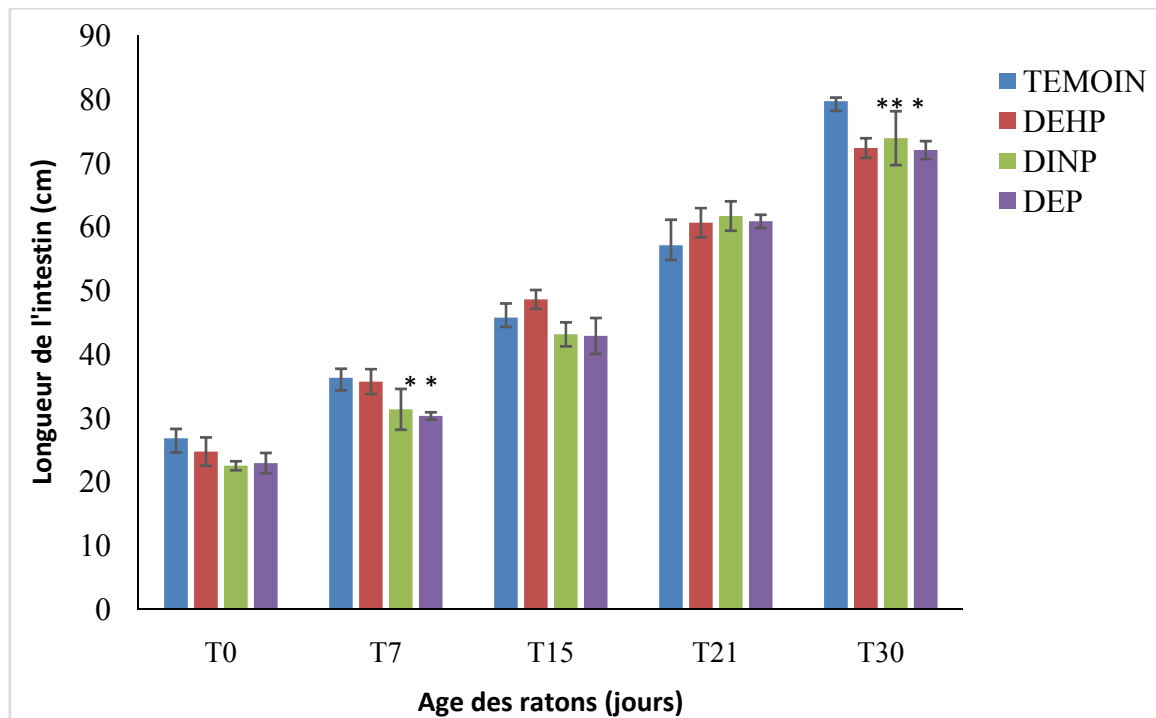


Fig 33 : impact des phtalates sur la longueur de l'intestin chez les ratons à différents ages

Pendant les deux premières semaines postnatales nous avons observé une diminution significative de la longueur de l'intestin chez les ratons issus de mères traitées au DINP, DEP en comparaison avec ceux issus de mères témoins ou exposé au DEHP ($p < 0,05$).

Néanmoins, après 21 jours d'exposition les phénomènes s'inversent et on note une légère élongation de l'intestin des animaux traités aux phtalates. Au 30 eme jour postnatal la longueur de l'intestin est à nouveau réduite ($p < 0,05$) sous traitement au phtalales.

Résultats

Tableau13 : Effet des trois phtalates sur le poids de l'intestin (Duodénum, Jéjunum et l Iléon) , le foie , le rein et le cerveau

Groupes	Intestine (D, J, I)	Pois de l' organe (g)		
		Foie	Rein	cerveau
7 jours				
Control	(0.058±0.006 , 0.257±0.019, 0.160±0.009)	0.334± 0.005	0.063 ±0.001	0.454±0.02
DEHP	(0.06±0.004, 0.157±0.006, 0.102±0.019)	0.362± 0.033	0.065±0.005	0.431±0.48
DINP	(0.054±0.006, 0.172±0.02, 0.111±0.012)	0.270 ± 0.02	0.063±0.004	0.357±0.03
DEP	(0.069±0.003, 0.241±0.01 , 0.135±0.04)	0.43 ± 0.04	0.088 ±0.001	0.44±0.06
15 jours				
Control	(0.10±0.013 , 0.421±0.01, 0.453±0.02)	1.09 ± 0.02	0.17±0.01	1.02±0.01
DEHP	(0.06± 0.005, 0.25±0.03, 0.117±0.014)	0.617 ± 0.034	0.11 ± 0.016	0.878±0.025
DINP	(0.049± 0.009,0.172±0.015 ,0.147 ± 0.024)	0.526± 0.011	0.112 ± 0.01	0.766±0.004
DEP	(0.098±0.001, 0.180±0.03, 0.148± 0.024)	0.55 ±0.01	0.097±0.001	0.74±0.01
21 jours				
Control	(0.185± 0.01 ,1.01 ±0.13±, 0.78± 0.08)	1.92 ± 0.1	0.29 ± 0.04	1.79±0.03
DEHP	(0.094±0.001, 0.411±0.04, 0.267±0.02)	0.911 ± 0.01	0.13 ± 0.05	0.922 ± 0.5
DINP	(0.131±0.1, 0.388±0.01, 0.3±0.008)	0.952±0.15	0.138 ± 0.06	0.819±0.1
DEP	(0.2±0.02, 0.41±0.1, 0.32±0.1)	0.9±0.02	0.4±0.11	0.85±0.12
30 jours				
Control	(0.325±0.032 , 1.538±0.26, 1.12±0.16)	3.817±0.28	0,331±0.008	1,072±0.022
DEHP	(0.146±0.029, 0.822±0.061, 0.557±0.062)	1,273 ±0.119	0.221±0.005	0.983±0.018
DINP	(0.142±0.034 , 0.695±0.072, 0.708±0.062)	1.498±0.23	0.275±0.004	1.00±0.014
DEP	(0.23±0.02, 0.701±0.04, 0.633±0.03)	2.08 ± 0.02	0.24 ± 0.006	0.87±0.021

Résultats

Le poids relatif de l'intestin grêle s'est accru de 50% entre t 7 et t 15, le même phénomène est observé entre t15 et t 21 .L'exposition aux phtalates avait induit une réduction de 50 % du poids de l'intestin (tableau 12).

Le foie est le premier organe cible de l'effet délétère des phtalates. Chez les rongeurs adultes, l'effet le plus évident d'une contamination chronique au DEHP par voie orale se traduit par une hépatomégalie prononcée, conséquence d'une hyperplasie et d'une Hypertrophie des hépatocytes ce qui ne corrobore pas avec nos résultats.

4.3 Effet sur la morphologie de l'intestin : Etude histologique de la hauteur des villosités

La classification de Marche et al.(1972), en cinq grades ou groupes, sont très voisines, basées sur la hauteur des villosités, le rapport entre cryptes et villosité (C/V)et le nombre des cellules à calices.

- Le grade I correspond à la normale, les villosités mesurent 350 à 500 u, le rapport C/V vaut 0.27.
 - Le grade II correspond à une atrophie modérée : la hauteur villositaire varie de 300 à 350 u, le nombre des cellules absorbantes s'abaissent.
 - Le grade III est une atrophie partielle : la hauteur villositaire varie de 150 à 300 u et le rapport C/V de 0.27 à 1. Les cellules caliciformes tendent à augmenter. Il peut exister des altérations des cellules absorbantes.
 - le grade V correspond à l'atrophie totale ; la muqueuse est plate (type de l'entéropathie au gluten). Les cellules caliciformes sont nombreuses. Les cellules absorbantes sont aplaties.
- Nous avons observé une réduction significative de la hauteur des villosités du jéjunum dans le groupe DINP alors que le DEHP seul n'a eu aucun impact dans le duodenum. Par ailleurs dans ce même groupe, des effets délétères sur la morphologie et des lésions de l'intestin ont été mis en évidence comme en témoigne la diminution du score histologique et l'infiltration des lymphocytes (lésions lymphoépithéliales) (Figure 34). Ces résultats montrent que les phtalates altèrent la structure de l'intestin.

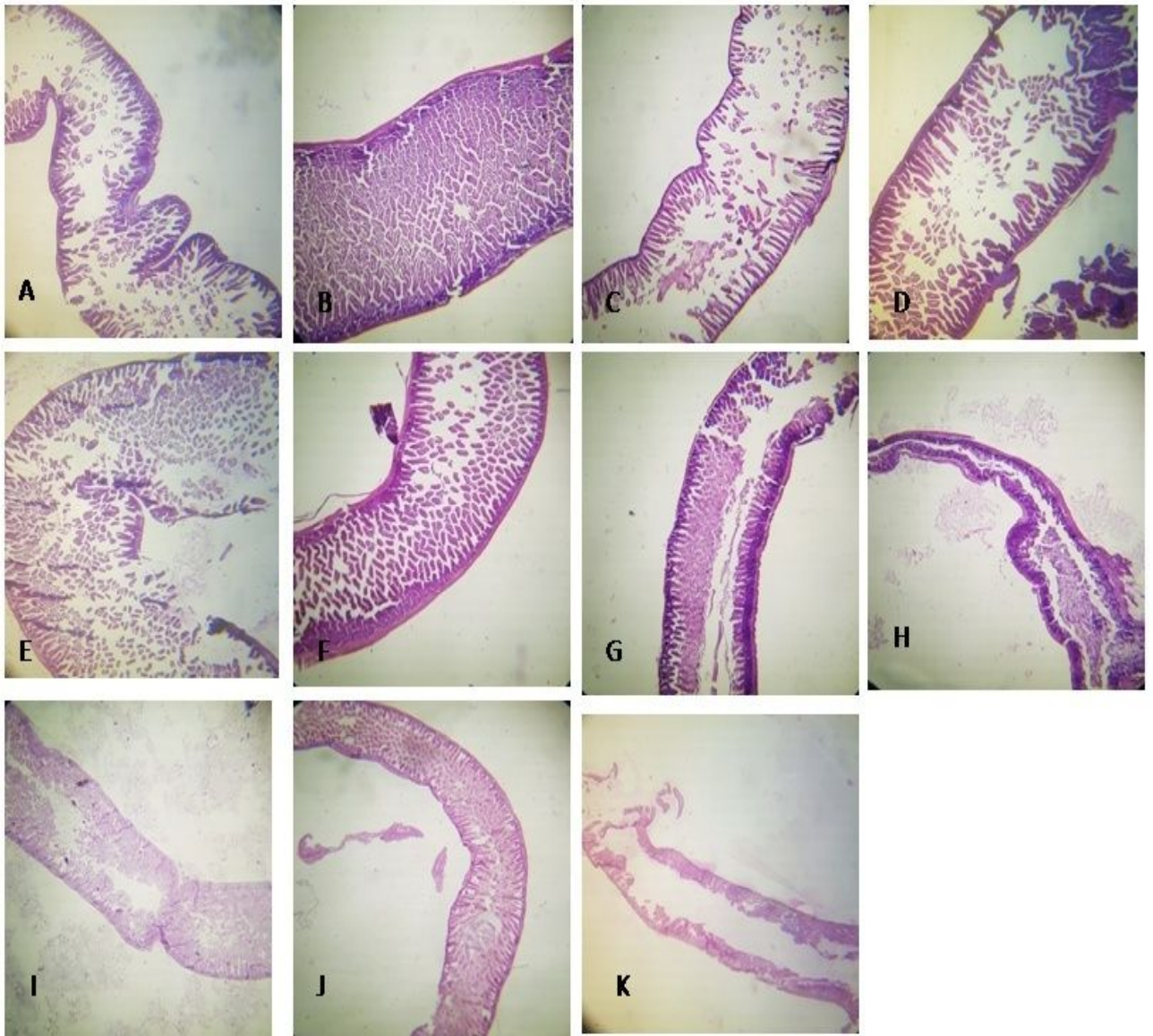


Fig34 : effets des phtalates sur le diamètre de l'intestin (10x) A) DEHP T 21 J C) DEHP T 7 J D) DEHP T21 D F) DEHP T 21 D G) DHP T 30 I I) DINP T0 D H) DINP T30 J J) TEMOIN 7 I

L'étude histologique révèle que le traitement au DEHP et DINP réduit significativement le diamètre de l'intestin quelque soit le fragment étudié, la diminution à l'âge de 21 jours est plus importante que celle observée au 7^{ème} jour postnatal.

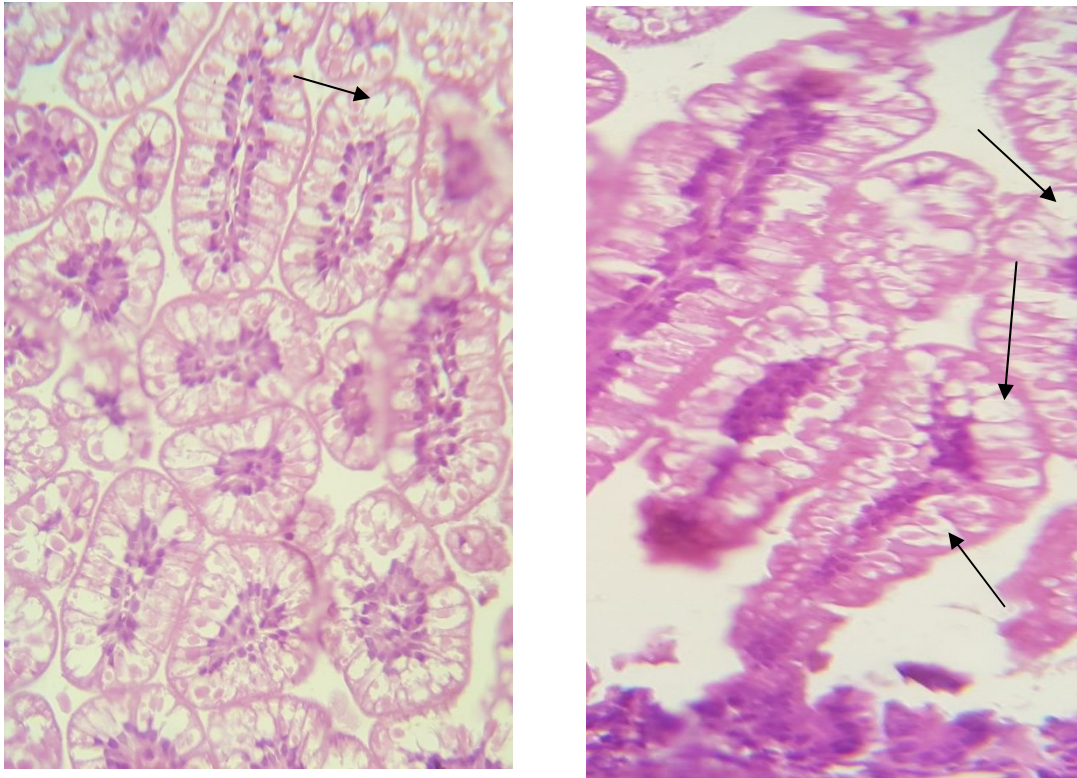


Fig 35: Enterocytes caractérisant la partie distal des ratons entre j0 et j 14 (grossissement 10x)

L'iléon des ratons au stade J0,j7 et j14 présente certaines particularités : en effet, à ce stade bien précis du développement, on observe normalement des enterocyte avec une grande vacuole, ce qu'on appelle (foetal type). Cela est interprété comme le résultat de l'absorption lipidique et protéique. La nature lipidique des vacuoles intestinales a été confirmée par des réactions histochimiques caractéristiques. Les lipides absorbés donnent des acides gras et des monoglycérides qui s'accumulent sous forme de gouttelettes à l'intérieur des cellules avant de se transformer en triglycérides . La présence d'inclusions lipidiques dans les vacuoles constitue une phase de stockage cellulaire temporaire .

Chez tous les animaux traités, la proportion des VET semble moins importante que celle observée chez les animaux témoins.

Nos résultats ont démontré que l'exposition gestationnelle et lactationnelle aux phtalates induits chez les nouveau-nés des altérations histologiques au niveau de l'intestin (figure 35). Après la naissance (pendant la période néonatale) les entérocytes à vacuoles sont les cellules prédominantes dans la partie distale , ce type dit foetal est caractérisé par une activité d'endocytose élevée (fonction de digestion) . A partir de la troisième semaine de vie postnaatale lorsque la transition du lait maternel à la nourriture solide a lieu la maturation intestinale est accélérée et se traduit par des changements structurels et fonctionnels .

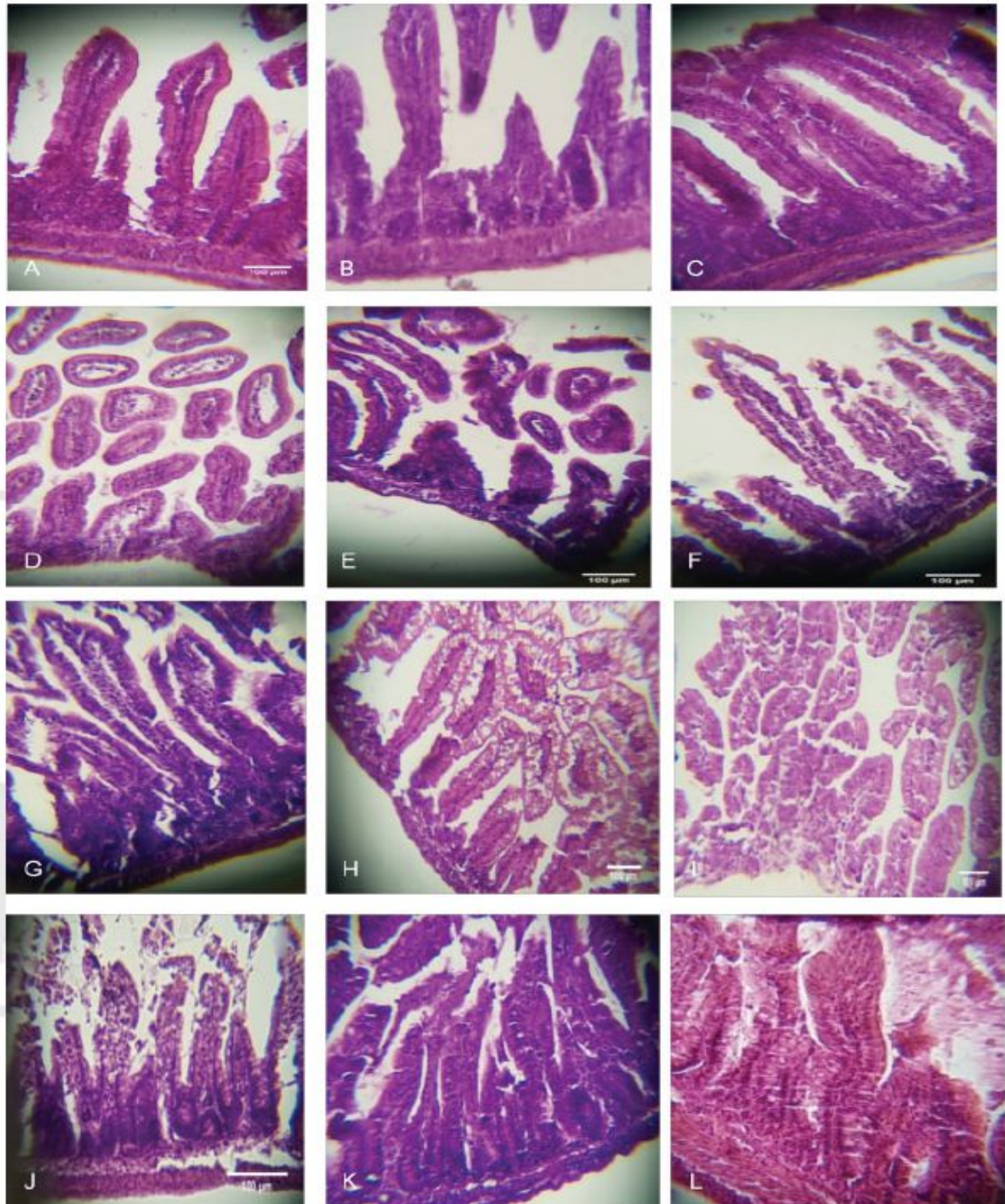


Fig 36: Coupes histologiques des intestins de rats au stade J0, j7 et j30 suite à l'exposition gestationnelle et lactationnelle à 380mg/Kg/pc de DEHP, DINP et DEP. (A–C) duodenum section de rats non sevrés (21 jours) exposé au DEHP, DINP,ou l'huile de maïs . (D, E) trophie des villosités dans le jejunum des rats âgés de 7 jours, exposé au DINP et DEP , (F) villosité de taille normale dans le jejunum des rats traités au DEHP, (G) jejunum témoin, (H) control iléon des rats témoins âgés de 7 and 14 jours, (I) Atrophie villositaire au niveau de l' iléon grades 3 et 4 dans le groupe DINP p, (J) infiltration lymphocytaire dans iléon de rats(21 et 30 jours) traités au DEHP, (K) villosité de l'iléon groupe DEP . (L) villosité ilealles des animaux témoins âgés de 30jours. Formalin fix, paraffin embedded, hematoxylin–eosin reaction, _40 magnification

Résultats

L'étude histologique montre chez le groupe témoin une diminution de la taille des villosités due à l'immaturité. La hauteur des villosités augmente avec le vieillissement. Vers la troisième semaine de vie postnatale les villosités sont plus ou moins matures et les entérocytes sont bien distingués.

L'exposition périnatale au DINP se traduit à la naissance au niveau du duodénum (24hpostnatal) par une atrophie villositaire (grade 2 à 3) avec immaturité des couches. Au niveau du jejunum, après 7 jours de traitement des rats au DINP on observe une légère diminution de la taille et du nombre des villosités, une légère atrophie de grade 1 à 2, tandis que les autres couches sont d'aspect normal. L'atrophie s'accroît pour devenir très sévère grade 4 au 30ème jour de traitement (**fig 35**). Chez les rats issus de mères traitées au DEHP, l'étude histologique ne révèle aucun effet jusqu'au 7ème jour où les fragments analysés sont d'aspect normal. Cependant chez les rats de 15 jours on observe au niveau de l'iléon un infiltrat inflammatoire lymphocytaire folliculaire au niveau de la sous muqueuse (**fig 35**). Il est intéressant de noter que chez les rats âgés de 21 jours cette infiltration disparaît et on note une taille normale des villosités.

Au 30ème jour de traitement le DEHP semble avoir un moindre effet en comparaison avec le DINP sur la morphologie de l'intestin.

A la naissance le duodénum des rats témoins est caractérisé par des villosités de taille normale, les couches sont bien différenciées. Cependant chez les animaux traités au DEHP nous avons constaté l'absence de glandes de brunner.

Les noyaux des entérocytes étaient de taille augmentée et hyperchromatique.

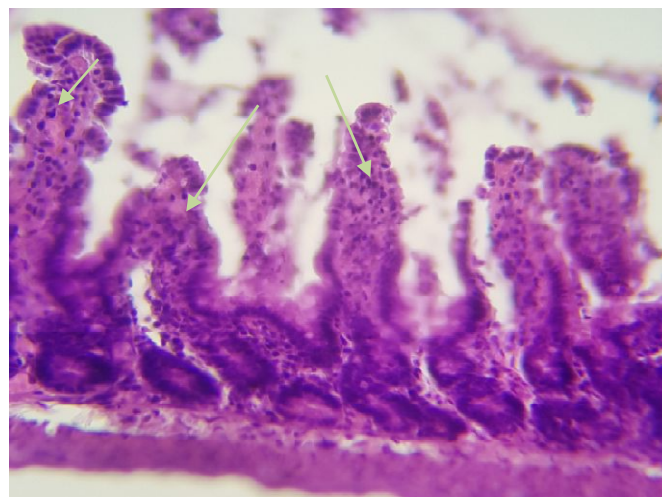


Fig 36 (suite) : infiltration lymphocytaires

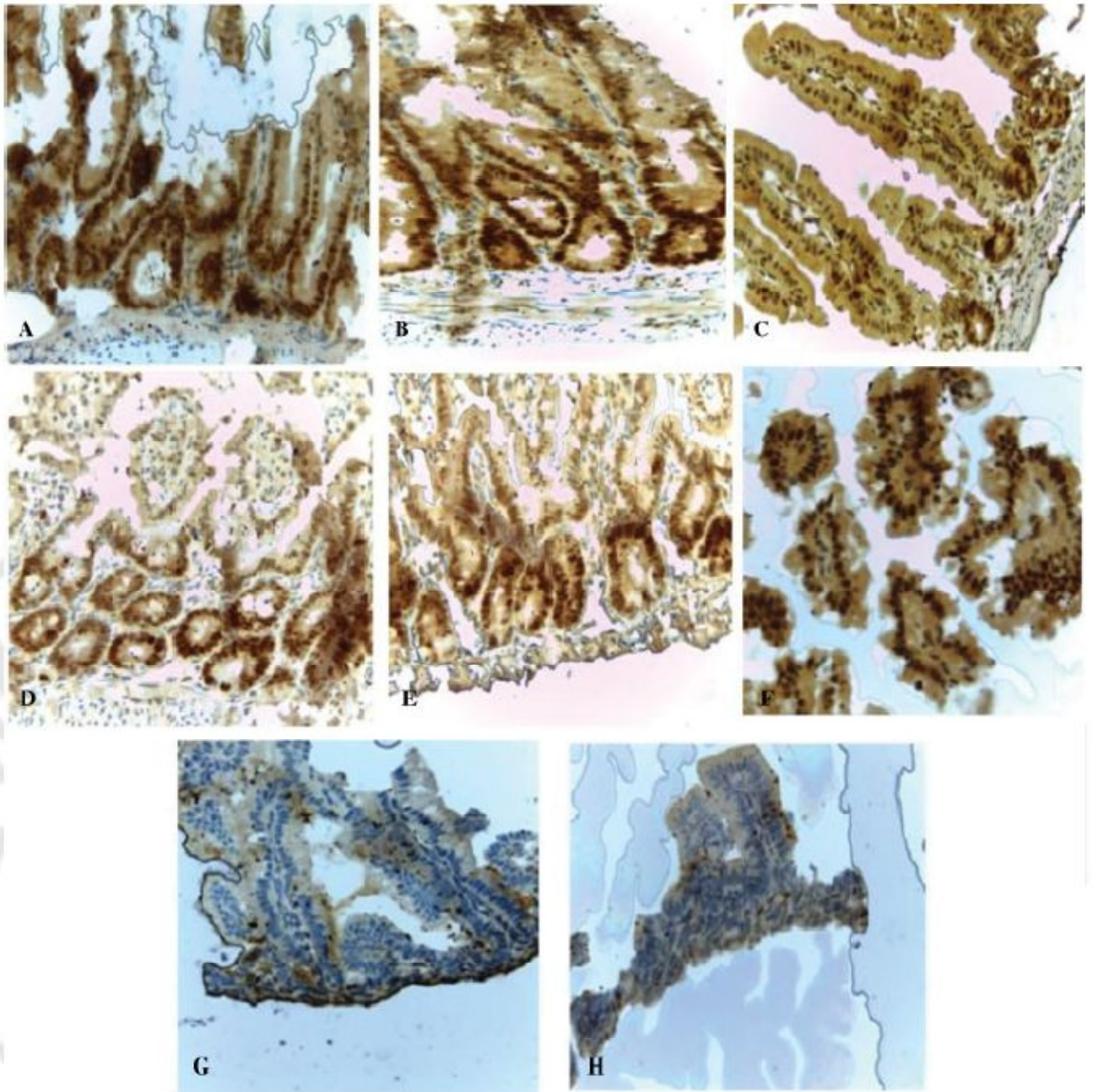


Fig37 : Effet des phtalates sur l'expression de la Ki-67 dans l'intestin des rats suite à l'exposition gestationnelle et lactationnelle , B) jejunum et iléon de rats témoins à la naissance , (E, F) jejunum et iléon de rats témoins agés de 30 jours. (C, D). jejunum de rats après 7 et 30 jrs de traitement au DEHP. (G, H). Intestine de rats exposés au DINP . La réaction positive des cellules indiquée par la coloration marron des noyaux ; 40 magnification. DEHP, diethylhexyl phthalate; DINP, diisononyl phthalate.

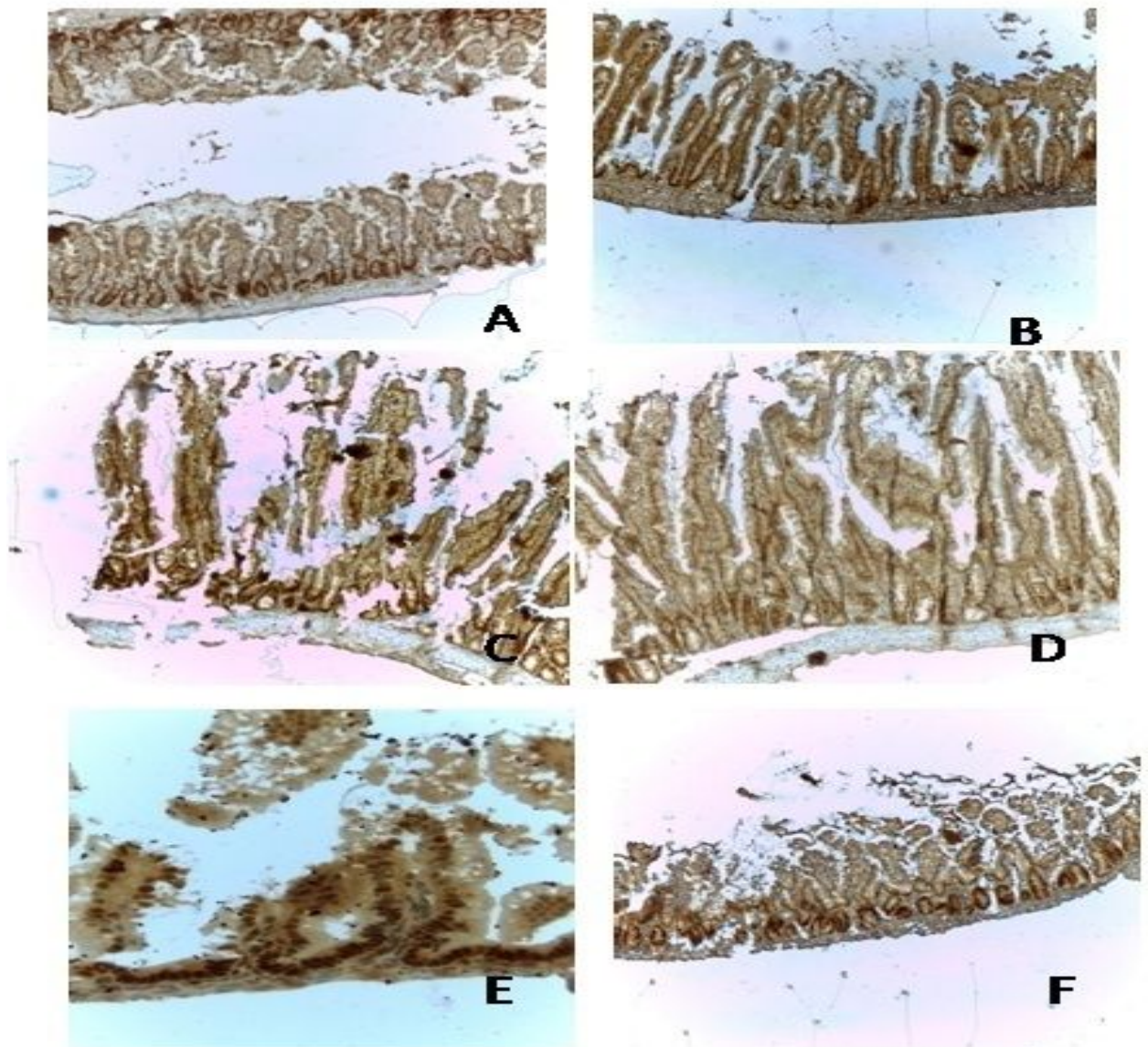


Fig38 :Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à 380mg/Kg/pc de DEHP DINP DEP sur l'expression de la protéine Ki-67 au niveau du duodenum, jejunum et l' ileon des rats au stade 7, 21 et 30 jours de traitement

4.4 Prolifération cellulaire

L'indice de prolifération cellulaire dans les différents fragments d'intestin a été recherché afin de voir si les modifications structurelles s'accompagnaient d'un effet sur la prolifération des cellules intestinales. A la naissance on observe les cellules marquées au Ki-67, 90% (noyaux marrons foncé) particulièrement au niveau des cryptes (figure 34). Le nombre de noyaux marqués au Ki-67 est notablement différent entre les quatre groupes avec une diminution significative ($p < 0.001$) lors des traitements aux DEHP et DINP (Figure 34).(7% et 0% respectivement). Après 30 jours d'exposition

Résultats

aux phtalates on n'observe aucune différence de l'indice de prolifération (Ki-67) en comparaison avec les sujets témoins excepté pour le groupe DINP. Il apparait que les produits testés entraînent une diminution de la longueur des villosités en raison de l'hypoprolifération au niveau des cryptes et incapacité à reconstituer la muqueuse.

4.5 Enzymes de maturation

La figure 39 montre que dans le jéjunum l'activité lactasique est significativement élevée chez les rats du groupe DINP quelque soit leur âge (40% p $P < 0,05$). Contrairement au DEHP qui ne semble pas influencer l'activité de cette enzyme dans cette partie d'intestin.

Au niveau de l'iléon on observe une augmentation significative de l'activité sous l'effet du DINP. D'autre part le DEHP induit des perturbations notables de l'expression de cette enzyme avec une légère diminution au 7eme jour qui s'accroît vers la fin de la période néonatale.

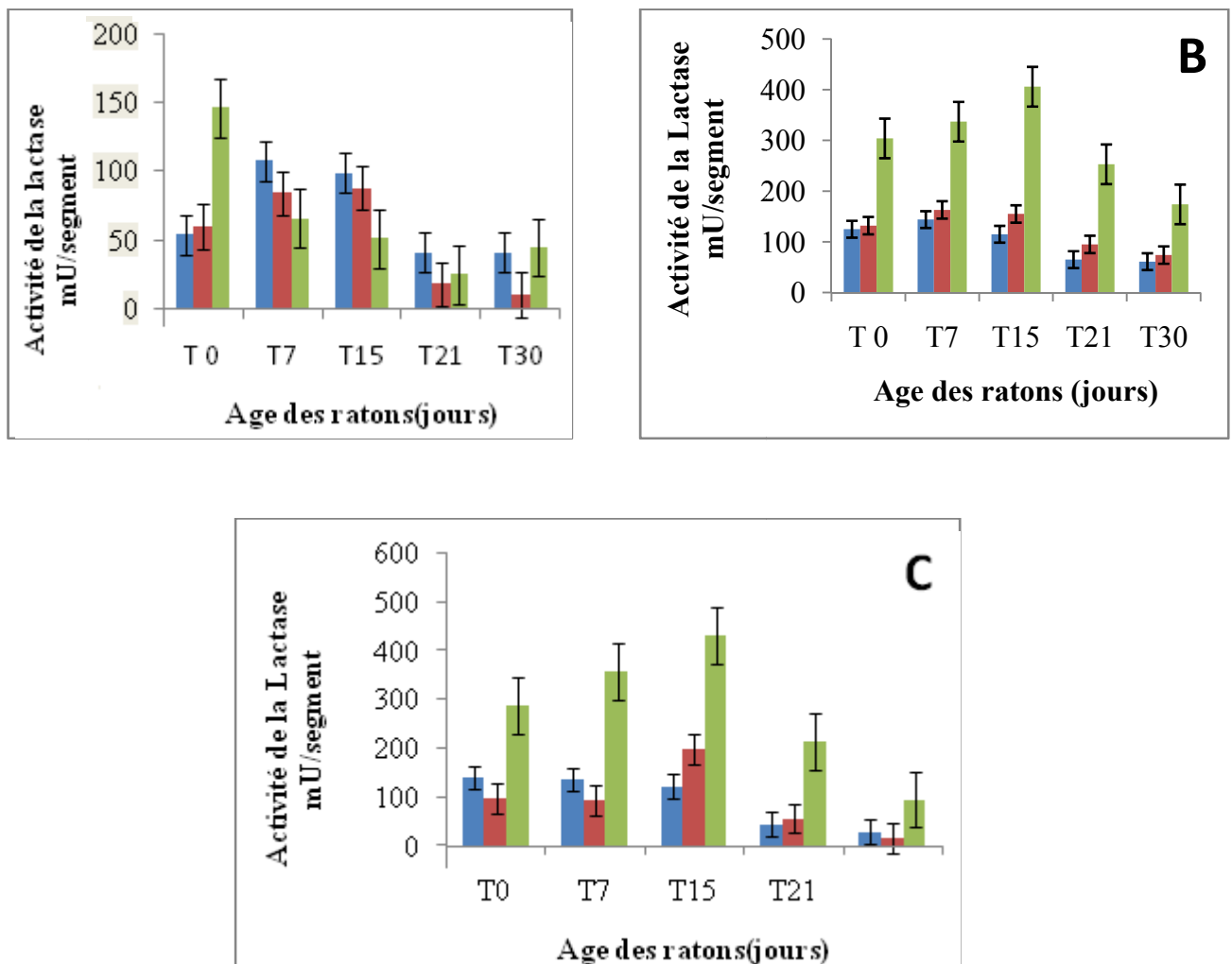


Fig 39 : Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à 380mg/Kg/pc de DEHP, DINP et DEP sur l'expression de la lactase au niveau du A) duodénum, B) jéjunum et C) iléon des rats au stade J0, J7, J15, j21 et j30 ($p < 0.001$).

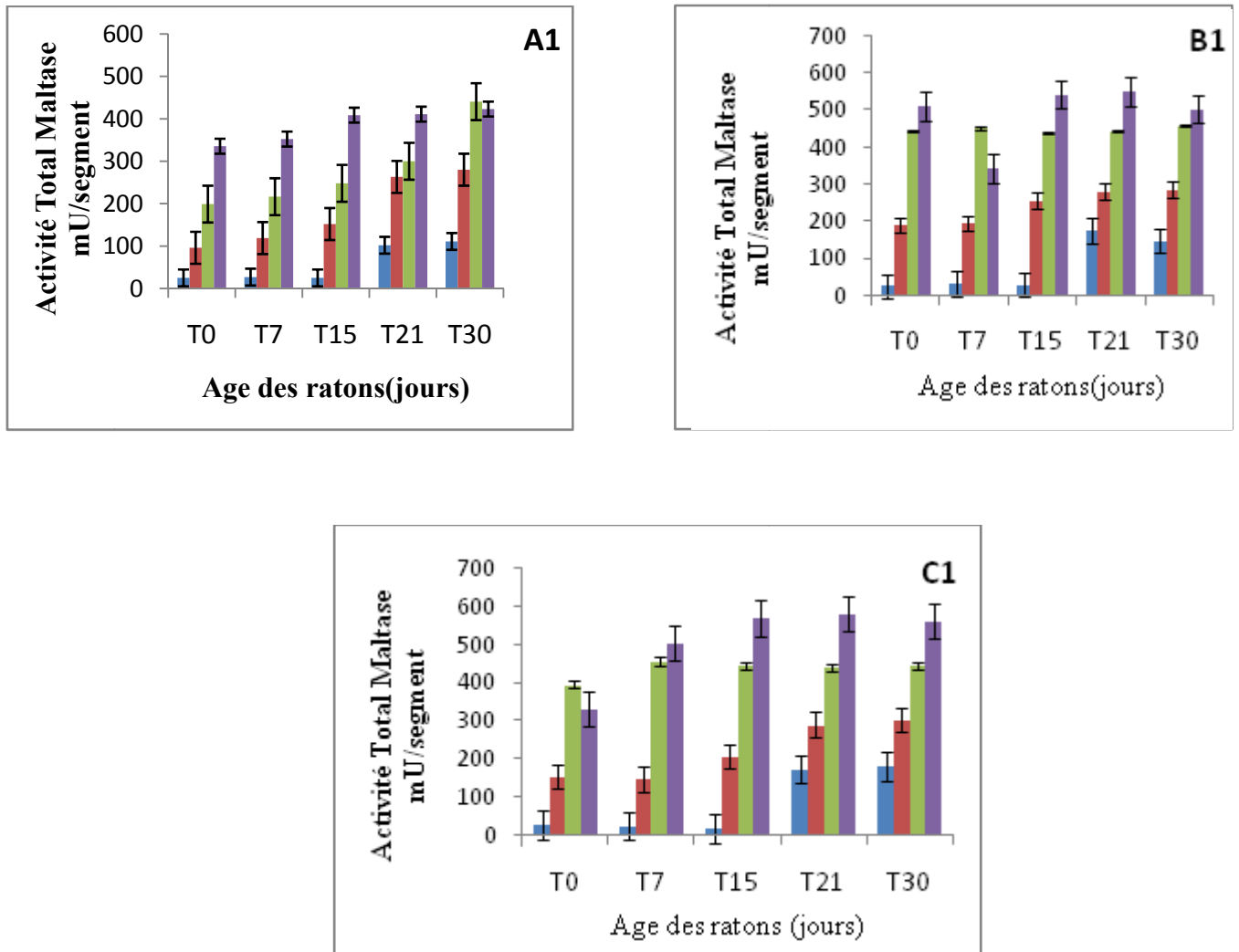


Fig40 : Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à 380mg/Kg/pc de DEHP, DINP et DEP sur l'expression des activités de la maltase au niveau du A) duodénum, B) jejunum et C) ileon des rats au stade J0, J7, J15, j21 et j30 ($p < 0.001$).

Phosphatase alcaline

La phosphatase alcaline est synthétisée de manière ubiquitaire dans l'organisme, au sein de la muqueuse intestinale sa présence est limitée aux entérocytes (**gharbi 2007**).

Dans la présente étude, l'analyse des modifications induites de l'activité de la phosphatase alcaline suite au traitement phtalates indique que l'expression de cette enzyme suit la même tendance que chez les témoins mais reste élevée chez le groupe traité durant toute la durée de l'expérimentation (**fig 41**).

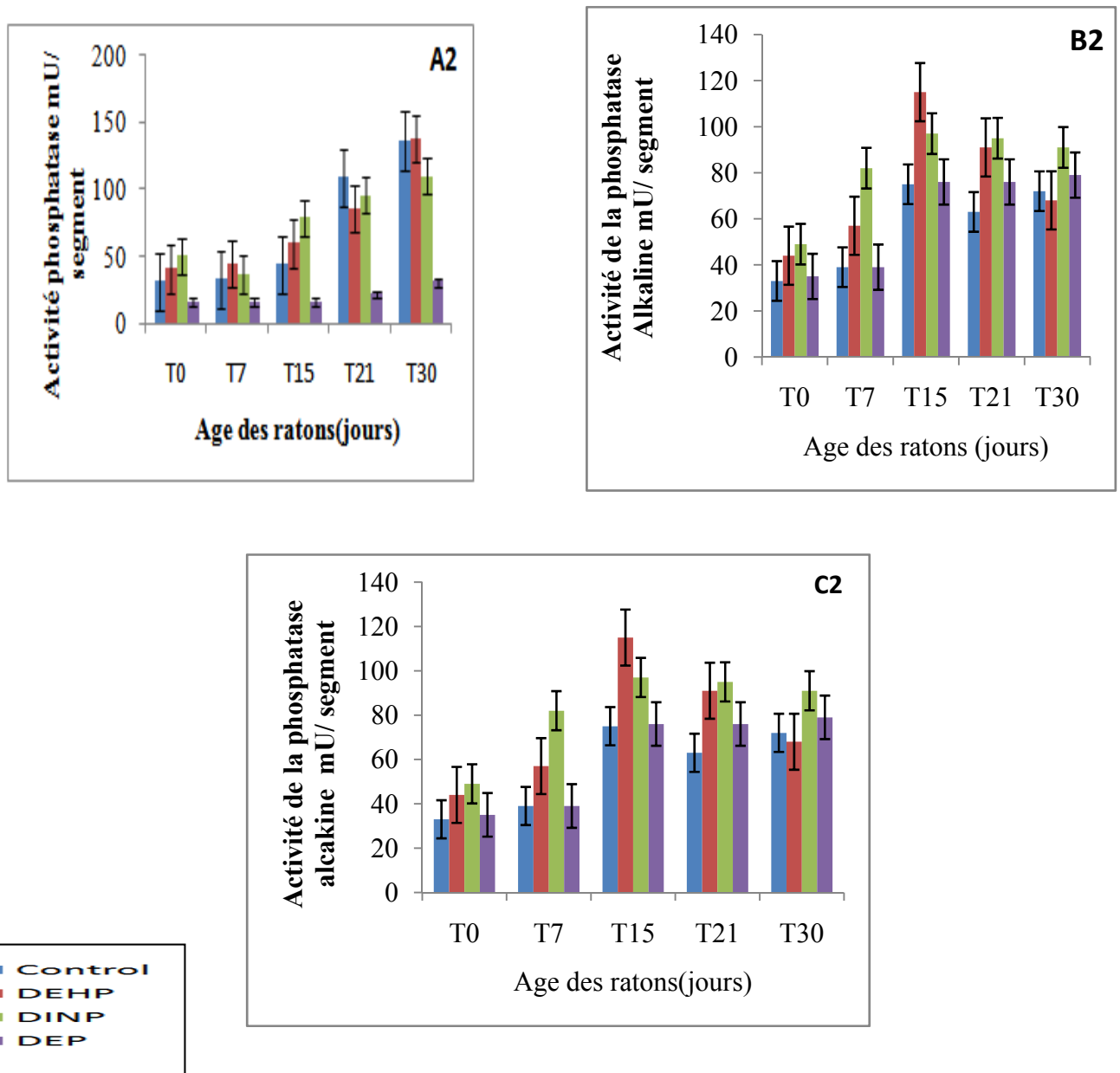


Fig41: Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à 380mg/Kg/pc de DEHP, DINP et DEP sur l'expression des activités de la phosphatase au niveau du duod, jej et ileon des rats au stade J0, J7, J15, j21 et j30 ($p < 0.001$).

L'activité de la phosphatase alcaline duodénale n'a pas significativement varié après traitement au phtalates, tandis que celle de la saccharase a augmenté entre le 14eme et 21eme jour d'expositions, puis est demeurée à un niveau stable jusqu'au 29 jours dans le duodénum. Au niveau de ce même compartiment l'activité chez les ratons du groupe DINP est significativement élevée à la naissance, mais diminue entre le 7eme et 21eme jours de traitement jusqu'à atteindre des valeurs équivalente au

Résultats

groupe témoin apres un mois d exposition ($P < 0,01$).

4.6 Effets des phtalates sur la teneur des protéines totales

Le taux de protéines est pratiquement faible dans les sept premiers jours de vie chez tous les groupes d'animaux à partir de cette période une augmentation remarquable est constatée, cependant pour les groupes traités ce n'est que vers le 20^{ème} jour que le taux de protéines s'élève progressivement dans le duodénum et atteint un niveau important que celui du groupe témoin vers le 30^{ème} jour .

L'analyse des protéines au fragment jéjunum indique une augmentation progressive au cours du vieillissement chez tous les groupes d'animaux. En outre les taux de protéines étaient plus importants dans ce fragment que dans le duodénum pour les groupes DINP et DEHP . Il est cependant intéressant de constater que dans la partie iléon la sécrétion de protéines était plus importante pour le groupe DINP.

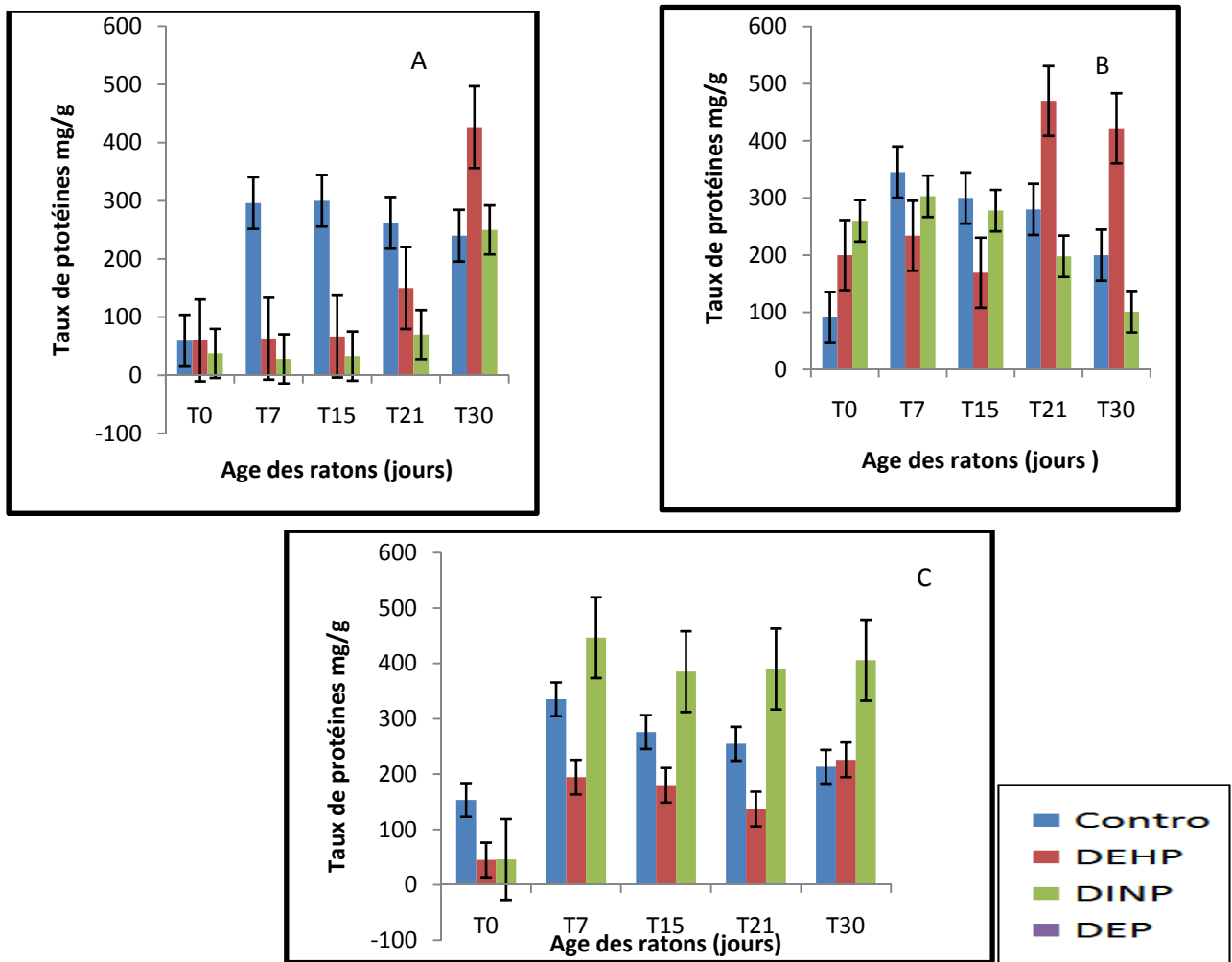


Fig42 : Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à 380mg/Kg/pc de DEHP, DINP et DEP sur l'expression des protéines totales niveau du A) duodénum, B) jejunum et C) iléon des rats au stade J0, J7, J15, J21 et J30 ($p < 0.001$).

Résultats

4.7 Effet sur la perméabilité intestinale



L'exposition aux DEHP et DINP a augmenté significativement le volume d'urine et de la matière fécale (tableau13).

Tableau 14 : impact des phtalates sur le volume urinaire (ml) et la masse de la matière fécale (g)

	Volume	pH	Matière fécale
Témoin 21	Fem/mal 2.5	7	Fem/mal 0.76/0.80
DINP T21	3.2/2.7	5	3.07/2.38
DEHP T21	5/3.3	4	3/2.13

Dans le groupe DINP 21 jours, le volume des urines était augmenté en comparaison avec les animaux témoins pour atteindre 5 ml chez les femelles, et 3.3 chez les males, tandis que le volume fécal était de 3.07mg pour les males 2.38 mg pour les femelles.

Plusieurs études ont montré que la perméabilité est élevée à la naissance et diminue avec le vieillissement.

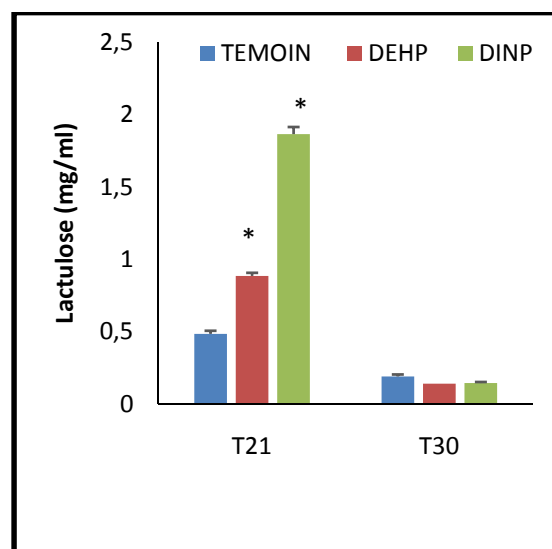
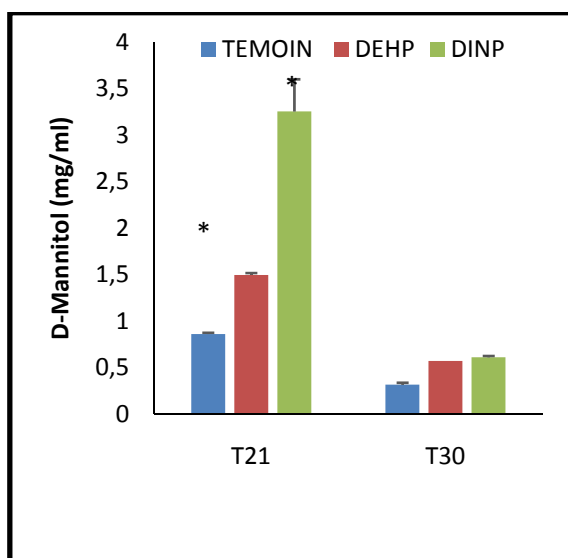


Fig 43 : Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à 380mg/Kg/pc de DEHP, DINP et DEP sur la perméabilité intestinale chez les rats âgés de 21 jours. ($p < 0.001$).

Les résultats montrent une augmentation de la perméabilité paracellulaire (Figure 43) à la 3^{ème} et

Résultats

et 4^{ème} semaine chez les animaux traités depuis la naissance par les phtalates. Les résultats obtenus indiquent une augmentation de la quantité totale de mannitol excrétée, ainsi qu'une augmentation des quantités totales de lactulose.

4.8 Effet sur les jonctions serrées

Dans ce travail, nous nous sommes concentrés sur l'étude des mécanismes sous-jacents potentiellement impliqués dans les effets des phtalates sur la perméabilité paracellulaire. La localisation histologique de l'occludine et la claudine 3 dans le duodénum, jejunum et l'iléon a été évaluée en utilisant la microscopie. Nos données montrent que chez les rats témoins âgés de moins de 21 jours la Cldn-3 est principalement localisée dans les cryptes aux jonctions intercellulaires et ce quelque soit le segment d'intestin (Fig 44 A, B, C). A partir du 21^{ème} jour postnatal la claudine se localise le long de l'axe crypto-villeux.

Chez les rats témoins l'occludine était principalement localisée dans le cytoplasme le long de l'axe crypto-villeux dans tous les groupes, avec le signal le plus abondant détecté dans le jejunum son expression reste constante pendant la période postnatale.

Néanmoins, l'intensité de marquage des protéines de jonctions serrées occludine et claudine 3 est diminuée dans le jejunum des sujets traités ($p < 0,01$)

Nous avons ainsi identifié que Cld3, un des constituants des jonctions serrées, était une cible moléculaire de DEHP, DINP et DEP. De nombreuses études menées dans des modèles cellulaires montrent que la diminution de l'expression de Cld3 et Ocl suite à l'exposition aux phtalates est associée à une augmentation de la perméabilité.

L'analyse en immunofluorescence de coupes de jejunum, iléon de rats et l'analyse en western blot des isolats de cellules correspondants ont permis de montrer une expression diminuée de Cld3 et Ocl associée au phtalates par rapport aux rats contrôles.

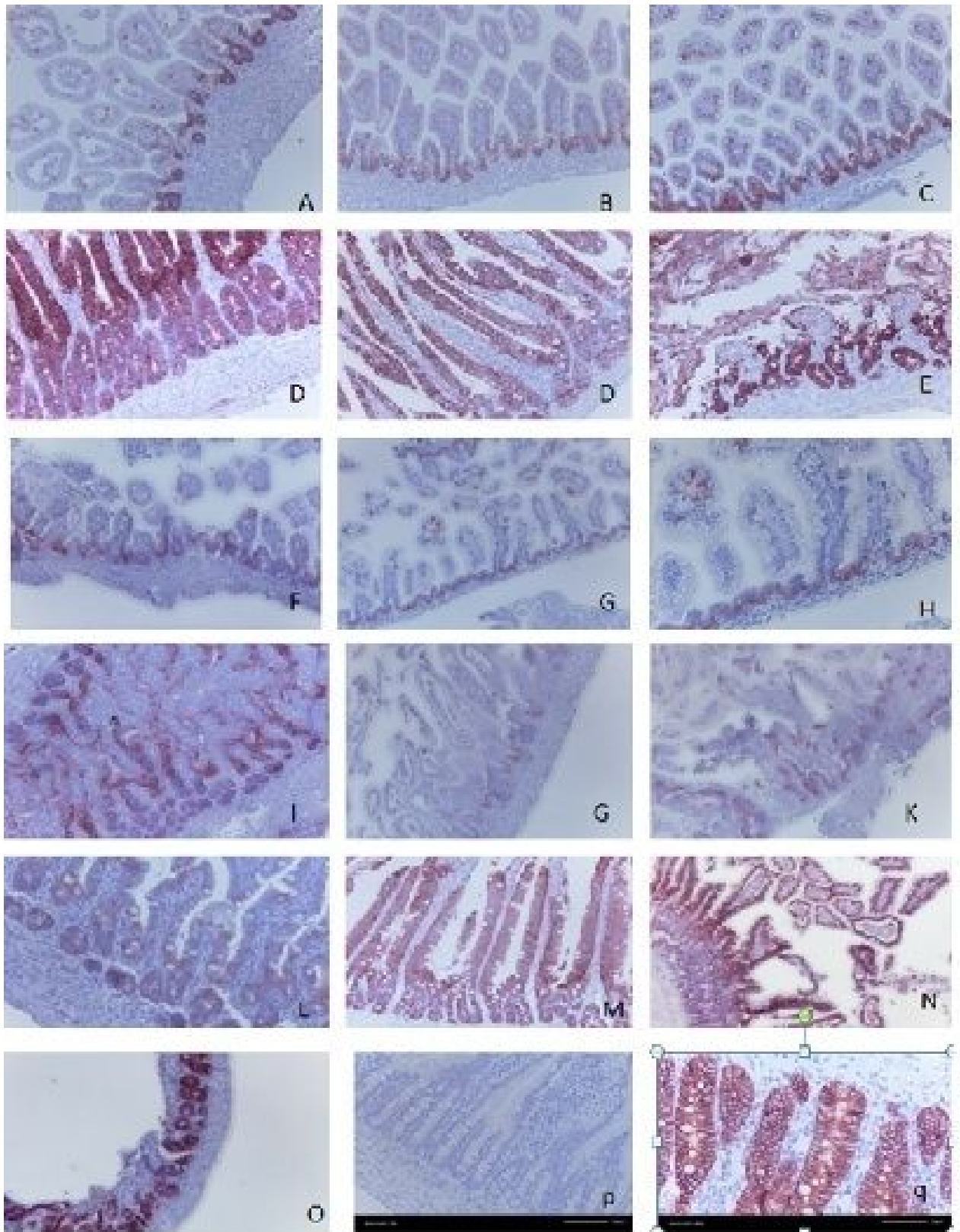


Fig44: Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à 380mg/Kg/pc de DEHP, DINP et DEP sur l'expression de la claudine 3 au niveau du duod, jej et ileon des rats au stade J0, J7, J15, j21 et j30

A) T 0 D B) T0J C) T 0 Ileon D) T30 D D) T 30 J F) DINP T0 D H) DINP 24 H ILEUM I)DINP T7 J J) DINP T7 J L)DINP T 15 J M) DINP T30 D N)DINP T30 JEJ O) DINP T 30 I P) T Négatif .
(T témoin ,D duodénum, J jejunum, I iléon)

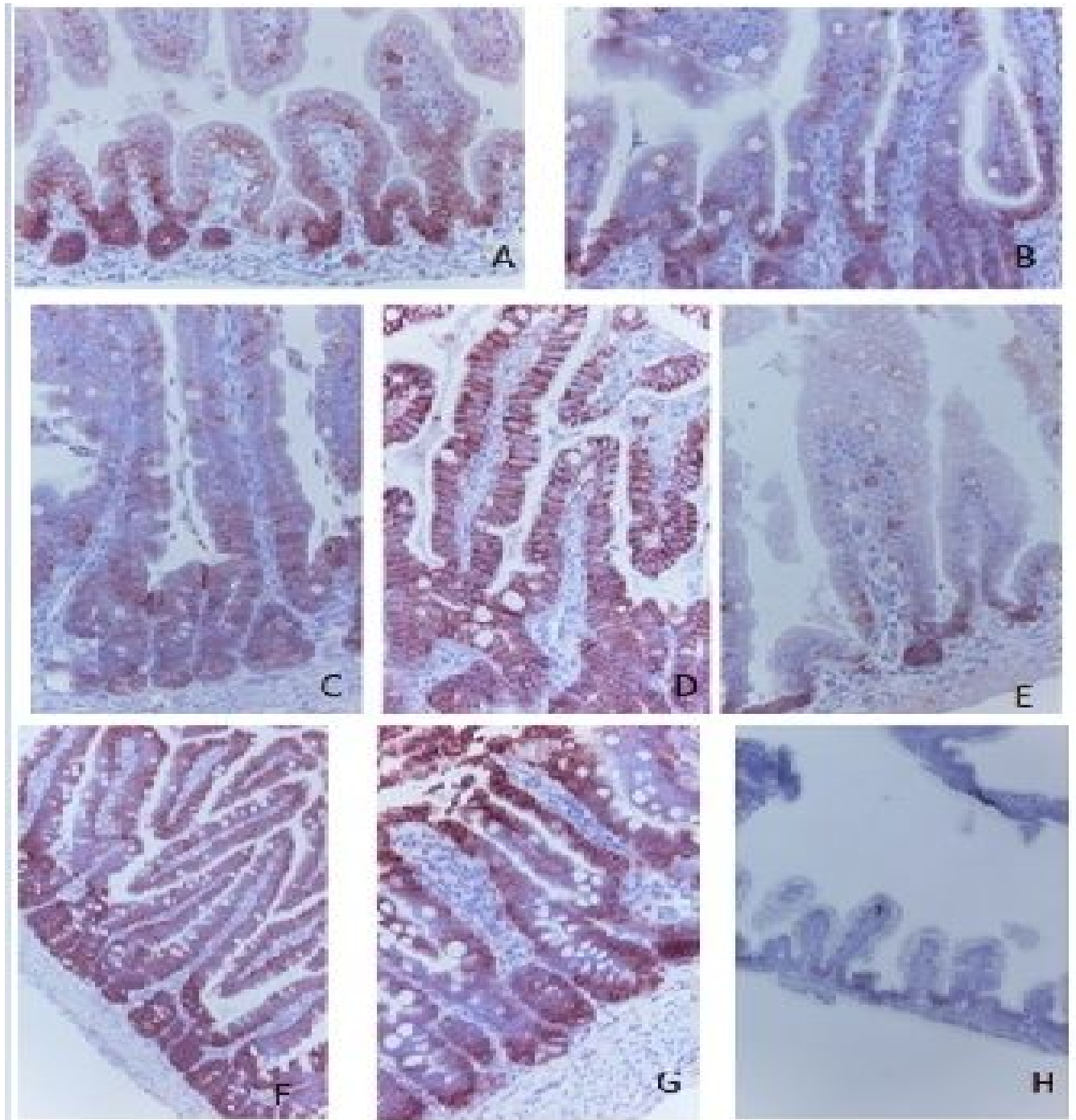


Fig45 (suite), Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à 380mg/Kg/pc de DEHP, DINP et DEP sur l'expression de la claudine 3 au niveau du duod, jej et ileon des rats au stade J0, J7, J15, j21 et j30

A) DEHP T7 J B) DEHP T 15 J C) DEHP T21 D) DEHP T21 J E) FEHP T7 I F) DEHP T30 J G).H) DEP T0 I

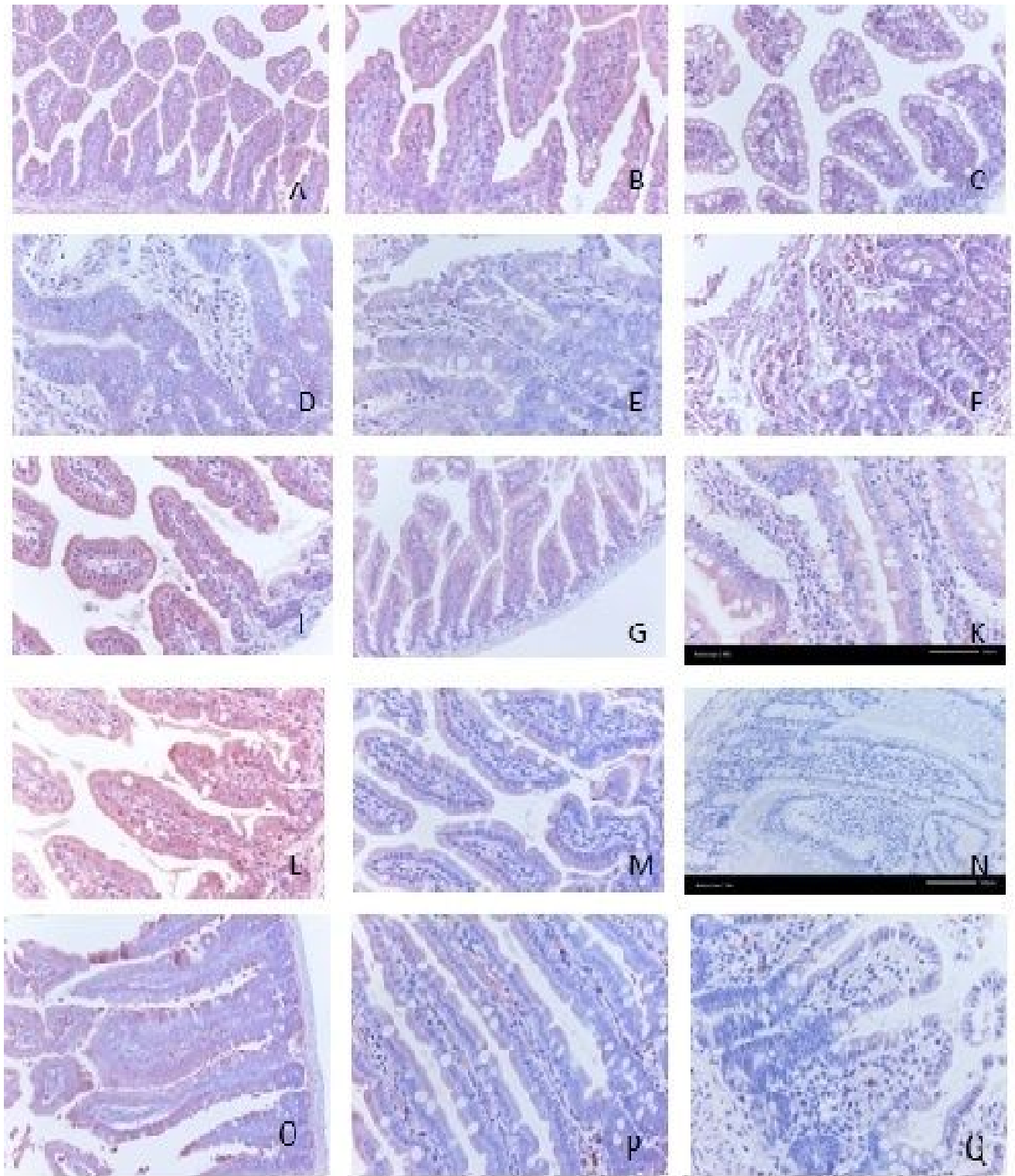


Fig 46 : Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à 380mg/Kg/pc de DEHP, DINP et DEP sur l'expression de occludine au niveau du duod, jej et ileon des rats au stade J0, J7, J15, j21 et j30 A) T0 D B)T0 D C)T0 ILEON D) T30 D E) T30 JEJ F) VPRIME G) DEHP T7 ILEON L) DEHP T15 D O) DEHP T21 D K) TEMOIN POSITIF N) T NEGATIF Q) DEHP T30 I

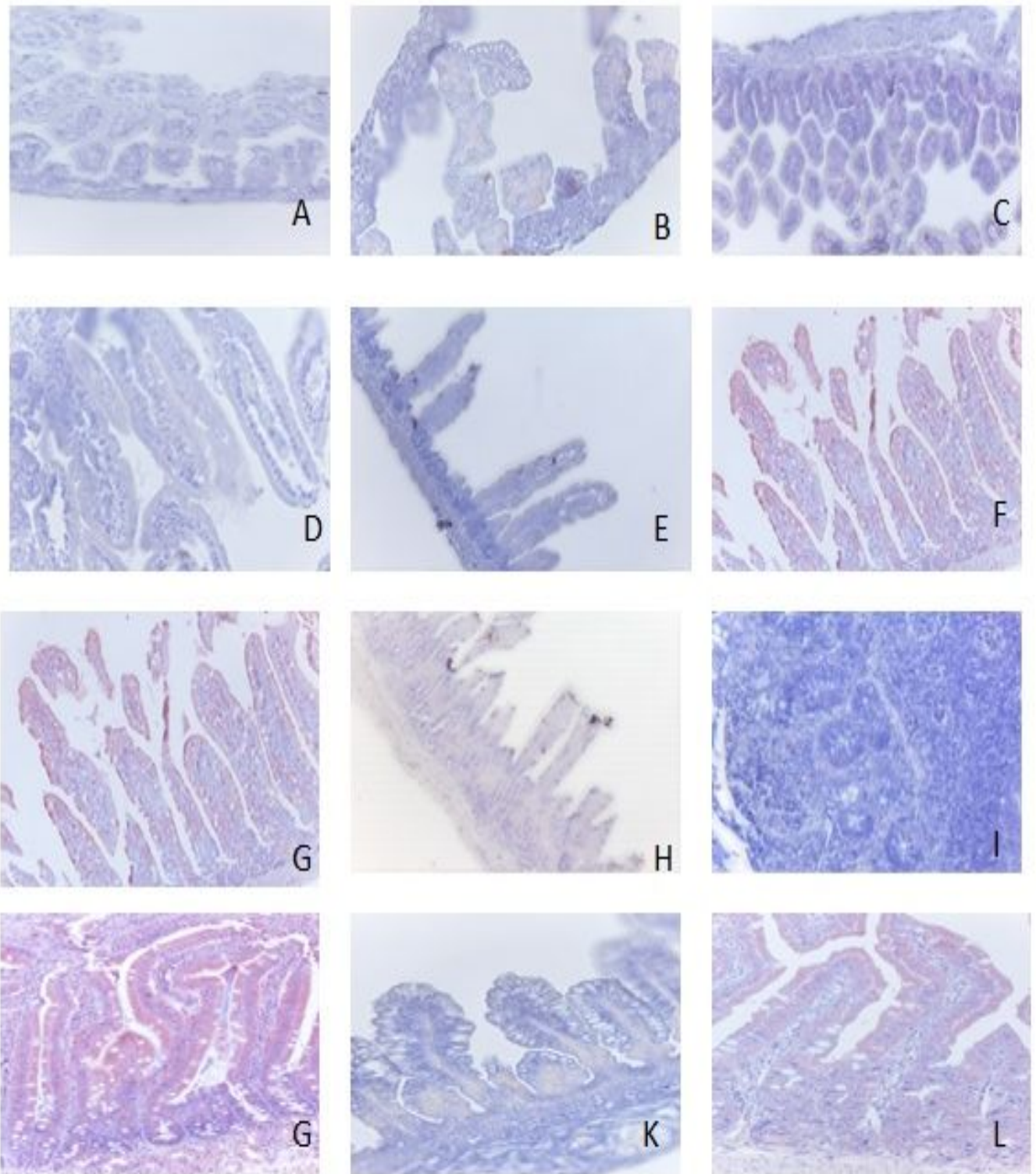


Fig47: Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à 380mg/Kg/pc de DEHP, DINP et DEP sur l'expression de l'occludine au niveau du duod, jej et ileon des rats au stade J0, J7, J15, j21 et j30 B) DINP 24 H I C)DINP T7 ILEON D) DINP T7 D E) DINP T7 JEJ G) DINP T15 J G) DINP T 30 D H) DINP T30 JEJ K) DEP 24 H ILEON L) DEP T21 J

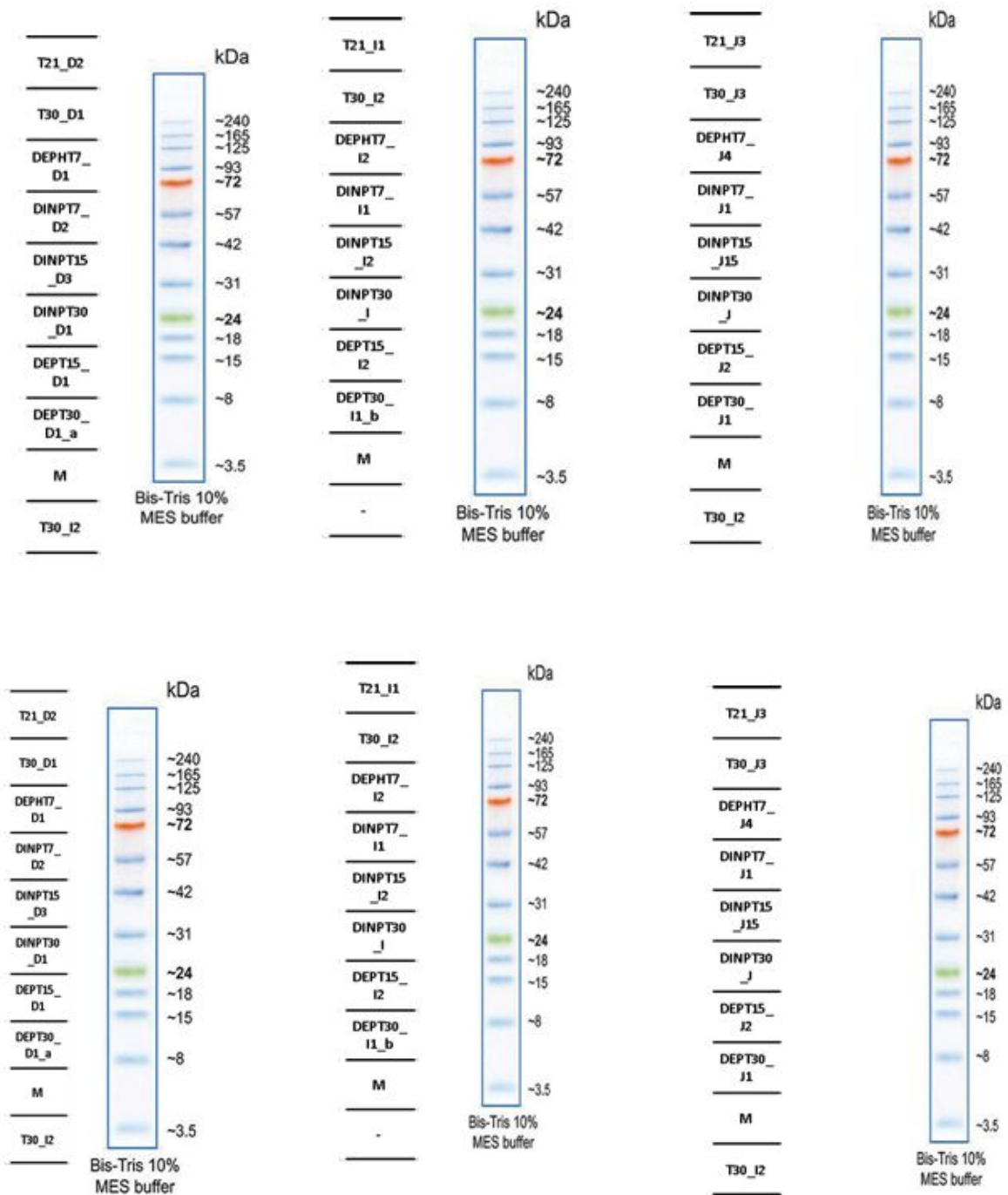


Fig48 : Western blot des protéines de jonctions serrées

Bien que l'association entre phénomènes de perméabilité accrue et protéines TJ élevées puissent sembler paradoxales, il est important de se rappeler que la structure de l'AJC est complexe. Certaines protéines de l'AJC sont connues pour resserrer la TJ (occludine, claudin 3) entraînant une perméabilité réduite, mais d'autres sont connus pour provoquer une perméabilité accrue (claudin 2). En outre, la localisation correcte de chaque protéine à l'AJC est essentielle au maintien de sa fonction appropriée.

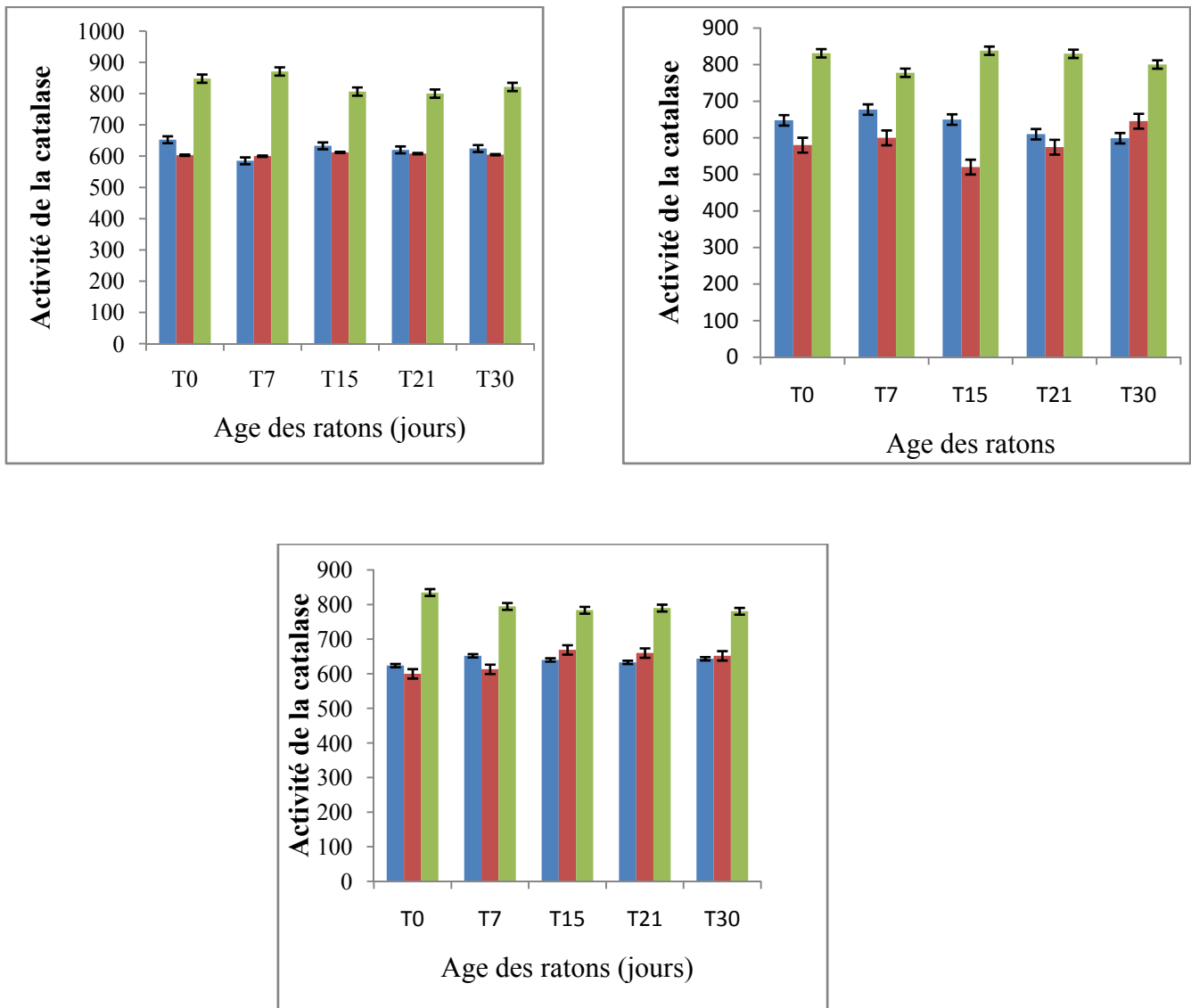


Fig49 : Effet des phtalates sur l'activité de la catalase. ($p < 0.001$).

4.9 Effet sur le statut oxydant

Catalase

Chez les rats témoins l'activité de la catalase était similaire pour les 5 groupes d'âges (0,7,15, 21,et 30) quelque soit le fragment d'intestin étudié. L'exposition au DEHP n'a pas modifié l'activité de l'enzyme au niveau du duodénum et l'iléon, une légère diminution est observée au niveau du jéjunum. Cependant l'exposition gestationnelle et lactationnelle au DINP induit une augmentation significative de l'activité de la catalase dans les trois fraction étudiées.

Résultats

L'activité de la catalase retrouvée au niveau de chaque fragment intestinal sous l'effet des phtalates est représenté dans la figure 49. Dans le premier fragment d'intestin (duodénum) l'activité enzymatique diminue légèrement chez les groupes d'animaux et reste légèrement inférieur chez les rats témoins jusqu'au 30^{ème} jour de vie. Cependant de t21 à t30 les tendances s'inversent et la teneur en protéines continue d'augmenter chez les groupes traités pour atteindre une valeur de 800ug/mg de mucus, mais elle augmente significativement chez le

TBARS

Au niveau sérique le taux des TBARS était significativement élevé chez les rats issus de mères traitées par DINP et DEP , une légère augmentation était provoqué par le DEHP.

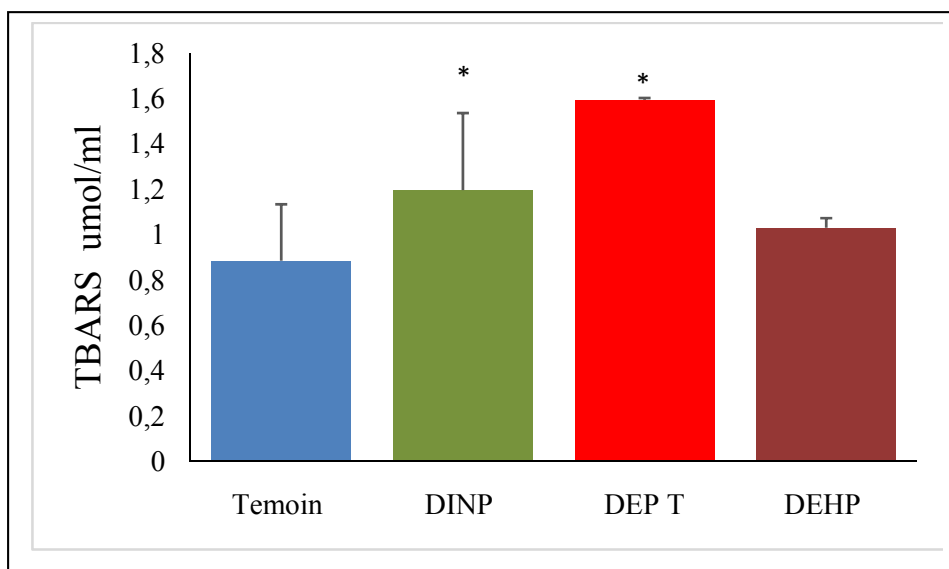


Fig50 : TBARS chez des rats âgés de 21 jours ($p < 0.001$)

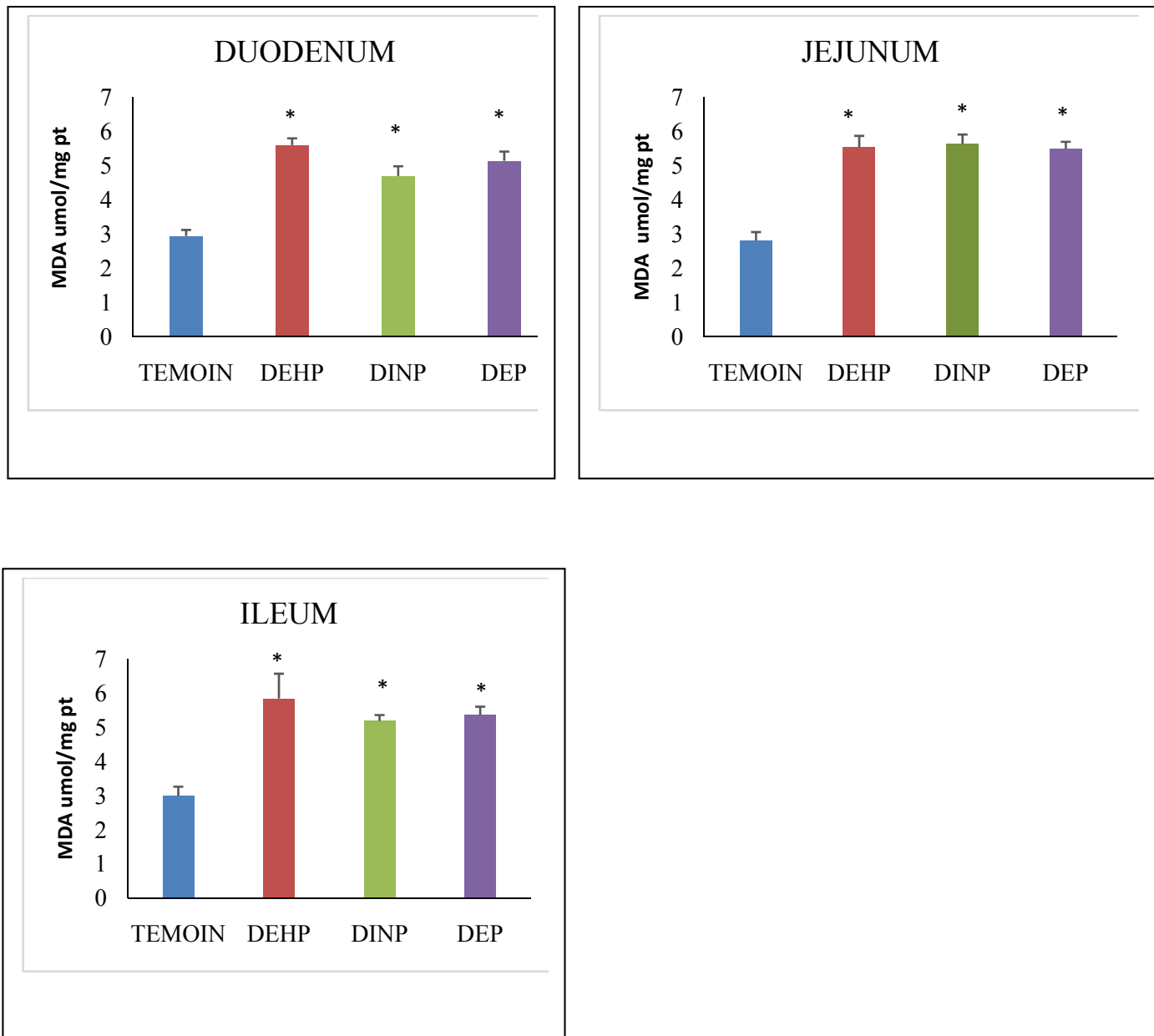


Fig51 : Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à 380mg/Kg/pc de DEHP, DINP et DEP sur le taux de MDA au niveau du duod, jej, ileon des rats ($p < 0.001$).

Stress oxydant

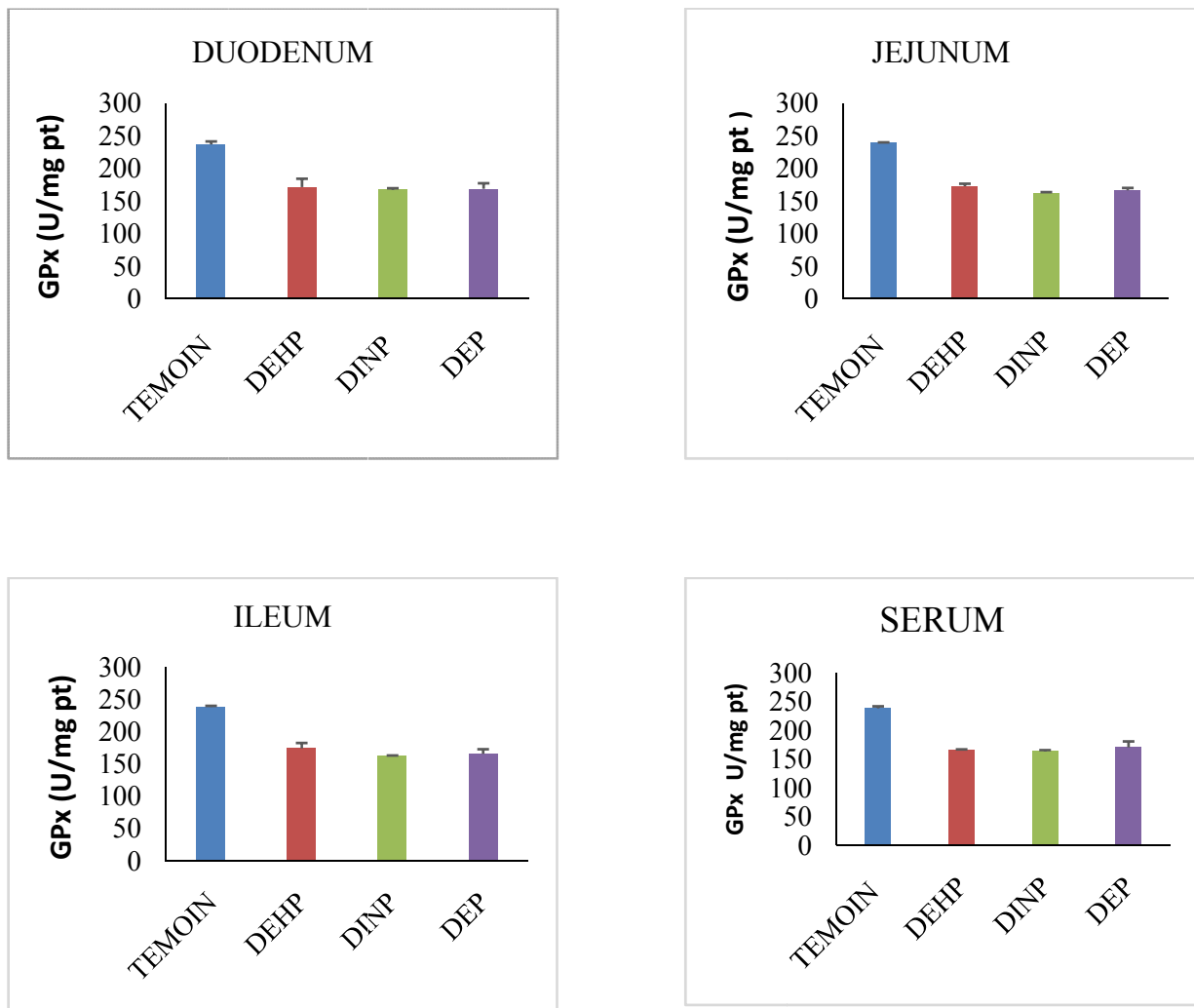


Fig52 : Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à 380mg/Kg/pc de DEHP, DINP et DEP sur l'activité de la GPx au niveau du duod, jej , ileon et serum des rats ($p < 0.001$).

Récemment, on a démontré que l'exposition au phtalates est associée à une inflammation et un stress oxydant avec l'activation des macrophages dans différents tissus. Dans la présente étude, nous avons montré que l'exposition des rats pendant la vie intra-utérine et après la naissance pendant un mois entraîne une baisse significative de l'activité des enzymes du stress oxydant notamment la Gpx ($p < 0.001$) et la SOD ($p < 0.001$) dans les trois fragments d'intestin.

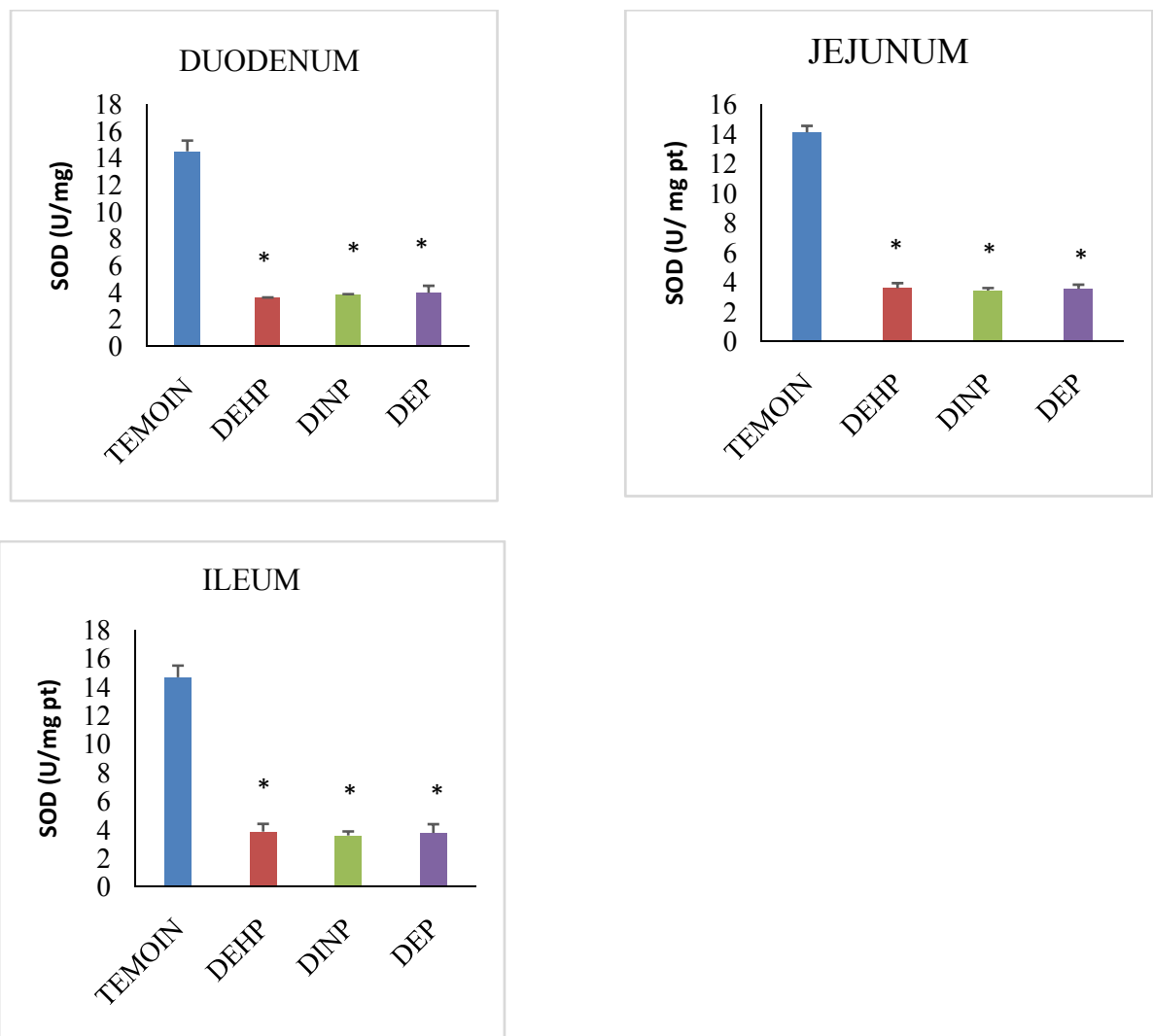


Fig53 : Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à 380mg/Kg/pc de DEHP, DINP et DEP sur l'activité de la SOD au niveau du duod, jej et ileon des rats ($p < 0.001$).

4.10 Effets sur les Cholesterol triglycerides HDL LDL

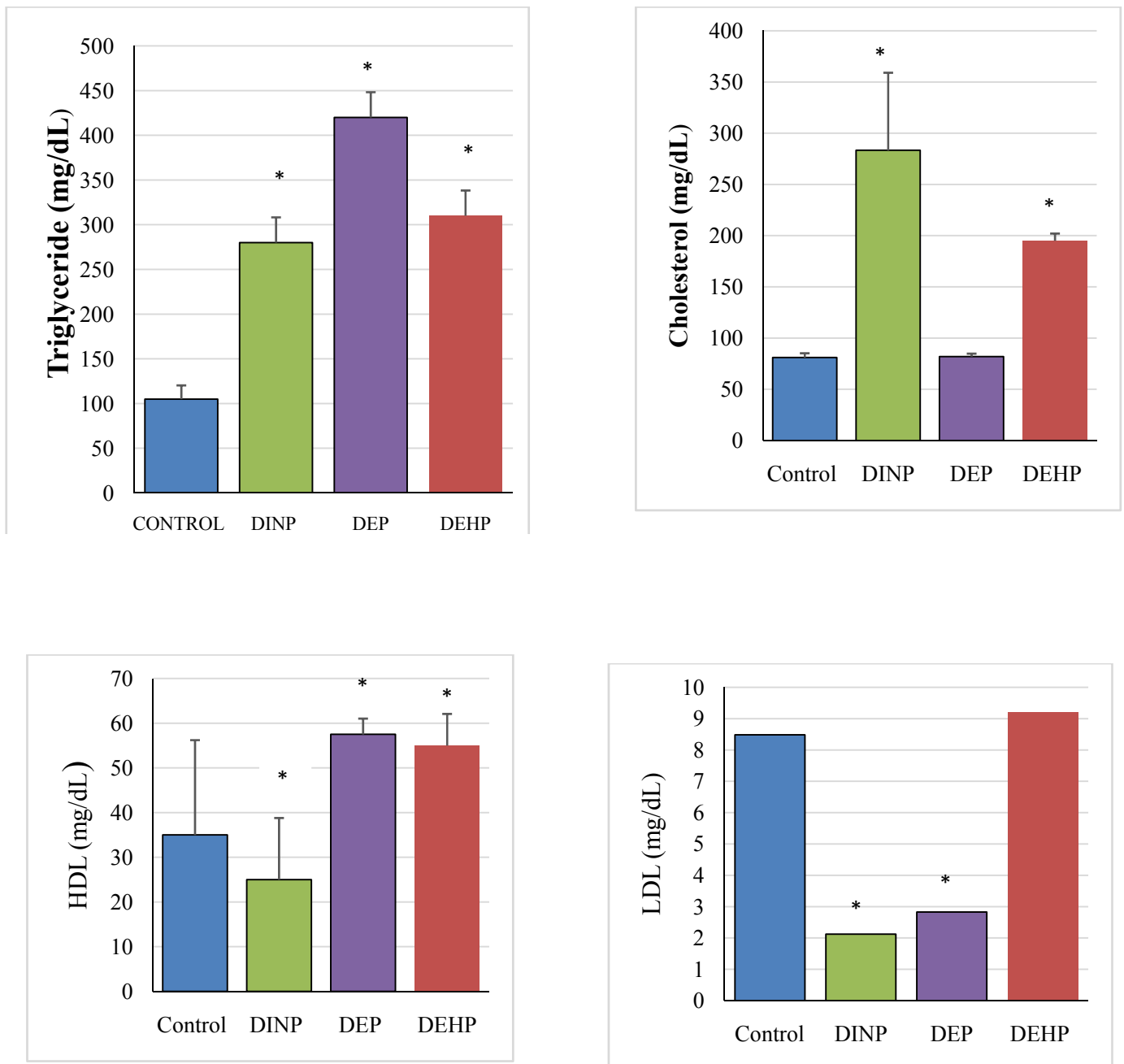


Fig 54 :_Effet des phtalates sur les triglycerides, cholesterol, HDL et LDL sérique
(p < 0.001).

Notre étude montre que l'exposition aux trois phtalates augmente significativement le taux des triglycérides (p < 0,0001), la hausse était remarquablement plus importante dans le groupe DEP, le cholestérol était également augmenté par le DEHP et DINP, cependant les LDL sont

Résultats

significativement diminués par le DINP et le DEP ($p < 0,0001$), une légère augmentation était notée chez le groupe DEHP mais sans être significative.

4.11 Effet sur la production des cytokines

Pour évaluer si l'intestin était une source pour l'augmentation des cytokines sériques, nous avons quantifié les taux de l'IL-6 et TNF. Les rats exposés à 380 mg de DEHP et DEP par kg et par jour ont montré une augmentation significative des taux sériques de TNF et de l'IL6. Au niveau tissulaire les mêmes phénomènes sont mis en évidence (duodénum ($p < 0,004$), jéjunum ($p < 0,0001$), cependant dans l'iléon du groupe DINP le traitement ne semble pas influencer la production du TNF

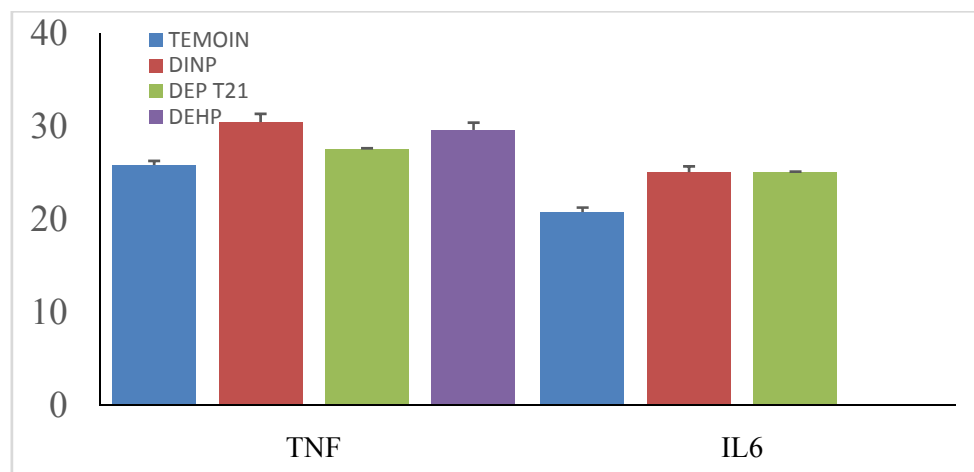


Fig 55 : Taux des cytokines au niveau sérique chez les rats âgés de 21 jours (témoins, traités (DEHP, DINP et DEP)).

Résultats

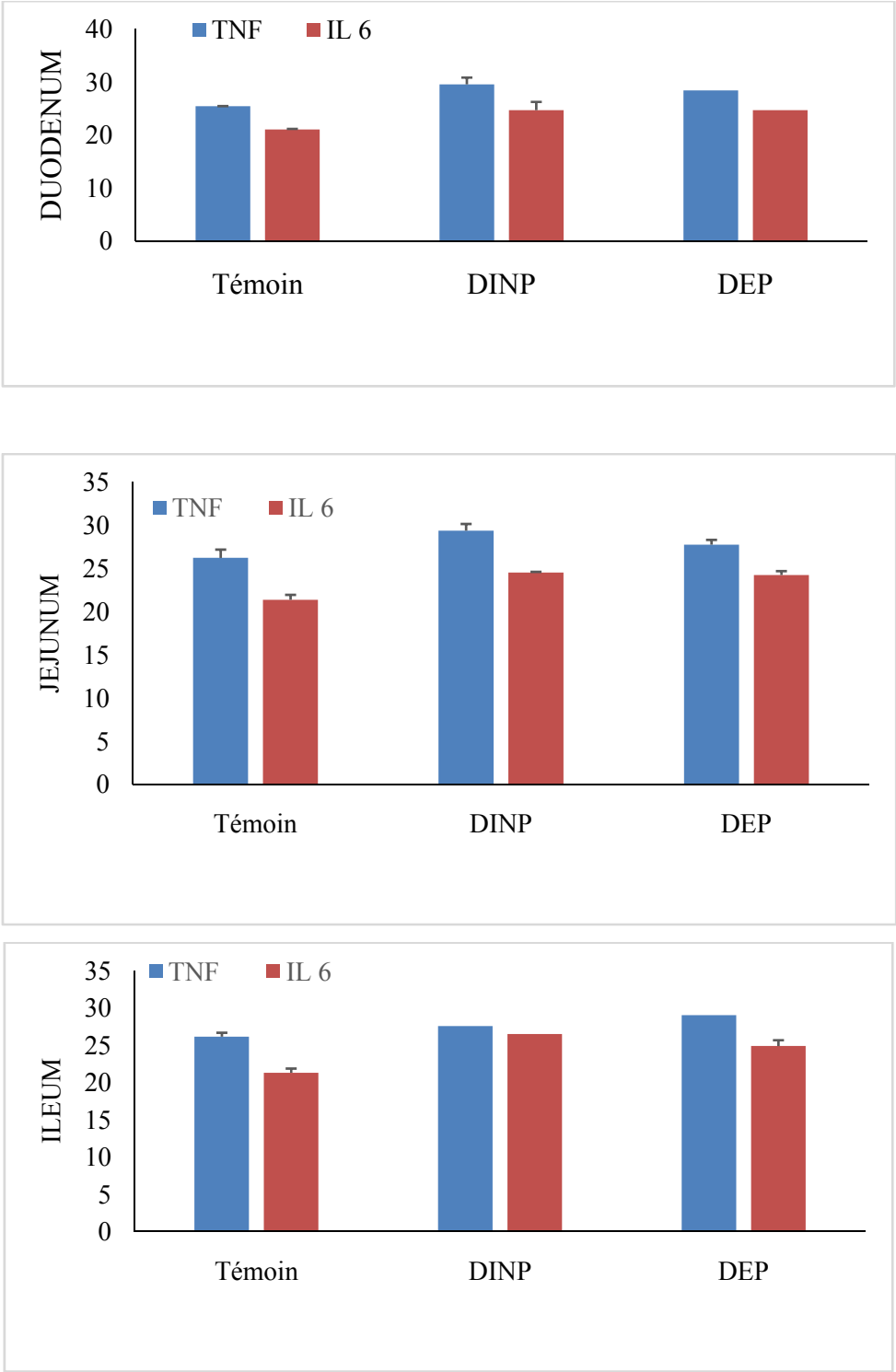


Fig 56 : Effet sur la production des cytokines au niveau tissulaire (duodénum, jejunum, iléon)

4.12 Biodisponibilité

Pour déterminer le taux d'absorption de DEHP, DINP DEP, leur quantité totale excrétée dans l'urine a été prise en compte.

Dans la présente étude, nous avons mesuré les niveaux des trois phtalates dans les urines de rats après une exposition de 21 et 30 jours via le lait maternel. Nos résultats révèlent que les trois phtalates DEHP, DEP et DINP étaient présents dans tous les échantillons d'urines de 24h récoltés de rats issus de mères traités.

Nos résultats montrent qu'une quantité de 16 ug/ml de DEHP étaient présente dans l'urine, des quantités faibles de DEP et DINP étaient également détectées.

Il est important de noter que même les échantillons témoins contenaient des phtalates, mais à des taux très faibles par rapport aux animaux témoins. Les échantillons ont été probablement contaminés.

4.13 Détermination de la teneur des lipides membranaires

Nos résultats montrent que l'exposition des rats *in utero* et pendant la période néonatale diminue entraîne des fluctuations dans le taux des lipides totaux. Le taux de cholestérol était significativement diminué ($p < 0,0001$).

Résultats

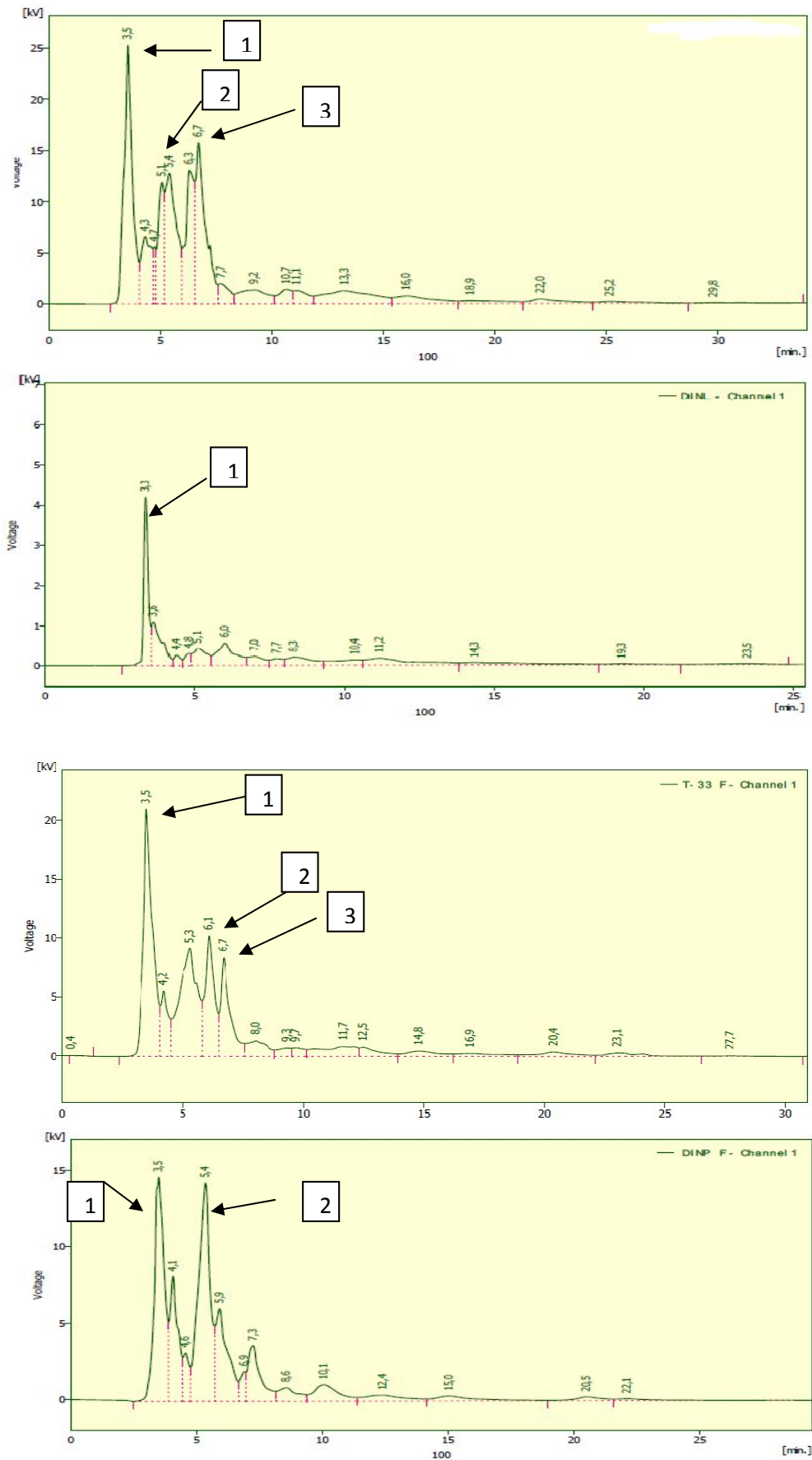


Fig 57 : Chromatogramme de DINP (1)DEP (2) et DEHP(3) dans les urines de rats

Discussion

Discussion

Afin d'évaluer les effets potentiellement néfastes des phtalates au cours du développement, plusieurs études menées chez les rongeurs ont soumis les mères à des doses faibles (ou fortes) pendant la gestation, ou chez le raton jusqu'au sevrage, ou les deux.

Les phtalates peuvent traverser la barrière placentaire et passer dans le lait maternel, avec un risque important sur le développement des fœtus et nouveau-né. Les métabolites des phtalates de longue chaîne tels que le MEHP et le phtalate de monoisononyle, en particulier, ont été trouvés dans des échantillons de lait vu leur liposolubilité croissante ce qui peut faciliter leur ségrégation dans le lait.

Plusieurs études ont démontré que l'exposition in utero et pendant la période néonatale aux phtalates peut entraîner une perturbation endocrinienne et altérer la fonction de reproduction chez l'homme et l'animale. Les concentrations utilisées dans cette étude sont plus élevées que celle auxquelles l'être humain est exposé. La dose journalière à laquelle les femmes sont exposées est d'environ 15 ug/kg/j, cependant dans les services de néonatalogie les nouveau-nés prématurés soumis à une nutrition parentérale sont exposés à des doses qui varient entre 10 et 20 mg/kg/j (**Loff et al., 2000**).

En plus pour corrélérer l'effet toxique observé chez les animaux avec des doses journalières pour l'être humain, des concentrations 10 fois plus élevées sont utilisées pour compenser les variations entre et intra espèces (**Xu Y et al., 2005**).

5.1 Développement des rats et maturation intestinale

Notre étude a permis de mettre en évidence pour la première fois l'implication d'une période temporelle critique, la période périnatale pour observer les effets toxiques des phtalates sur la maturation de la fonction intestinale.

Nous avons observé chez les animaux ayant été exposés aux phtalates en période néonatale une diminution significative du poids corporel dans les deux sexes en comparaison avec les témoins. La chute du poids des ratons observée dans notre étude corrobore avec d'autres travaux démontrant la diminution du poids chez les souris et rats issus de mères exposées aux DEHP et DBP. Un mécanisme d'action est proposé pour expliquer cet effet : les gènes incriminés dans le métabolisme des lipides tel que les PPARs. Le MEHP le métabolite majeur du DEHP est reconnu comme un activateur des PPARs incriminés dans le métabolisme des lipides et carbohydrates (**Desvergne et al., 2009 ; Grün et al., 2006**).

Nous avons aussi observé une diminution significative du poids du cerveau et rein chez les groupes de ratons traités aux phtalates, contrairement à plusieurs études menées chez les rats adultes et qui montrent une augmentation du poids de ces organes.

Discussion

Dans la littérature, il a été montré que les phtalates, appliqué pendant 10 jours chez le rat, entraîne une augmentation du foie (**Rusynet al., 2006**). Contrairement à cette étude, d'autres travaux ont démontré que le poids du foie, est diminué chez les rats nouveau-nés soumis à ces PEs.

Grande et al (2007) avaient reportés qu'une dose de 400 g de DEHP chez les rates Wistar exposées par gavage du jour 6 de gestation au jour 21 postnatal (sevrage), n'exerce aucun effet observé sur le poids des différents organes analysés (foie, rein, rate, thymus, thyroïde, ovaire et utérus). Mais là encore, les lignées de rats, les durées d'administration et les doses diffèrent entre les études ce qui rend leurs résultats difficilement comparables.

Cependant, il est à noter que le profil de réponse varie avec la dose, le sexe et l'âge étudié

Dans cette étude, nous avons observé des fluctuations dans l'expression des protéines. Des études réalisées chez le porcelet montre que la maturation intestinale en période néonatale a révélé des taux de protéines intestinales proches à celle révélée chez notre modèle pendant les dix premiers jours (**Grant et al., 1990**). Une étude réalisée chez le porc en période néonatale a indiqué que la teneur en protéine dans le jéjunum à 26 jours est moins importante à celle mesurée à t7, cela démontre que la synthèse des protéines durant cette période chez cet animal diminue avec le vieillissement. (**Davis., 2002**).

5.2 Perméabilité intestinale

A la naissance, la BEI est très perméable et la période postnatale est associée à une diminution de la perméabilité intestinale ou clôture de l'intestin (gut closure) (**Vukavić., 1984**) alors que le vieillissement est au contraire associé à une augmentation de la perméabilité intestinale (**Mullin et al., 2002; Tran ; Greenwood-Van Meerveld, 2013; Man et al., 2015 ; Vanaecke, 2016**).

Néanmoins, si la diminution de la perméabilité intestinale est globalement retrouvée chez les mammifères, des spécificités propres à certaines espèces existent en termes de variations et de temporalité (**Pohl et al., 2015 ; Vanaecke, 2016**).

Des études ont montré que la perméabilité intestinale était plus élevée chez le nouveau-né prématuré par rapport aux nouveau-nés nés à terme, (**Van Elburg et al., 2003**). Cependant, elle diminue rapidement au cours de la première semaine pour devenir semblable à celle de l'enfant né à terme vers le 7ème jour postnatal (**van Elburg et al., 2003**). Une diminution de la perméabilité intestinale de l'enfant né à terme a été décrite dans deux études publiées. (**Catassi et al., 1995 ; Kalach et al., 2001**). D'autres auteurs rapportent une diminution

Discussion

rapide du ratio L/M chez le nouveau-né à terme durant les 10, ou 20 premiers jours de vie après la naissance (**Castellaneta., 2005 ; Francavilla., 2006**). La perméabilité intestinale semble diminuer avec l'alimentation entérale (**Rouwet et al., 2002; Taylor et al., 2009**), et l'ingestion de lait maternel (**Catassi et al., 1995**).

La perméabilité intestinale a été mesurée chez nos animaux entre la 3^{ème} et la 4^{ème} semaine de vie. Nous avons pu observer que la perméabilité à 30 jours de vie était inférieure à celle observé au 21^{ème} jour postnatal, cela corrobore avec des études in vivo chez des rongeur et mammifères comme la souris, le rat, le cochon d'Inde), lagomorphe (lapin), et cétartiodactyle (porc) montrant une diminution de la perméabilité intestinale transcellulaire et paracellulaire au cours de la période postnatale. En particulier, chez le rat et la souris, la diminution de perméabilité paracellulaire est visible autour de la 3^{ème} semaine de vie (**Patel et al., 2012; Moussaoui et al., 2014**). En effet, il a été montré chez le rat, âgé de 10 à 14 jours, que le passage de trois marqueurs de perméabilité transcellulaire (i.e. IgG bovine, albumine de sérum bovin et dextran 70 kDa) était élevé alors que celui-ci était considérablement réduite à 18 jours et totalement arrêté pour deux des trois marqueurs à 22 jours. La fermeture de la BEI du rongeur s'effectue donc plus tardivement que chez l'homme alors que chez le porc, ce phénomène se produit dans les heures suivant la naissance (**Vanaecke., 2016**).

Nous avons démontré lors de cette étude que les trois phtalates étudiés augmentaient la perméabilité intestinale chez les rats âgés de 21 jours. Il a été démontré que des facteurs environnementaux tels que l'alimentation (les phyto-oestrogènes ou l'alcool), les bactéries pathogènes ainsi que le stress jouent un rôle dans l'altération de la perméabilité intestinale (**Moussa et al., 2012 ; Ferrier et al., 2006**).

Afin de corrélérer l'influence de cette altération de perméabilité à une modification structurale et fonctionnelle de la membrane plasmique des entérocytes, une analyse par microscopie a été réalisée. Nous nous sommes intéressés à la localisation et à la quantification de deux protéines de jonction serrées (Occludine et Claudine) au sein du tractus gastro-intestinal, plus particulièrement dans le jéjunum et l'iléon. Parmi les membres de la famille des claudines, les claudines 2 à 5 et 2 à 4 seraient exprimées dans l'intestin du rat et de la souris, respectivement (**Rahner et al., 2001; Tamagawa et al., 2003**), et l'expression de claudin-1, -3, -4 et -5 est observée dans l'intestin humain (**Bugel et al., 2002**). Il y a aussi des variations dans les niveaux d'expression et localisation subcellulaire de ces claudines à travers les segments du tractus intestinal et / ou le long de l'axe crypto-villeux (**Rahner et al., 2001; Tamagawa et al., 2003**). Dans cette étude, nous avons pu observer chez les rats témoins des changements

Discussion

dans l'expression et la localisation de la claudine au cours du temps, nos observations sont en accord avec la littérature. L'expression mature et la localisation de la claudine 3 se produisent à la 3^{ème} semaine postnatale chez la souris, ce qui coïncide avec la maturation de la perméabilité intestinale. L'expression de l'ARNm des claudine 3 atteint un pic à la 3^{ème} semaine après la naissance, le même âge auquel la perméabilité intestinale postnatale diminue de manière significative. L'augmentation significative de l'expression de la claudine 3 à l'âge postnatal de 3 semaines, a permis de proposer l'hypothèse que la claudine 3 est un médiateur potentiel de la diminution de la perméabilité paracellulaire observée à l'âge de 3 semaines postnatales .

L'augmentation de la perméabilité paracellulaire s'accompagne généralement d'altérations structurales des jonctions serrées avec une phosphorylation accrue des chaînes courtes de la myosine ainsi qu'une réduction de l'expression de ZO-1 et un retard de son internalisation **(Gecse et al., 2008)**.

Nous avons montré qu'une exposition gestationnelle et pendant la lactation au DEHP, DINP et DEP des mères entraînent une diminution de l'expression de deux protéines de jonctions serrées (claudine 3 et occludine) ce qui est une observation tout à fait concordante avec la littérature.

L'expression de l'occludine, reste relativement constante tout au long du développement postnatal. Au cours du développement, la fonction de barrière intestinale chez les rongeurs se développe au cours des 3 premières semaines de vie grâce à l'établissement de la flore intestinale. La colonisation bactérienne commensale induit la maturation de la fonction de barrière intestinale en favorisant l'expression de la claudine-3 chez la souris.

La TJ est une structure dynamique et peut être démontée et réorganisée en réponse à divers stimuli intracellulaires et extracellulaires. À ce jour, plusieurs substances toxiques pouvant affecter les TJ SC ont été rapportées, notamment le bisphénol A **(Fiorini et al., 2004; Li et al., 2009)**, l'octylphénol **(Fiorini et al., 2004)**, le DEHP **(Sobarzo et al., 2009)** et MEHP **(Zhang et al., 2008; Yao et al., 2010 ; Li et al., 2009)**.

Li et al (2009) ont rapporté que le BPA, un toxique environnemental oestrogénique, induisait une réduction de l'occludine et du ZO-1 par l'activation du p45 / 42 MAPK pathway. De même, Fiorini et al (2004) ont rapporté que le BPA et l'OP, ayant également une activité œstrogénique, réduisaient les niveaux d'expression de l'occludine, mais n'altéraient pas l'expression de ZO-1. Je

Dans les cellules exposées au BPA (10 nM), la coloration à l'occludine et à la JAM-A était nettement augmentée au niveau de la TJ. L'estradiol améliore donc l'expression de l'occludine

Discussion

et de la molécule d'adhésion jonctionnelle (JAM) -A, deux protéines transmembranaires qui scellent les espaces intercellulaires aux jonctions serrées apicales (TJ)

L'expression de la protéine de jonction serrée occludine a diminué en réponse à l'exposition au MEHP in vivo et in vitro. Aucun changement significatif dans les niveaux du ZO1 la protéine n'a été détectée, tandis que les taux de protéine claudin11 ont légèrement diminué après exposition au MEHP (jusqu'à 87% in vivo et 89% in vitro à 12 h d'exposition par rapport aux témoins) (Pei-Li Yao et al., 2010). Dans cette étude, il a également été démontré que le MEHP induit des diminutions significatives des niveaux d'expression de l'ARNm de la claudine-11 et de l'occludine dans les CS du rat, de nombreuses études sur les animaux et les cultures cellulaires indiquent qu'elles ont un rôle crucial dans la structure et la perméabilité des jonctions serrées dans l'épithélium intestinal (Al-Sadi et al., 2011). Des souris ayant subi une mutation au niveau du gène codant pour l'occludine, ont montré une densité et une organisation de jonctions serrées dans l'épithélium intestinal équivalent à celle observées chez les souris de type sauvage (Saitou et al., 1998). Une étude a démontré que les anomalies histologiques et fonctionnelles sont présentes dans différents tissus chez la souris mutée au niveau de l'occludine (Saitou et al., 2000). Dans une étude plus récente utilisant des cellules intestinales Caco-2, la souris mutée au niveau des occludines a induit une augmentation de la perméabilité paracellulaire (Al-Sadi et al., 2011).

Dans notre étude nous avons remarqué une diminution du taux des lipides totaux, cela est dû au pouvoir pro-oxydant des phtalates conduisant à une élévation du taux des TBARS ce qui affecte l'intégrité et la fonction de la membrane de l'enterocyte. Le cholestérol quant à lui, intervient dans le maintien de la fluidité membranaire, sa perméabilité ainsi que dans la régulation de la structure des biomembranes. La présente étude montre une diminution du taux de cholestérol membranaire, ces variations peuvent réduire l'affinité (effecteur-récepteur) et influencer la transduction de signal et les réponses aux stimuli.

5.3 Risque inflammatoire de la muqueuse intestinale

L'épithélium intestinal, qui participe à l'immunité innée comme première ligne de défense physique et sa capacité à produire et libérer des cytokines, est largement impliqué dans le maintien d'une homéostasie intestinale. Les cellules épithéliales, qui forment normalement une barrière « étanche », peuvent être à l'origine d'une activation excessive du système immunitaire en cas de perméabilité intestinale accrue, favorisant l'apparition d'un état inflammatoire (Turner., 2006).

Chez le rat nouveau-né, nous avons exploré l'état inflammatoire de la muqueuse intestinale dans les régions jéjunale et iléale en réponse au traitement par les phtalates. Pour ce faire, le

Discussion

dosage des cytokines proinflammatoires IL6 et TNF α a été effectué. Les résultats montrent qu'une exposition aux phtalates induit une augmentation de la sécrétion d'IL6 et du TNF α chez les animaux traités suggérant un profil pro-inflammatoire.

Il est bien admis chez le rat nouveau-né comme chez la souris que les réponses immunitaires des lymphocytes T et B sont faibles à la naissance (**Adkins et al., 1999 ; Perez-Cano et al., 2012**), la fonctionnalité des réponses immunitaires n'étant pas encore totalement acquise en période de lactation (**Perez-Cano et al., 2012**). De précédents travaux au laboratoire ont par ailleurs montré que des cytokines pro-inflammatoires telles que TNF α et IL1 β étaient mesurables à l'état basal dans le côlon du nouveau-né de 10 jours, mais très en-deçà du niveau basal atteint chez l'adulte (**Braniste et al., 2009**). Si ces données montrent que le raton à un âge précoce présente tous les acteurs pour élaborer une réponse inflammatoire, nos résultats concluent qu'une exposition gestationnelle et pendant la lactation déclenche une réponse immunitaire de cet ordre dans les muqueuses intestinales

L'expression et la localisation des protéines des jonctions serrées est notamment influencée par de nombreux facteurs. Les cellules inflammatoires, les médiateurs de l'inflammation (IFN, TNF, IL-4, IL-13) ou encore les pathogènes (*Escherichia coli*, toxines de *Clostridium difficile*...) augmentent la perméabilité intestinale paracellulaire *via* une action sur les protéines constituant les jonctions serrées (en modifiant la structure ou la distribution des protéines) ou sur le cytosquelette d'actine les soutenant (**Yuhan et al., 1997 ; Sears et al., 2000**).

Stress oxydant

Les enzymes antioxydantes sont une partie essentielle de la cellule défense contre ROS. Les effets du stress oxydatif pourraient être atténués par des enzymes antioxydantes, telles que la SOD, le GPx, le CAT, TPS et GR. La SOD neutralise la toxicité de l'oxygène en catalyser la dismutation de l'anion superoxyde en hydrogène peroxyde et oxygène moléculaire alors que GPx détoxifie peroxydes d'hydrogène et de lipides et module les récepteurs sensibles à l'oxydoréduction voies de signalisation.

Au niveau embryonnaire, la plupart des activités enzymatiques antioxydantes ne représente que 5% environ de l'activité maternelle (**Wells et al., 2005**). Les embryons au stade précoce d'organogenèse sont particulièrement sensible aux agressions toxiques pendant la phase de transition métabolisme anaérobie à aérobie coïncidant avec la maturation de la structure et de la fonction mitochondriales. Dans la présente étude, nous avons observé qu'une exposition périnatale au phtalates induit chez les nouveau-nés une diminution de l'activité de la SOD et

Discussion

Gpx et une augmentation du taux des MDA, nos résultats corroborent avec la littérature. Ainsi le stress oxydatif induit par les phtalates entraîne une diminution de la capacité antioxydante, en particulier de la GPX (glutathion peroxydase) et GST (glutathion S-transférase) **(Asghari et al., 2015)**. En plus une augmentation de la peroxydation lipidique, CAT (Catalase) et l'activité de la superoxyde dismutase SOD (Cu / Zn superoxyde dismutase) a été observée **(Asghari et al., 2015)**

Il est mentionné que les cellules de Kupffer sont un oxydant potentiel dans le foie des rongeurs **(Erkekoglu et 2014)**. En fait, les phtalates induisent une toxicité non seulement en affectant l'activité des enzymes antioxydantes mais aussi par l'expression des gènes. Des chercheurs ont évalué l'effet du DEHP sur l'expression de gènes codants pour des enzymes antioxydantes. Une diminution de l'expression de SOD1 a été notée. **(Wang et al., 2012)** Wang et ses collègues ont également évalué les effets de MEHP sur l'expression de ces gènes. **(Wang et al., 2012)**. Les résultats ont révélé que l'expression du SOD1 et GPX diminuent à 100 µg / mL. Une diminution de l'expression du facteur anti-apoptotique (Bcl-2) et augmentation de l'expression du facteur pro-apoptotique (Bax) ont été observés à trois doses de 1, 10 et 100 µg / mL.

De plus, l'expression des gènes du cycle cellulaire a diminué aux mêmes doses. **(Wang et al., 2012)**. Les Phtalates sont connus pour modifier l'expression et l'activité de ces enzymes perturbant le fonctionnement de la cellule **(Wang et al., 2012)**.

Dans une étude récente, Wang et al (2012a) ont étudié l'effet du DEHP sur l'activité des enzymes antioxydantes. Au début, l'activité de la SOD augmente considérablement pendant 24h sous l'effet du DEHP (10 µg / ml) mais son niveau diminue à 72 et 96 h. Les activités .GPX et CAT ne présentent aucune altération.

En outre, Wang et ses collaborateurs (2012 b) ont évalué les propriétés de MEHP sur les activités des enzymes antioxydantes à 0,1, 1, 10 et 100 µg / ml. Il a été observé que l'activité de GPX diminuait à 1, 10 et 100 µg / ml et également à 0,1 µg / ml après 96 heures. L'activité de la CAT a augmenté à deux doses de 0,1 et 1 µg / ml

De plus, l'activité de la SOD a diminué à une dose unique de 100 µg / ml, tandis qu'elle augmente en une seule dose de 10 µg / ml. De plus, Erkekoglu et al. (2010) ont examiné l'influence du DEHP et du MEHP sur les cellules MAyd-10 Leydig et ont mesuré l'activité des enzymes antioxydantes.

D'autre part la toxicité chez le rat a été évaluée. Les animaux ont reçu une dose de 500 mg / kg du septième jour de la gestation au deuxième jour de la lactation et l'activité de l'enzymes

Discussion

antioxydantes a été mesurée chez la progéniture. Une augmentation de l'activité de la catalase et une diminution de l'activité de la GST ont été notées

Dans une autre étude, Zhou et al. (2010) ont évalué l'effet de la DBP sur l'activité des enzymes antioxydantes. Les résultats ont montré que l'activité de la SOD, GHS, GSH diminuait à deux doses de 250 et 500 mg / kg et que le taux de MDA (malondialdéhyde) augmentait aux mêmes doses dans les testicules.

Dans une étude précédente, Lee et al. (2007) ont examiné les propriétés du DBP à une dose de 750 mg / kg par voie orale pendant 30 jours et ont mesuré l'activité des enzymes antioxydantes. Une augmentation significative a été observée dans les niveaux MDA et 8 OHdG. Kasahara et al. (2002) ont évalué l'influence du DEHP chez le rat. Les animaux ont été traités avec du DEHP à raison de 1 et 2 g / kg / jour dans de l'eau de boisson pendant sept jours. Des réductions du thiol libre, du GSH et de l'acide ascorbique ont été rapportées à toutes les doses. De plus, l'activité de la CAT et GPX a également augmenté à toutes les doses.

Le DEHP est le phtalate le plus étudié en association avec la sécrétion de cytokines par les monocytes et les macrophages, (**Piepenbrink et al., 2005 ; Tonk et al., 2012 ; Yamashita et al., 2005 ; Nishioka et al., 2012**). Bien que le plan de l'étude soit différent entre les travaux, le résultat était comparable: le DEHP entraîne une sécrétion accrue de TNF- α par les monocytes et les macrophages dans quatre études sur cinq.

Une seule étude où aucune influence n'était observé suite à l'exposition aux phtalates, les rats femelles ont été exposés in utero (les mères ont été exposées par gavage) et le TNF- α a été évalué après une période de restitution de cinq semaines. (**Piepenbrink et al., 2005**). L'autre étude ex vivo sur l'exposition au DEHP par gavage chez des rats mâles jeunes et adultes utilisait des doses d'exposition similaires, mais la sécrétion de TNF- α n'était influencée qu'au niveau des macrophages de rats adultes (**Tonk et al., 2012**). Cela pourrait suggérer que les monocytes / macrophages de fœtus de rat et de jeunes rats étaient moins sensibles à l'influence du DEHP, bien qu'une influence non persistante du DEHP dans la première étude semblait également plausible, ainsi qu'une influence chez les rats mâles uniquement.

La concentration en DEHP dans l'étude in vitro sur la lignée cellulaire THP-1 humaine était supérieure et sa durée plus longue par rapport aux deux études in vitro sur des macrophages péritonéaux murins primaires. La même influence sur TNF- α a été constatée, ce qui indique que les lignées cellulaires sont moins sensibles que les cultures de cellules primaires, mais suggère également que la même voie est impliquée.

Discussion

La capacité du DEHP à augmenter la sécrétion de TNF- α a été retrouvée à une concentration de 2×10^{-4} M, mais aussi à des concentrations 1000 fois inférieures (10^{-7} M) (**Yamashita et al., 2005**).

Bien que l'influence du DEHP sur la sécrétion de TNF- α soit la même ex vivo et in vitro, des résultats similaires n'ont pas été observés concernant l'influence de BBzP ou de DnBP sur le TNF- α et la Production d'IL-1 β , respectivement (**Hong et al., 2004 ; Zheng et al., 2010 ; Li et al 2013**). La production d'IL-1 β a été stimulée ex vivo mais supprimé in vitro par la DnBP, reflétant probablement des mécanismes / voies in vivo supplémentaires.

Hong et al. ont étudié l'influence de la BBzP sur le TNF- α à la fois chez des souris femelles et dans une lignée cellulaire murine, mais n'ont constaté une influence que dans la lignée cellulaire (**Hong et al., 2004**). Cependant, une seule exposition sous-cutanée avec une dose plus faible a été administrée, qui diffère des autres études ex vivo (**Piepenbrink et al., 2005 ; Zheng et al., 2013 ; Tonk et al., 2012**) dans lesquelles l'exposition a été orale par gavage pendant 16 jours ou plus. Cela pourrait expliquer pourquoi les résultats in vitro n'ont pas été confirmés ex vivo.

5.4 Biodisponibilité

La plupart des études indiquent une excrétion urinaire d'environ 50%, indiquant une biodisponibilité orale de 50%. Des expériences sur des rats canulés montrent une excrétion biliaire à raison de 5 à 10% d'une dose orale. Il est donc concevable que jusqu'à 70% d'une dose orale de DEHP soient absorbés par l'intestin chez le rat (**CSTEE., 2002**). Chez le rat, la quasi-totalité de la dose restante de DEHP administrée par voie orale est retrouvée dans les fèces. Environ 10,64% de la dose administrée ont été retrouvés dans les matières fécales en moins de 48 heures, bien que le DEHP n'ait pu être détecté dans l'urine (données non présentées). illustrant qu'il y avait une faible excrétion fécale de DEHP dans le prototype (**Wan-Ling Chang-Liao et al., 2013**)

Chez les rates en lactation, le DEHP et le MEHP peuvent être mis en évidence dans le lait après l'administration de fortes doses par voie orale (**Dostal et al., 1987**).

Il existe peu de données sur la biodisponibilité chez l'homme. Une expérience avec 2 volontaires masculins adultes a montré une élimination urinaire de 15 à 25% du DEHP administré par voie orale à raison de 10 mg / kg pendant 4 jours (Schmid et Schlatter, 1985), tandis que dans une autre expérience, un volontaire adulte éliminait 31% d'une dose orale unique. de 66 mg de DEHP dans les urines.

Discussion

Il n'existe pas de données sur l'absorption orale de nourrissons humains. Dans la caractérisation des risques pour les nourrissons et les enfants, une biodisponibilité systémique de 100% a été supposée pour les jeunes enfants par rapport à 50% pour les adultes. Ce facteur d'ajustement de 2 a été utilisé pour la biodisponibilité du DEHP chez les enfants âgés de 6 mois à 3 ans sur la base d'informations provenant d'une étude chez le rat (**Sjoberg et al., 1985a**). Comme cette expérience a été réalisée à une dose unique très élevée de DEHP (1 000 mg / kg), dose à laquelle l'hydrolyse du DEHP semble devenir saturée chez le rat, le CSTEE a eu du mal à soutenir l'utilisation du facteur de correction de la biodisponibilité de 2 (**CSTEE., 2000**).

Néanmoins, les meilleures approximations de biodisponibilité du DEHP chez l'homme sont 50% après une ingestion orale chez l'adulte, 100% chez les enfants âgés de 6 mois à 3 ans après l'ingestion orale, 75% chez les adultes et les enfants après inhalation et 5% chez l'adulte et enfants après exposition cutanée.

Une étude préliminaire a montré que le DEHP marqué au 14C avait rapidement disparu du sang et qu'environ 57% de la dose totale avait été retrouvée dans les fèces et 42% dans les urines après administration intraveineuse à des rats. Chez le marmouset, la biodisponibilité du DEHP a été jugée inférieure et la distribution du DEHP dans les tissus était hépatique> rénale> testiculaire après un traitement de 2 000 mg / kg / jour pendant sept jours consécutifs. (**Wan-Ling et al., 2013**).

Des études antérieures ont révélé que le niveau de phtalates parents était très bas dans l'urine en raison de son métabolisme rapide en monoester et en d'autres métabolites secondaires (**Lorber et al 2010., Koch et al 2006**). Les résultats de Teirlynck et Belpaire [41] ont montré que, lors de l'administration de 14C-DEHP à des rats, 19,3% de la radioactivité était excrétée dans l'urine en l'espace de 72 heures, le reste étant excrété dans les fèces. De plus, des recherches sur le métabolisme humain ont démontré que la gamme de taux d'excrétion urinaire se situe entre 10 et 31% après l'administration orale de DEHP, et que le profil des métabolites présente un rapport élevé entre le métabolite-oxydé, le mon (2-éthyl-5-carboxypentyl) phtalate. (5cx-MEPP) et le mono [2-carboxyméthyl] hexyl] phtalate (2cx-MMHP), dans la population générale (**Preuss et al 2005, Koch et al 2005**). Koch et al ont rapporté que la majeure partie du DEHP administré par voie orale est absorbée par voie systémique et excrétée dans l'urine. Cependant, les métabolites du DEHP, DINP et DEP n'ont pas été étudiés dans notre étude. Sur la base des études publiées il est donc estimé qu'environ

Discussion

20% (6,74% de biodisponibilité et 10,64% d'excrétion fécale) de la posologie administrée avec le DEHP pourraient être détectés sous leur forme originale.

5.6 Prolifération cellulaire

Des études approfondies temps / dose-réponse des effets prolifératifs du DEHP sont disponibles chez le rat sur plusieurs organes (thyroïde, foie, poumon...etc) à l'exception de l'intestin.

Les résultats de cette première étude montrent que l'exposition périnatale au DEHP, DINP et DEP entraîne chez les rats en période néonatale une baisse de l'expression de la protéine Ki-67, ce qui explique en partie l'atrophie villositaire, nos résultats sont en accord avec plusieurs autres études sur d'autres lignées cellulaires où les phtalates semblent influencer la division cellulaires. Les effets de l'exposition in vitro au DEHP sur la prolifération des cellules B de la truite ont été testés par cytométrie en flux. Une inhibition significative, dépendante de la dose, était évidente dans les cultures de rein antérieur et postérieur après une exposition de 24 heures à du DEHP $\geq 4 \mu\text{M}$. La mort cellulaire induite par le DEHP n'était pas significative pour la gamme de DEHP testée.

Paradoxalement dans certains organes, les phtalates augmentent l'expression de l'indice mitotique, par exemple au niveau du foie, une prolifération cellulaire rapide et accélérée (pic à 3 jours) se produit de manière dose-dépendante et disparaît après 7-14 jours de traitement, certains cas font état d'une prolifération accrue à 52 semaines de traitement. Chez la souris, plusieurs rapports fournissent des données montrant que DEHP provoque une augmentation de la prolifération cellulaire tôt après le début du traitement, et qu'une augmentation peut également être présente à 40 semaines d'exposition (**Rusyn et al., 2006**).

Au niveau du poumon la quantification des cellules exprimant PCNA démontre que chez les rats traités, les taux de prolifération des cellules épithéliales et mésenchymateuses ont augmenté progressivement au cours des deux premières semaines postnatales, à la différence des animaux témoins, où les taux de prolifération les plus élevés ont été atteints au septième jour postnatal (**B Rosicarelli ; S Stefanin 2009**).

Chez l'homme les études disponibles évaluant la prolifération cellulaire (nombre de cellules en prolifération ou taille du foie) et / ou des marqueurs d'augmentation du cycle cellulaire hépatique ont été réalisés avec d'autres PP. Dans une autre étude où les effets du phtalate de di-isononyl (DINP) et de DEHP ont été évalués chez de jeunes singes mâles adultes

Discussion

cynomolgus après 14 jours de traitement, aucun changement statistiquement significatif de la synthèse totale de l'ADN hépatique ou du poids du foie (**Pugh et al.,2000**).

Au niveau de la Thyroïde, une Augmentation significative du nombre de cellules en prolifération chez les rats mâles recevant 150 mg / jour kg et les femelles à 30 et 150 mg / kg a été démontré (Tableau), reflétant que l'exposition au DEHP peut induire une altération proliférative du tissu thyroïdien.

Production de cytokines

Toute augmentation de la perméabilité peut d'une manière générale favoriser l'exposition et le passage d'antigènes du microbiote ou d'origine alimentaire. Ces antigènes sont alors capables de stimuler le système immunitaire et de maintenir une (micro)-inflammation digestive et extra-digestive à l'origine de diverses pathologies telles que le SII, les MICI, les allergies alimentaires ou encore l'obésité.

De nombreuses études ont démontré comment les cytokines induites lors d'une inflammation intestinale, peuvent affecter la fonction de barrière intestinale. Par exemple, il a été démontré que des cytokines tel que l'interféron gamma (IFN γ) et le TNF α diminuent l'expression de la claudine-2 et la claudine-3 et provoquent une redistribution de la claudine 4 dans les cellules T84 (**Prasad et al., 2005**). Utilisant la même lignée cellulaire colique humaine dans une autre étude, on a montré la redistribution de l'occludine, claudines 1 et 4 et ZO-1 après exposition à l'IFN γ (**Bruwer et al 2003**). Dans les cellules Caco 2 le TNF α augmente la perméabilité avec diminution et redistribution de la protéine ZO-1, et l'interleukine-18 a été capable de perturber l'occludine (**Lapointe et al., 2011**). Dans des modèles animaux, l'injection de souris avec le TNF α a entraîné la redistribution de l'occludine intestinale et ZO-1 (**Marchiando et al., 2011**)

Conclusion

Et perspectives

Conclusion et perspectives

Par cette étude d'exposition précoce à des PE, nous avons montré pour la première fois que le développement de l'intestin pouvait être affecté par les phtalates. Nos résultats identifient donc l'intestin comme une nouvelle cible de phtalates.

Les travaux entrepris au cours de cette thèse ont permis de mettre en évidence une modulation de la perméabilité épithéliale chez les rats au cours de la période néonatale, un effet essentiellement dû aux fluctuations de l'expression des protéines transmembranaires de jonctions serrées, s'accompagnant d'une augmentation de la perméabilité paracellulaire dans l'intestin qui s'accompagnent d'une fragilité de la fonction de barrière intestinale dans la descendance déséquilibrant la réponse immunitaire. De plus, les phtalates en période périnatale réduisent la prolifération cellulaire et affecte ainsi le renouvellement de l'épithélium.

Notre travail pourrait se poursuivre dans différentes directions amenant à mieux comprendre les mécanismes d'action mis en jeu lors de la perturbation endocrinienne de l'intestin. Pour cela, il serait d'abord intéressant de compléter les deux études par :

L'utilisation de doses faibles comparables aux doses journalières.

L'expérimentation animale a été déjà effectuée et les échantillons prélevés. Une partie de l'intestin a été conservé dans la solution ARN later réservé pour l'étude des ARN, afin de compléter l'approche moléculaire des effets observés au niveau de tous les gènes de l'intestin via une approche génomique et protéomique ce qui pourrait nous donner plus de détails quant aux granules de sécrétions de la SM et nous renseignerait sur les altérations

Il serait aussi intéressant de voir les effets de mélange avec d'autres molécules de type perturbateurs endocriniens,

Choisir d'autres périodes correspond à la fenêtre de maturation décrite comme étant particulièrement sensible aux perturbateurs endocriniens

Les modèles animaux sont et resteront des modèles pertinents pour l'étude des perturbateurs endocriniens et de leurs mécanismes d'action. Ils permettent, dans les limites des conditions d'éthique, de réaliser des expérimentations dans les conditions d'exposition souhaitées. Le modèle animal permet *in vivo*, de travailler à une dose donnée, avec une période d'exposition donnée, au niveau de différents tissus. Cependant, il restera toujours un biais évident, quant à l'extrapolation des données animales à une exposition humaine. Ce biais est en parti contourné par les cultures *in vitro* de lignées de cellules humaines. Ce modèle permet d'étudier les effets directs des perturbateurs sur un type cellulaire donné. Il est intéressant

Conclusion et perspectives

d'utiliser ce genre de modèle lorsqu'on connaît le degré de toxicité du perturbateur. Ce modèle permet alors d'étudier au niveau moléculaire les interactions modifiées par le perturbateur. En revanche, ce modèle ne permet pas non plus d'extrapoler sur l'effet physiologique observé *in vivo* sur ces mêmes cellules, au sein du tissu. Un autre modèle *in vitro*, la culture organotypique. Ce système nous permet de cultiver des explants pendant plusieurs jours, tout en conservant la structure interne du tissu prélevé (**Lambrot et al., 2006 ; Livera et al., 2006**). Il est ainsi possible d'étudier l'effet de perturbateurs sur les tissus dans un contexte où les interactions cellulaires sont conservées.

Annexe

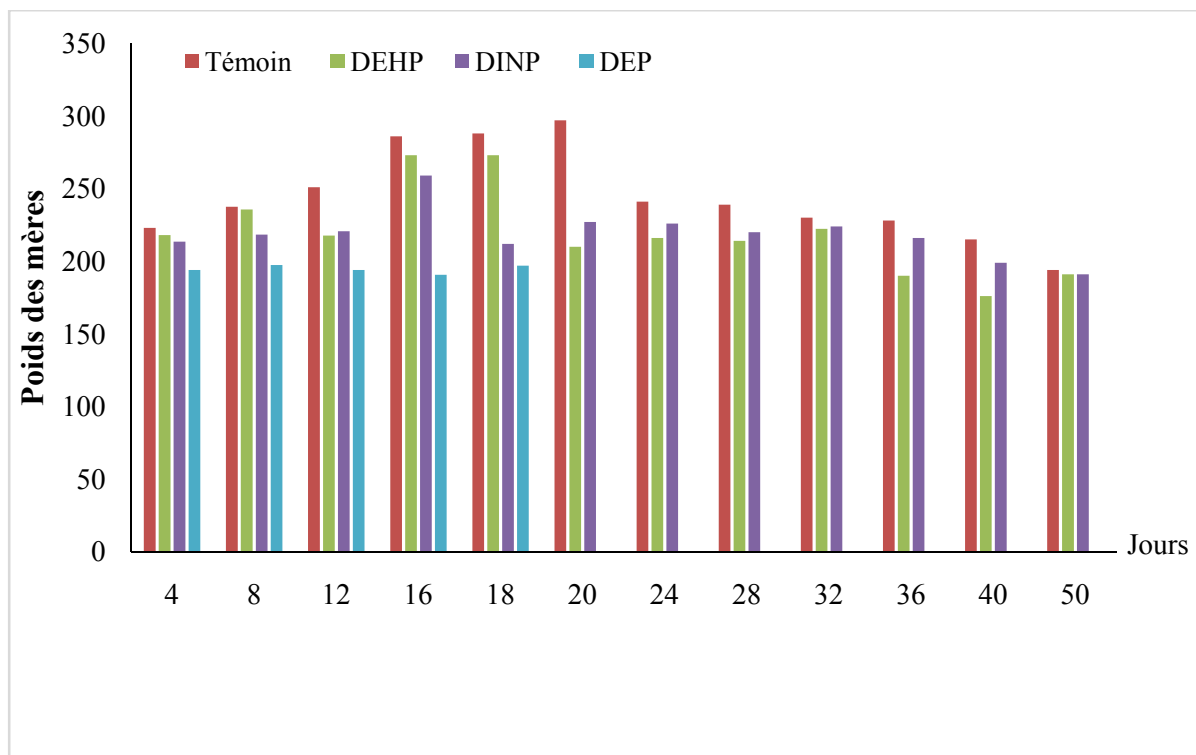


Fig 58 : Impact des phtalates sur le poids des femelles en périodes de gestation et lactation

Tableau15: Impact des phtalates sur le poids des femelles en périodes de gestation et lactation

Groupes	Intestine (D, J, I)	Pois de l'organe (g)		
		Foie	Rein	cerveau
15 jours				
Control	(0.58±0.03, 3.43±0.1, 1.65±0.3)	7.64 ± 0.02	0.82±0.01	1.19±0.01
DEHP	(0.73±, 3.87±0.01, 3.65±0.01)	9.77 ± 0.034	0.83 ± 0	1.22±0.025
DINP	(0.3± 0.09, 2.9±0.015, 2.47 ± 0.05)	9.05±0.11	0.8	1.17±0.004
DEP	(0.2±0.1, 2.5±0.03, 2.45± 0.033)	6.16 ±0.01	0.66±0.001	1.16±0.01
30 jours				
Control	(0.583±0.01, 3.098±0.4, 3.804±0.1)	11.64±0.03	0.64±0.09	1.14±0.01
DEHP	(0.381±0, 2.97±, 3.053±0.2)	6.83 ±0.19	0.69±0.5	1.29±0.01
DINP	(0.317±, 3.112±0.072, 2.52±0.12)	6.46±0.20	0.76±0.14	1.20±0.4
DEP	(0.31, 2.99, 2.27)	5.99	0.66 ± 0.6	1.16±0.02

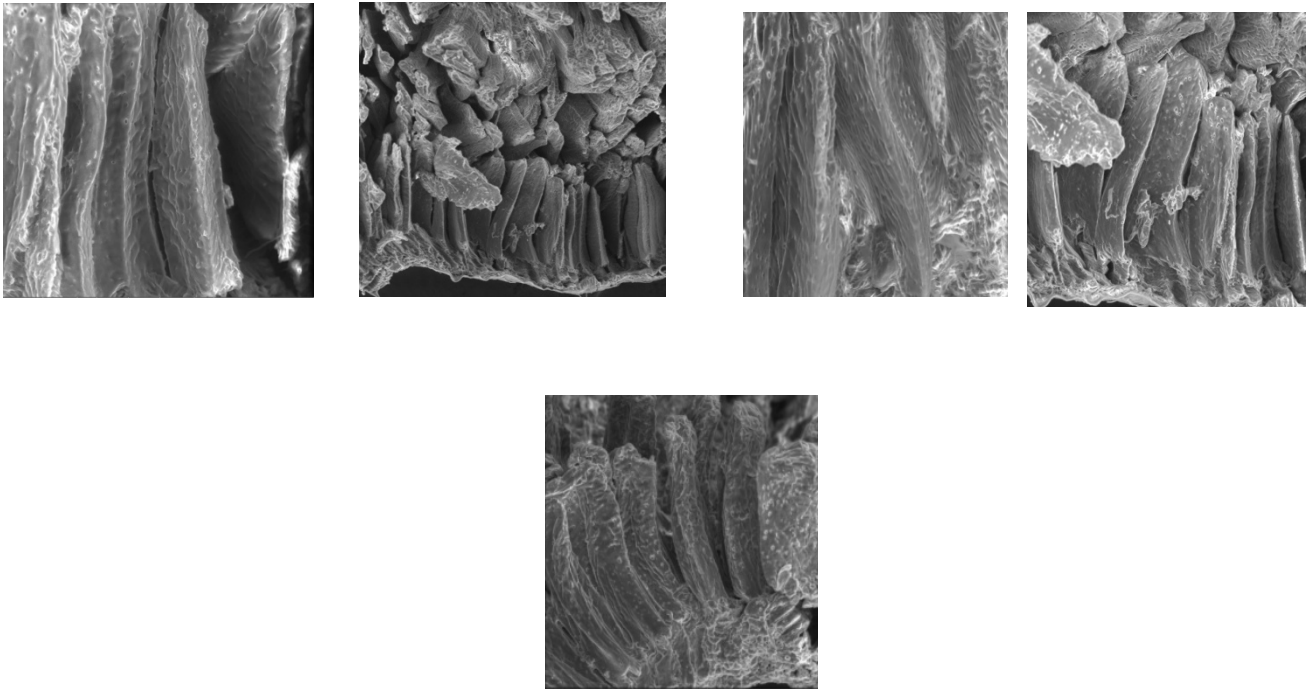


Fig 59 : Microscopie électronique d'intestin de rats témoins et traités au phtalates.

Références

Bibliographiques

1. Abdollahi M, Moridani MY, Aruoma OI, Mostafalou S. Oxidative stress in aging. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:876834.
2. Adibi JJ, Perera FP, Jedrychowski W, et al. Prenatal exposures to phthalates among women in New York City and Krakow, Poland. *Environ Health Perspect* 2003;111(14):1719–1722
3. Alves, A.; Vanermen, G.; Covaci, A.; Voorspoels, S. Ultrasound assisted extraction combined with dispersive liquid-liquid microextraction (US-DLLME)—A fast new approach to measure phthalate metabolites in nails. *Anal. Bioanal. Chem.* **2016**, *408*, 6169–6180.
4. Andreu P, Perret C, Romagnolo S. 2006. Wnt and gastrointestinal stem cells: dangerous connections. *Med Sci (Paris)*. 22: 693-695.
5. Anne-Corinne Zimmer. Polluants chimiques: Enfants en danger Editions de l'Atelier, 2008 - 286 pages.
6. Arbuckle, T.E.; Fisher, M.; MacPherson, S.; Lang, C.; Provencher, G.; LeBlanc, A.; Hauser, R.; Feeley, M.; Ayotte, P.; Neisa, A.; et al. Maternal and early life exposure to phthalates: The plastics and personal-care products use in pregnancy (P4) study. *Sci. Total Environ.* **2016**, *551–552*, 344–356
7. Asghari MH, Saeidnia S, Abdollahi M. A Review on the biochemical and molecular mechanisms of phthalate-induced toxicity in various organs with a focus on the reproductive system. *Int J Pharmacol.* 2015;11:95-105.
8. Auharek SA, de Franca LR, McKinnell C, et al (2010) Prenatal plus postnatal exposure to di(n-butyl)phthalate and/or flutamide markedly reduces final Sertoli cell number in the rat *Endocrinology* 151:2868–75
9. Axelsson, J.; Rylander, L.; Rignell-Hydbom, A.; Jönsson, B.A.G.; Lindh, C.H.; Giwercman, A. Phthalate exposure and reproductive parameters in young men from the general Swedish population. *Environ. Int.* **2015**, *85*, 54–60.
10. Baintner K. Transmission of antibodies from mother to young: evolutionary strategies in a proteolytic environment. *Vet Immunol Immunopathol* 2007;117(3-4):153–161
11. Becker K, Seiwert M, Angerer J, et al. DEHP metabolites in urine of children and DEHP in house dust. *Int J Hyg Environ Health* 2004; 207(05):409–417
12. Bennisroune A, Rojas L, Foucaud L, Goulaouic S, Laval-Gilly P, Fickova M et al. Effects of 4-nonylphenol and/or diisononylphthalate on THP-1 cells: impact of endocrine disruptors on human immune system parameters. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2012; 25: 365–376. [PubMed]

13. Bertiaux-Vandaële N, Youmba SB, Belmonte L, Lecleire S, Antonietti M, Gourcerol G, et al. The expression and the cellular distribution of the tight junction proteins are altered in irritable bowel syndrome patients with differences according to the disease subtype. *Am J Gastroenterol* 2011; 106:2165-73; PMID:22008894; <http://dx.doi.org/10.1038/ajg.2011.257>
14. Bessy OA, Lowry OH, Brock MJ. A method of rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. *J Biol Chem* 1946;146:321–329
15. Bjercknes M, Cheng H. Gastrointestinal stem cells. II. Intestinal stem cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005 ; 289 : G381-7.
16. Bogunovic M, Dave SH, Tilstra JS, Chang DT, Harpaz N, Xiong H, et al. Enteroendocrine cells express functional toll-like receptors. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* (2007) 292(6):G1770–83. doi:10.1152/ajpgi.00249.2006
17. Bogunovic M, Dave SH, Tilstra JS, Chang DT, Harpaz N, Xiong H, et al. Enteroendocrine cells express functional toll-like receptors. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* (2007) 292(6):G1770–83. doi:10.1152/ajpgi.00249.2006
18. Borch J, Metzdorff SB, Vinggaard AM, Brøkken L, Dalgaard Mechanisms underlying the anti-androgenic effects of diethylhexyl phthalate in fetal rat testis. *Toxicology* 2006;223(1-2):144–155
19. Bornehag CG, Sundell J, Weschler CJ, et al. The association between asthma and allergic symptoms in children and phthalates in house dust: a nested case-control study. *Environ Health*. 2014
20. Braniste V, et al. (2009) Oestradiol decreases colonic permeability through oestrogen receptor beta-mediated up-regulation of occludin and junctional adhesion molecule- A in epithelial cells. *J Physiol* 587:3317–3328.
21. B.S. de Bakker, K.H. de Jong, J. Hagoort, K. de Bree, C.T. Besselink, F.E.C. deKanter, et al., An interactive three-dimensional digital atlas and quantitative database of human development, *Science* (New York, N. Y.) 354 (2016)aag0053, <http://dx.doi.org/10.1126/science.aag0053>.
22. Buck Louis, G.M.; Smarr, M.M.; Sun, L.; Chen, Z.; Honda, M.; Wang, W.; Karthikraj, R.; Weck, J.; Kannan, K. Endocrine disrupting chemicals in seminal plasma and couple fecundity. *Environ. Res.* **2018**, *163*, 64–70.
23. Cairnie, A.B., Lamerton, L.F., Steel, G.G. (1965). Cell proliferation studies in the intestinal epithelium of the rat. I. Determination of the kinetic parameters. *Exp. Cell. Res.* 39: 528–538.

- 24.** Camilleri M, Madsen K, Spiller R, Van Meerveld BG, Verne GN. Intestinal barrier function in health and gastrointestinal disease. *Neurogastroenterol Motil* 2012 ; 24(6) :503-512.
- 25.** Campioli E, Martinez-Arguelles DB, Papadopoulos V. In utero exposure to the endocrine disruptor di-(2-ethylhexyl) phthalate promotes local adipose and systemic inflammation in adult male offspring. *Nutr Diabetes* 2014;4:e115
- 26.** Cani PD, Everard A, Duparc T. Gut microbiota, enteroendocrine functions and metabolism. *Curr Opin Pharmacol* (2013) 13(6):935–40. doi:10.1016/j.coph.2013.09.008
- 27.** Catherine Claire Chantal: Thèse: Evaluation et développement de modèles expérimentaux de sélection des composés: approches *in silico*, *in vitro*, *in situ* et *in vivo* de l'absorption intestinale. 75 pages, 2002.
- 28.** Choe H, Hansen JM, Harris C. Spatial and temporal ontogenies of glutathione peroxidase and glutathione disulfide reductase during development of the prenatal rat. *J Biochem Mol Toxicol*. 2001;15:197-206.
- 29.** Choi, W.; Kim, S.; Baek, Y.W.; Choi, K.; Lee, K.; Kim, S.; Yu, S.D.; Choi, K. Exposure to environmental chemicals among Korean adults—updates from the second Korean National Environmental Health Survey (2012–2014). *Int. J. Hyg. Environ. Health* **2017**, *220*, 29–35.
- 30.** Chou YY, Huang PC, Lee CC, WuMH, Lin SJ. Phthalate exposure in girls during early puberty. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2009;22 (01):69–77
- 31.** Clarke, L.L., 2009. A guide to using chamber studies of mouse intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 296(6), 1151-1166.
- 32.** Crofton KM, Craft ES, Hedge JM et al. Thyroid-hormone-disrupting chemicals: evidence for dose-dependent additivity or synergism. *Environ Health Perspect* 2005;113:1549-54.
- 33.** Crosnier, C., D. Stamatakis, and J. Lewis, Organizing cell renewal in the intestine stem cells, signals and combinatorial control. *Nat Rev Genet*, 2006. **7**(5): p. 349-59.
- 34.** Correia-Sa, L.; Kasper-Sonnenberg, M.; Palmke, C.; Schutze, A.; Norberto, S.; Calhau, C.; Domingues, V.F.; Koch, H.M. Obesity or diet? Levels and determinants of phthalate body burden—A case study on Portuguese children. *Int. J. Hyg. Environ. Health* **2018**, *221*, 519–530. *Toxics* **2019**, *7*, 21–25 of 29
- 35.** Cullen, E.; Evans, D.; Griffin, C.; Burke, P.; Mannion, R.; Burns, D.; Flanagan, A.; Kellegher, A.; Schoeters, G.; Govarts, E.; et al. Urinary phthalate concentrations in mothers and their children in Ireland: Results of the DEMOCOPHES human biomonitoring study. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2017**, *14*, 1456–1468.

36. Cutanda, F.; Koch, H.M.; Esteban, M.; Sanchez, J.; Angerer, J.; Castano, A. Urinary levels of eight phthalate metabolites and bisphenol A in mother-child pairs from two Spanish locations. *Int. J. Hyg. Environ. Health* **2015**, *218*, 47–57.
37. Dahlqvist A. Method for assay of intestinal disaccharidase. *Anal Biochem* 1964;7:18.
38. Daniel, J.W.; Bratt, H. The absorption, metabolism and tissue distribution of di(2-ethylhexyl)phthalate in rats. *Toxicology* **1974**, *2*, 51–65. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
39. de Santa Barbara, P., G.R. van den Brink, and D.J. Roberts, *Development and Desvergne B, Feige JN, Casals-Casas C. PPAR-mediated activity of phthalates: a link to the obesity epidemic? Mol Cell Endocrinol* 2009;304(1-2):43–48
40. D. Kalo, R. Hadas, O. Furman et al., “Carryover effects of acute DEHP exposure on ovarian function and oocyte developmental competence in lactating cows,” *PLoS ONE*, vol. 10, no. 7, Article ID e0130896, 2015.
41. H. Swan, S. Sathyanarayana, and E. S. Barrett, “First trimester phthalate exposure and anogenital distance in newborns,” *Human Reproduction*, vol. 30, no. 4, pp. 963–972, 2015.
42. Dominique Lafon Grosseesse et travail: Quels sont les risques pour l'enfant à naître ? im phl 5 4 3 Par PAGE 197L'Editeur : EDP Sciences, 10 juin 2010
43. Dostal LA, Weaver RP, Schwetz BA. Transfer of di(2-ethylhexyl) phthalate through ratmilk and effects onmilk composition and the mammary gland. *Toxicol Appl Pharmacol* 1987;91(03):315–325
44. Engel SM, Miodovnik A, Canfield RL, et al. Prenatal phthalate exposure is associated with childhood behavior and executive functioning. *Environ Health Perspect* 2010;118:565-.
45. Erkekoglu P, Zeybek ND, Giray BK, Rachidi W, Kizilgun M. The effects of di (2-ethylhexyl) phthalate on rat liver in relation to selenium status. *Int J Exp Pathol*. 2014;95:64-77.
46. Escaffit F, Boudreau F, Beaulieu JF. Differential expression of claudin-2 along the human intestine: Implication of GATA-4 in the maintenance of claudin-2 in differentiating cells. *J Cell Physiol* 2005; 203:15- 26; PMID:15389642; <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.20189>
47. Fanning AS, Mitic LL, Anderson JM. Transmembrane proteins in the tight junction barrier. *J Am Soc Nephrol*. 2009; 10(6):1337–45. PMID: 10361874.
48. Feigejn, Gelman L, Rossi D, ZOETE V, MÉTIVIER R, et coll. The endocrine disruptor monoethyl-hexyl-phthalate is a selective peroxisome proliferator-activated receptor gamma modulator that promotes adipogenesis. *J Biol Chem* 2007, **282** : 19152-19166

49. Feigejn, GERBER A, CASALS-CASAS C, YANG Q, WINKLER C et coll. The pollutant diethylhexyl phthalate regulates hepatic energy metabolism via species-specific PPARalpha-dependent mechanisms. *Environ Health Perspect* 2010, **118** : 234-241
50. Ferguson KK, Cantonwine DE, Rivera-González LO, et al. Urinary phthalate metabolite associations with biomarkers of inflammation and oxidative stress across pregnancy in Puerto Rico. *Environ Sci Technol* 2014;48(12):7018–7025
51. Ferrara D, Hallmark N, Scott H, et al (2006) Acute and long-term effects of in utero exposure of rats to di(n-butyl)phthalate on testicular germ cell development and proliferation *Endocrinology* 147:5352–62
52. Fihn, B. M., A. Sjoqvist, et al. (2000). "Permeability of the rat small intestinal epithelium along the villus-crypt axis: effects of glucose transport." *Gastroenterology* **119**(4): 1029-36.
53. Fiorini C, Tilloy-Ellul A, Chevalier S, Charuel C, Pointis G. Sertoli cell junctional proteins as early targets for different classes of reproductive toxicants. *Reprod Toxicol*. 2004;18:413–421.
54. Fisher JS, Macpherson S, Marchetti N, Sharpe RM (2003) Human “testicular dysgenesis syndrome”: a possible model using in utero exposure of the rat to dibutyl phthalate. *Hum Reprod* 18:1383–94
55. Forstermann, U. (2008) Oxidative stress in vascular disease: causes, defense
56. Foster PM (2006) Disruption of reproductive development in male rat offspring following in utero exposure to phthalate esters. *Int J Androl* 29:140–7.
57. Friedrich M, Diegelmann J, Schaubert J, Auernhammer CJ, Brand S. Intestinal neuroendocrine cells and goblet cells are mediators of IL-17A-amplified epithelial IL-17C production in human inflammatory bowel disease. *Mucosal Immunol* (2015) 8(4):943–58. doi:10.1038/mi.2014.124
58. Fujita H, Chiba H, Yokozaki H, Sakai N, Sugimoto K, Wada T, et al. Differential expression and subcellular localization of claudin-7, -8, -12, -13, and -15 along the mouse intestine. *J Histochem Cytochem* 2006; 54:933- 44; PMID:16651389; <http://dx.doi.org/10.1369/jhc.6A6944.2006>
59. . exposure and Gao, C.-J.; Liu, L.-Y.; Ma, W.-L.; Ren, N.-Q.; Guo, Y.; Zhu, N.-Z.; Jiang, L.; Li, Y.-F.; Kannan, K. Phthalate metabolites in urine of Chinese young adults: Concentration, profile, cumulative risk assessment. *Sci. Total Environ.* **2016**, *543*, 19–27.
60. Gayathri NS, Dhanya CR, Indu AR et al. Changes in some hormones by low doses of di(2-ethyl hexyl) phthalate (DEHP), a commonly used plasticizer in PVC blood storage bags and medical tubing. *Indian J Med Res* 2004;119:139-44.

61. Gece K, Roka R, Ferrier L et al. Increased faecal serine protease activity in diarrhoeic IBS patients : a colonic luminal factor impairing colonic permeability and sensitivity. *Gut* 2008 ; 57(5) :591-599.
62. Gerbe F, Sidot E, Smyth DJ, Ohmoto M, Matsumoto I, Dardalhon V, et al. Intestinal epithelial tuft cells initiate type 2 mucosal immunity to helminth parasites. *Nature* (2016) 529(7585):226–30. doi:10.1038/nature16527
63. Giovanoulis, G.; Alves, A.; Papadopoulou, E.; Cousins, A.P.; Schutze, A.; Koch, H.M.; Haug, L.S.; Covaci, A.; Magner, J.; Voorspoels, S. Evaluation of exposure to phthalate esters and DINCH in urine and nails from a Norwegian study population. *Environ. Res.* **2016**, *151*, 80–90.
64. Glue C, Millner A, Bodtger U, Jinquan T, Poulsen LK. In vitro effects of monophthalates on cytokine expression in the monocytic cell line THP-1 and in peripheral blood mononuclear cells from allergic and non-allergic donors. *Toxicology in Vitro*. 2002; 16: 657–662. [PubMed]
65. Gonzalez-Mariscal, L., S. Hernandez, et al. (2008). "Inventions designed to enhance drug delivery across epithelial and endothelial cells through the paracellular pathway." *Recent Pat Drug Deliv Formul* **2**(2): 145-76.
66. Gribble FM, Reimann F. Enteroendocrine cells: chemosensors in the intestinal epithelium. *Annu Rev Physiol* (2016) 78:277–99. doi: 10.1146/annurev-physiol-021115-105439
67. Grün F, Blumberg B. Environmental obesogens: organotins and endocrine disruption via nuclear receptor signaling. *Endocrinology* 2006;147(6, Suppl):S50–S55
68. Handbook of Growth and Growth Monitoring in Health and Disease
69. Hansen JM. Oxidative stress as a mechanism of teratogenesis Birth Defects. *Res C Embryo Today Rev*. 2006;78:293-307.
70. Harris RS, Hodge HC, Maynard ER, et al (1956) Chronic oral toxicity of 2-ethylhexyl phthalate in rats and dogs. *Arch Ind Hyg* 13:259–64
71. Harris N. IMMUNOLOGY. The enigmatic tuft cell in immunity. *Science* (2016) 351(6279):1264–5. doi:10.1126/science.aaf5215
72. Haug, L.S.; Sakhi, A.K.; Cequier, E.; Casas, M.; Maitre, L.; Basagana, X.; Andrusaityte, S.; Chalkiadaki, G.; Chatzi, L.; Coen, M.; et al. In-utero and childhood chemical exposome in six European mother-child cohorts. *Environ. Int.* **2018**, *121*, 751–763.
73. Hauser R, Calafat AM. Phthalates and human health. *Occup Environ Med* 2005;62(11):806–818

74. Hokanson R, Hanneman W, Hennessey M, et al. DEHP, bis(2)-ethylhexyl phthalate, alters gene expression in human cells: possible correlation with initiation of fetal developmental abnormalities. *Hum Exp Toxicol*. 2006;25(12):687– 695
75. Holmes JL, Van Itallie CM, Rasmussen JE, Anderson JM. Claudin profiling in the mouse during postnatal intestinal development and along the gastrointestinal tract reveals complex expression patterns. *Gene Expr Patterns* 2006; 6:581-8; PMID:16458081; <http://dx.doi.org/10.1016/j.modgep.2005.12.001>
76. Howarth JA, Price SC, Dobrota M et al. Effects on male rats of di-(2-ethylhexyl) phthalate and di-n-hexylphthalate administered alone or in combination. *Toxicol Lett* 2001;121:35-43.
77. Hu CH, Xiao K, Luan ZS, Song J. Early weaning increases intestinal permeability, alters expression of cytokine and tight junction proteins, and activates mitogen-activated protein kinases in pigs. *J Anim Sci*. 2013;91 (3):1094–101.
78. Hu J, Raikhel V, Gopalakrishnan K, et al. Effect of postnatal low dose exposure to environmental chemicals on the gut microbiome in a rodent model. *Microbiome* 2016;4(01):26
79. Hiroshi Fukui. Increased Intestinal Permeability and Decreased Barrier Function: Does It Really Influence the Risk of Inflammation? *Inflamm Intest Dis* 2016;1:135–145 DOI: 10.1159/000447252
80. Hu X, Shi W, Zhang F, et al. In vitro assessment of thyroid hormone disrupting activities in drinking water sources along the Yangtze River. *Environ Pollut* 2013;173:210–215
81. Huang PC, Tien CJ, Sun YM, Hsieh CY, Lee CC. Occurrence of phthalates in sediment and biota: relationship to aquatic factors and the biota-sediment accumulation factor. *Chemosphere* 2008; 73(04):539–544
82. Hubatsch, I., E.G.. Ragnarsson, and P. Artursson, Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. *Nature protocols*, 2009. 2(9): p. 2111-2119.
83. Howitt MR, Lavoie S, Michaud M, Blum AM, Tran SV, Weinstock JV, et al. Tuft cells, taste-chemosensory cells, orchestrate parasite type 2 immunity in the gut. *Science* (2016) 351(6279):1329–33. doi:10.1126/science.aaf1648
84. ing column-switching liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci*. 2005, 816, 269–280. *Molecules* 2013, 18 11466
85. Jarfelt K, DALGAARD M, HASS U, BORCH J, JACOBSEN H, LADEFOGED O. Antiandrogenic effects in male rats perinatally exposed to a mixture of di(2-ethylhexyl) phthalate and di(2-ethylhexyl) adipate. *Reprod Toxicol* 2005, 19 : 505-515

- 86.** Jeddi, M.Z.; Gorji, M.E.; Rietjens, I.M.C.M.; Louisse, J.; Bruinen de Bruin, Y.; Liska, R. Biomonitoring and subsequent risk assessment of combined exposure to phthalates in Iranian children and adolescents. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2018**, *15*, 2336–2358.
- 87.** Jo, A.; Kim, H.; Chung, H.; Chang, N. Associations between dietary intake and urinary bisphenol A and phthalates levels in Korean women of reproductive age. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2016**, *13*, 680–693.
- 88.** Jonathan Clayden, Nick Greeves, Stuart Warren, Peter Wothers **Chimie organique** PAGE 1479 De Boeck Supérieur, 10 déc. 2002
- 89.** K.D. Walton, A. Kolterud, M.J. Czerwinski, M.J. Bell, A. Prakash, J. Kushwaha, et al., Hedgehog-responsive mesenchymal clusters direct patterning and emergence of intestinal villi, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109 (2012) 15817–15822, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1205669109>.
- 90.** Kardas, F.; Bayram, A.K.; Demirci, E.; Akin, L.; Ozmen, S.; Kendirci, M.; Canpolat, M.; Oztop, D.B.; Narin, F.; Gumus, H.; et al. Increased serum phthalates (MEHP, DEHP) and bisphenol A concentrations in children with autism spectrum disorder: The role of endocrine disruptors in autism etiopathogenesis. *J. Child Neurol.* **2016**, *31*, 629–635.
- 91.** Karlsson, P. Lindahl, J. Heath, C. Betsholtz, Abnormal gastrointestinal development in PDGF-A and PDGFR-(alpha) deficient mice implicates a novel mesenchymal structure with putative instructive properties, *Development* 127 (2000) 3457–3466 <http://dev.biologists.org/content/127/16/3457.short>
- 92.** Kevin Marsee, Tracey J. Woodruff, [...], and Shanna H. Swan Estimated daily phthalate exposures in a population of mothers of male infants exhibiting reduced anogenital distance. *Environ Health Perspect* 2006;114(06):805–809
- 93.** Kim HS, Kim TS, Shin JH, et al. Neonatal exposure to di(n-butyl) phthalate (DBP) alters male reproductive-tract development. *J Toxicol Environ Health A* 2004;67(23-24):2045–2060
- 94.** Kim, J.H.; Lee, S.; Shin, M.Y.; Kim, K.N.; Hong, Y.C. Risk assessment for phthalate exposures in the elderly: A repeated biomonitoring study. *Sci. Total Environ.* **2018**, *618*, 690–696.
- 95.** Kim, S.; Lee, J.; Park, J.; Kim, H.J.; Cho, G.J.; Kim, G.H.; Eun, S.H.; Lee, J.J.; Choi, G.; Suh, E.; et al. Urinary phthalate metabolites over the first 15 months of life and risk assessment—CHECK cohort study. *Sci. Total Environ.* **2017**, *607–608*, 881–887.
- 96.** Kim, S.; Lee, J.; Park, J.; Kim, H.J.; Cho, G.; Kim, G.H.; Eun, S.H.; Lee, J.J.; Choi, G.; Suh, E.; et al. Concentrations of phthalate metabolites in breast milk in Korea: Estimating exposure to phthalates and potential risks among breast-fed infants. *Sci. Total Environ.* **2015**, *508*, 13–19.

- 97.** Kim, J.H.; Park, H.; Lee, J.; Cho, G.; Choi, S.; Choi, G.; Kim, S.Y.; Eun, S.H.; Suh, E.; Kim, S.K.; et al. Association of diethylhexyl phthalate with obesity-related markers and body mass change from birth to 3 months of age. *J. Epidemiol. Community Health* **2016**, *70*, 466–472.
- 98.** Kimber I, Dearman RJ. An assessment of the ability of phthalates to influence immune and allergic responses. *Toxicology* 2010;271:73-82.
- 99.** Kocbach BA, Ovrevik J, Samuelsen JT, Holme JA, Rakkestad KE, Mathisen GH et al. Mono-2-ethylhexylphthalate (MEHP) induces TNF-alpha release and macrophage differentiation through different signalling pathways in RAW264.7 cells. *Toxicology Letters*. 2012; 209: 43–50. doi: [10.1016/j.toxlet.2011.11.016](https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.11.016) [PubMed]
- 100.** Koch, H.M.; Bolt, H.M.; Preuss, R.; Angerer, J. New metabolites of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in human urine and serum after single oral doses of deuterium-labelled DEHP. *Arch. Toxicol.* 2005, *79*, 367–376.
- 101.** Koch, H.M.; Preuss, R.; Angerer, J. Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP): Human metabolism and internal exposure-- an update and latest results. *Int J. Androl.* 2006, *29*, 155–165.
- 102.** Koch, H.M.; Ruther, M.; Schutze, A.; Conrad, A.; Palmke, C.; Apel, P.; Bruning, T.; Kolossa-Gehring, M. Phthalate metabolites in 24-h urine samples of the German Environmental Specimen Bank (ESB) from 1988 to 2015 and a comparison with US NHANES data from 1999 to 2012. *Int. J. Hyg. Environ. Health* **2017**, *220*, 130–141. Koch, H.M.;
- 103.** Kolena, B.; Petrovicova, I.; Sidlovska, M.; Pilka, T.; Neuschlova, M.; Valentova, I.; Rybansky, L.; Trnovec, T. Occupational phthalate exposure and health outcomes among hairdressing apprentices. *Hum. Exp. Toxicol.* **2017**, *36*, 1100–1112.
- 104.** König J, Müller F, Fromm MF (2013) Transporters and drug-drug interactions: important determinants of drug disposition and effects. *Pharmacol Rev.* 65: 944-966
- 105.** Kraehenbuhl *et al.*, 1997 Intestinal epithelia and barrier functions *Aliment Pharmacol Ther* 1997; 11 (Suppl. 3): 3-9
- 106.** Krüger T, Long M, Bonefeld-Jørgensen EC. Plastic components affect the activation of the aryl hydrocarbon and the androgen receptor. *Toxicology* 2008, **246** : 112-123
- 107.** Kwak ES, Just A, Whyatt R, Miller RL. Phthalates, Pesticides, and Bisphenol-A Exposure and the Development of Nonoccupational Asthma and Allergies: How Valid Are the Links? *Open Allergy J* 2009;2:45-50.
- 108.** Lal-Nag, M. and P. J. Morin (2009). "The claudins." *Genome Biol* **10**(8): 235.

- 109.**Lameris AL, Huybers S, Kaukinen K, Mäkelä TH, Bindels RJ, Hoenderop JG, et al. Expression profiling of claudins in the human gastrointestinal tract in health and during inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2013; 48:58-69; PMID:23205909; <http://dx.doi.org/10.3109/00365521.2012.741616>
- 110.**Larhed AW, Artursson P, Björk E. The influence of intestinal mucus components on the diffusion of drugs. *Pharm Res.* 1998 Jan;15(1):66-71
- 111.**Latini G, De Felice C, Presta G, et al. Exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate in humans during pregnancy. A preliminary report. *Biol Neonate* 2003;83(01):22–24
- 112.**LE Ferrec E., Chesne C., Artursson P., Brayden D., Fbre G., Gires P., Guillou F., Rousset M., Rubas W., Scarino M.L. : In Vitro Models of the Intestinal Barrier, The report and recommendations of ECVAM Workshop. *ATLA*, 2001, **29**, 649-668.
- 113.**Lei Z, Maeda T, Tamura A, Nakamura T, Yamazaki Y, Shiratori H, et al. EpCAM contributes to formation of functional tight junction in the intestinal epithelium by recruiting claudin proteins. *Dev Biol* 2012; 371:136- 45; PMID:22819673; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.07.005>
- 114.**Leo M. L. Nollet *Analysis of Endocrine Disrupting Compounds in Food* . John Wiley & Sons, 9 juin 2011 - 504 pages
- 115.**Li L, Li HS, Song NN, Chen HM. The immunotoxicity of dibutyl phthalate on the macrophages in mice. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2013; 35: 272–281. doi: 10.3109/08923973.2013.768267 [PubMed]
- 116.**Li MW, Mruk DD, Lee WM, Cheng CY. Disruption of the bloodtestis barrier integrity by bisphenol A in vitro: is this a suitable model for studying blood-testis barrier dynamics? *Int J Biochem Cell Biol.* 2009;41:2302–2314.
- 117.**Li X, Fang EF, Scheibye-Knudsen M, et al. Di-(2-ethylhexyl) phthalate inhibits DNA replication leading to hyperPARylation, SIRT1 attenuation, and mitochondrial dysfunction in the testis. *Sci Rep* 2014;4:6434
- 118.**Lin JE, Snook AE, Li P, Stoecker BA, Kim GW, Magee MS, et al. GUCY2C opposes systemic genotoxic tumorigenesis by regulating AKT-dependent intestinal barrier integrity. *PLoS One* 2012; 7:e31686; PMID:22384056; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0031686>
- 119.**Loff S, Kabs F, Witt K, et al. Polyvinylchloride infusion lines expose infants to large amounts of toxic plasticizers. *J Pediatr Surg* 2000; 35(12):1775–1781
- 120.**Lorber, M.; Angerer, J.; Koch, H.M. A simple pharmacokinetic model to characterize exposure of Americans to di-2-ethylhexyl phthalate. *J. Expo. Sci Environ. Epidemiol.* 2010, 20, 38–53.

- 121.**Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193(01):265–275
- 122.**Lu P, Burger-van Paassen N, van der Sluis M, Witte- Bouma J, Kerckaert JP, van Goudoever JB, et al. Colonic gene expression patterns of mucin Muc2 knockout mice reveal various phases in colitis development. *Inflamm Bowel Dis* 2011; 17:2047-57; PMID:21910166; [http:// dx.doi.org/10.1002/ibd.21592](http://dx.doi.org/10.1002/ibd.21592)
- 123.**Mahood IK, Hallmark N, McKinnell C, Walker M, Fisher JS, Sharpe RM. Abnormal Leydig cell aggregation in the fetal testis of rats exposed to di (n-butyl) phthalate and its possible role in testicular dysgenesis. *Endocrinology* 2005;146(02):613–623
- 124.**Main KM, Mortensen GK, Kaleva MM, et al. Human breast milk contamination with phthalates and alterations of endogenous reproductive hormones in infants three months of age. *Environ Health Perspect* 2006;114(02):270–276
- 125.**Marsee K, Woodruff TJ, Axelrad DA, Calafat AM, Swan SH. Estimated daily phthalate exposures in a population mothers of male infants exhibiting reduced anogenital distance. *Environmental Health Perspectives* 2006;114(6):805-809.
- 126.**Martin M. Kaufman, Daniel T. Rogers, Kent S. Murray *Urban Watersheds: Geology, Contamination, and Sustainable Development* CRC Press, 14 avr. 2011 - 583 pages
- 127.**Mates JM, Sanchez-Jimenez F. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. *Front. Biosci.*1999; 4:339–345.
- 128.**McKee RH, Butala JH, David RM, Gans G. NTP center for the evaluation of risks to human reproduction reports on phthalates: addressing the data gaps. *Reprod Toxicol* 2004;18(01):1–22
- 129.**Meddings JB, Jarand J, Urbanski SJ, Hardin J, Gall DG (1999) Increased gastrointestinal permeability is an early lesion in the spontaneously diabetic BB.
- 130.**Rais Bahrami K, Nunez S Follow up study of adolescents exposed to DEHP as neonates on extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) support. *Environ Health Perspect* 2004;112:1339-40.
- 131.**Menard, S., N. Cerf-Bensussan, et al. (2010). "Multiple facets of intestinal permeability and epithelial handling of dietary antigens." *Mucosal Immunol* 3(3): 247-59.
- 132.**Morita, K., M. Furuse, et al. (1999). "Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(2): 511-6.

- 133.** Murphy CJ, Stermer AR, Richburg JH. Age- and species-dependent infiltration of macrophages into the testis of rats and mice exposed to mono-(2-Ethylhexyl) phthalate (MEHP). *Biol Reprod* 2014;91(01):18
- 134.** Myridakis, A.; Fthenou, E.; Balaska, E.; Vakinti, M.; Kogevinas, M.; Stephanou, E.G. Phthalate esters, parabens and bisphenol-A exposure among mothers and their children in Greece (Rhea cohort). *Environ. Int.* **2015**, *83*, 1–10.
- 135.** Nathalie Chèvre, Suren Erkman Alerte aux micropolluants: Pesticides, biocides, détergents, médicaments et ...Collection le savoir suisse, 24 nov. 2011 - 142 pages
- 136.** National Research Council (U.S.). Committee on the Health Risks of Phthalates Phthalates and Cumulative Risk Assessment: The Task Ahead National Research Council (U.S.). Committee on the Health Risks of Phthalates National Academies Press, 31 déc. 2008 - 188 pages
- 137.** Nishioka J, Iwahara C, Kawasaki M, Yoshizaki F, Nakayama H, Takamori K et al. Di-(2-ethylhexyl) phthalate induces production of inflammatory molecules in human macrophages. *Inflammation Research*. 2012; 61: 69–78. doi: 10.1007/s00011-011-0390-x [PubMed]
- 138.** Nusrat A, Turner JR, Madara JL. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions. IV. Regulation of tight junctions by extracellular stimuli: nutrients, cytokines, and immune cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2000; 279(5):G851–7. PMID: 11052980.
- 139.** O'Connor JC, Frame SR, Ladics GS. Evaluation of a 15-day screening assay using intact male rats for identifying antiandrogens. *Toxicol Sci* 2002;69:92-108.
- 140.** Odenwald MA, Turner JR (2013) Intestinal permeability defects: is it time to treat? *Clin Gastroenterol Hepatol*. (9):1075-83 Par Victor R. Preedy
- 141.** Oshima T, Miwa H, Joh T. Changes in the expression of claudins in active ulcerative colitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23(Suppl 2):S146-50; PMID:19120888; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-1746.2008.05405.x>
- 142.** Palazzo M, Balsari A, Rossini A, Selleri S, Calcaterra C, Gariboldi S, et al. Activation of enteroendocrine cells via TLRs induces hormone, chemokine, and defensin secretion. *J Immunol* (2007) 178(7):4296–303. doi:10.4049/jimmunol.178.7.4296
- 143.** Park, C.; Choi, W.; Hwang, M.; Lee, Y.; Kim, S.; Yu, S.; Lee, I.; Paek, D.; Choi, K. Associations between urinary phthalate metabolites and bisphenol A levels, and serum thyroid hormones among the Korean adult population—Korean National Environmental Health Survey (KoNEHS) 2012–2014. *Sci. Total Environ.* **2017**, *584–585*, 950–957.

144.Patel RM, Myers LS, Kurundkar AR, Maheshwari A, Nusrat A, Lin PW. Probiotic bacteria induce maturation of intestinal claudin 3 expression and barrier function. *Am J Pathol* 2012; 180:626-35; PMID:22155109; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.10.025>

145.Pei-Li Yao, Yi-Chen Lin, and John H. Richburg Mono-(2-Ethylhexyl) Phthalate-Induced Disruption of Junctional Complexes in the Seminiferous Epithelium of the Rodent Testis Is Mediated by MMP21. *BIOLOGY OF REPRODUCTION* 82, 516–527 (2010)

146.Petrovicova, I.; Kolena, B.; Sidlovska, M.; Pilka, T.; Wimmerova, S.; Trnovec, T. Occupational exposure to phthalates in relation to gender, consumer practices and body composition. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **2016**, 23, 24125–24134.

147.Phthalate Esters Panel HPV Testing Group. High production volume (HPV) chemical challenge programme test plan for the phthalate esters category December 10, 2001 prepared by:ExxonMobil Biomedical Sciences, Inc for the Phthalate Esters Panel HPV Testing Group of the American Chemistry Council;2001;<http://www.epagov/hpv/pubs/summaries/benzene/c13467tchtm> (Accessed 2007).

148. Atlanta, GA: Public Health Service Agency for Toxic Substances and Disease Registry, US Department of Health and Human Services; 2002

149.Piepenbrink MS, Hussain I, Marsh JA, Dietert RR. Developmental Immunotoxicology of Di-(2-Ethylhexyl)phthalate (DEHP): Age-Based Assessment in the Female Rat. *J Immunotoxicol.* 2005; 2: 21–31. doi: 10.1080/15363750490429435 [PubMed]

150.Pilka, T.; Petrovicova, I.; Kolena, B.; Zatko, T.; Trnovec, T. Relationship between variation of seasonal temperature and extent of occupational exposure to phthalates. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **2015**, 22, 434–440.

151.Polinski, K.J.; Dabelea, D.; Hamman, R.F.; Adgate, J.L.; Calafat, A.M.; Ye, X.; Starling, A.P. Distribution and predictors of urinary concentrations of phthalate metabolites and phenols among pregnant women in the Healthy Start Study. *Environ. Res.* **2018**, 162, 308–317.

152.Plastics Additives iSmithers Rapra Publishing, 30 mars 2005

153.Pradyot Patnaik Handbook of Environmental Analysis: Chemical Pollutants in Air, Water, Soil ... CRC Press, 1 déc. 2009 - 786 pages Preuss, R.; Koch, H.M.; Angerer, J. Biological monitoring of the five major metabolites of di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in human urine us

154 Rais-Bahrami K, Nunez S, Revenis ME et al.Follow-up study of adolescents exposed to di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) as neonates on extracorporeal.

155.Radke, E.G.; Braun, J.M.; Meeker, J.D.; Cooper, G.S. Phthalate exposure and male reproductive outcomes: A systematic review of human epidemiological evidence. *Environ. Int.* **2018**, 121, 764–793.

156.Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, Liejendekker R, Harding CV, et al. (1996) B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med.* 183: 1161-1172.

157.Raymond Trévoux *L'endometre Present Et Avenir* John Libbey Eurotext, 2009 - 426 pages

158.Rescigno M, Rotta G, Valzasina B, Ricciardi-Castagnoli P (2001) Dendritic cells shuttle microbes across gut epithelial monolayers. *Immunobiology* 204: 572-581

159. Rocha, B.A.; Asimakopoulos, A.G.; Barbosa, F., Jr.; Kannan, K. Urinary concentrations of 25 phthalate metabolites in Brazilian children and their association with oxidative DNA damage. *Sci. Total Environ.* **2017**, *586*, 152–162.

160.Ronald R. Watson, Sherma Zibadi, Victor R. Preedy *Dietary Components and Immune Function* Springer, 11 août 2010 - 350 pages

161.Rudel RA, Camann DE, Spengler JD, Korn LR, Brody JG. Phthalates, alkylphenols, pesticides, polybrominated diphenyl ethers, and other endocrine-disrupting compounds in indoor air and dust. *Environ Sci Technol* 2003;37(20):4543–4553

162.Rusyn I, Peters JM, Cunningham ML. Modes of action and species-specific effects of di-(2-ethylhexyl)phthalate in the liver. *Crit Rev Toxicol* 2006;36(05):459–479

163. Sabaredzovic, A.; Sakhi, A.K.; Brantsaeter, A.L.; Thomsen, C. Determination of 12 urinary phthalate metabolites in Norwegian pregnant women by core-shell high performance liquid chromatography with on-line solid-phase extraction, column switching and tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2015**, *1002*, 343–352.

164.Safety Analysis of Foods of Animal Origin Par Leo M. L. Nollet CRC Press, 3 sept. 2010 – 1002

165. Sapone A, Lammers KM, Casolaro V, Cammarota M, Giuliano MT, De Rosa M, et al. Divergence of gut permeability and mucosal immune gene expression in two gluten-associated conditions: celiac disease and gluten sensitivity. *BMC Med* 2011; 9:23; PMID:21392369; <http://dx.doi.org/10.1186/1741-7015-9-23>

166.Schneeberger EE, Lynch RD. The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004; 286(6): C1213–28. PMID: 15151915.

167.Schwedler, G.; Seiwert, M.; Fiddicke, U.; Issleb, S.; Holzer, J.; Nendza, J.; Wilhelm, M.; Wittsiepe, J.; Koch, H.M.; Schindler, B.K.; et al. Human biomonitoring pilot study DEMOCOPHES in Germany: Contribution to a harmonized European approach. *Int. J. Hyg. Environ. Health* **2017**, *220*, 686–696.

- 168.**Sears CL. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions V. assault of the tight junction by enteric pathogens. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000 ; 279(6) :G1129-G1134.
- 169.**Sekiguchi S, Ito S, Suda M et al. Involvement of thyroxine in ovarian toxicity of di-(2-ethylhexyl)phthalate. *Ind Health* 2006;44:274-9.
- 170.**Sharpe RM, Skakkebaek NE (2008) Testicular dysgenesis syndrome: mechanistic insights and potential new downstream effects. *Fertil Steril* 89(2 Suppl):e33–e8
- 171.**Shen, W., S. Li, et al. (2011). "Tyrosine phosphorylation of VE-cadherin and claudin-5 is associated with TGF-beta1-induced permeability of centrally derived vascular endothelium." *Eur J Cell Biol* **90**(4): 323-32.
- 172.**Shen, W., S. Li, et al. (2011). "Tyrosine phosphorylation of VE-cadherin and claudin-5 is associated with TGF-beta1-induced permeability of centrally derived vascular endothelium." *Eur J Cell Biol* **90**(4): 323-32
- 173.**Smarr, M.M.; Kannan, K.; Sun, L.; Honda, M.; Wang, W.; Karthikraj, R.; Chen, Z.; Weck, J.; Buck Louis, G.M. Preconception seminal plasma concentrations of endocrine disrupting chemicals in relation to semen quality parameters among male partners planning for pregnancy. *Environ. Res.* **2018**, *167*, 78–86.
- 174.**Sobarzo CM, Lustig L, Ponzio R, Suescun MO, Denduchis B. Effects of di(2-ethylhexyl) phthalate on gap and tight junction protein expression in the testis of prepubertal rats. *Microsc Res Tech.* 2009;72:868–877.
- 175.**Stephen Neidele *Cancer Drug Design and Discovery* Academic Press, 28 avr. 2011 - 496 pages
- 176.**Strohekert , Cabaton N, Nourdin G, Regnier JF, Lhuguenot JC, et coll. Evaluation of anti-androgenic activity of di-(2-ethylhexyl) phthalate. *Toxicology* 2005, **208** : 115-121
- 177.**Swan SH. Environmental phthalate exposure in relation to reproductive outcomes and other health endpoints in humans. *EnvironRes* 2008;108(02):177–184
- 178.**Szakál DN, Gyorffy H, Arató A, Cseh A, Molnár K, Papp M, et al. Mucosal expression of claudins 2, 3 and 4 in proximal and distal part of duodenum in children with coeliac disease. *Virchows Arch* 2010; 456:245-50; PMID:20143085; <http://dx.doi.org/10.1007/s00428-009-0879-7>

- 179.** Tanaka T. Effects of bis(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on secondary sex ratio of mice in a cross-mating study. *Food Chem Toxicol* 2003;41 (10):1429–1432
- 180.** Tanaka T. Reproductive and neurobehavioural effects of bis(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in a cross-mating toxicity study of mice. *Food Chem Toxicol* 2005;43(04):581–589
- 181.** Tanaka T. Reproductive and neurobehavioural toxicity study of bis(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) administered to mice in the diet. *Food Chem Toxicol* 2002;40(10):1499–1506
- 182.** Teller, I. C., and Beaulieu, J. F. (2001). Interactions between laminin and epithelial cells in intestinal health and disease. *Expert Rev Mol Med* 3, 1-18.
- 183.** de N Bertiaux-Vandaële The expression and the cellular distribution of the tight junction proteins are altered in irritable bowel *syndrome* patients with differences according to the disease subtype. *Am J Gastroenterol* 2011 ; 106(12) :2165-2173.
- 184.** T.-H. Kim, S. Escudero, R.A. Shivdasani, Intact function of Lgr5 receptor-expressing intestinal stem cells in the absence of Paneth cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (2012) 3932–3937, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1113890109>
- 185.** Thompson CM, Proctor DM, Suh M, Haws LC, Kirman CR, Harris MA. Assessment of the mode of action underlying development of rodent small intestinal tumors following oral exposure to hexavalent chromium and relevance to humans. *Crit Rev Toxicol* 2013;43(03):244–274
- 186.** Tonk EC, Verhoef A, Gremmer ER, van Loveren H, Piersma AH. Relative sensitivity of developmental and immune parameters in juvenile versus adult male rats after exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2012; 260: 48–57. doi: [10.1016/j.taap.2012.01.018](https://doi.org/10.1016/j.taap.2012.01.018) [PubMed]
- 187.** Turner JR (2009) Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 9: 799-809
- 188.** Turner, J. R. (2000). "Show me the pathway! Regulation of paracellular permeability by Na(+)-glucose cotransport." *Adv Drug Deliv Rev* 41(3): 265-81.
- 189.** Upson K, Sathyanarayana S, De Roos AJ, et al. Phthalates and risk of endometriosis. *Environ Res* 2013;126:91–97
- 190.** US Department of Health and Human Services, Public Health Service Agency for Toxic Substances and Disease Registry. *Toxicological Profile for Di-(2-ethylhexyl)-*

- 191.** Valvi, D.; Monfort, N.; Ventura, R.; Casas, M.; Casas, L.; Sunyer, J.; Vrijheid, M. Variability and predictors of urinary phthalate metabolites in Spanish pregnant women. *Int. J. Hyg. Environ. Health* **2015**, *218*, 220–231.
- 192.** Vetrano S, Ploplis VA, Sala E, Sandoval-Cooper M, Donahue DL, Correale C, et al. Unexpected role of anticoagulant protein C in controlling epithelial barrier integrity and intestinal inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108:19830-5; PMID:22109555; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1107140108>
- 193.** von Moltke J, Ji M, Liang HE, Locksley RM. Tuft-cell-derived IL-25 regulates an intestinal ILC2-epithelial response circuit. *Nature* (2016) 529(7585):221–5. doi:10.1038/nature16161
- 194.** Wada M, Tamura A, Takahashi N, Tsukita S. Loss of Claudins 2 and 15 From Mice Causes Defects in Paracellular Na(+) Flow and Nutrient Transport in Gut and Leads to Death from Malnutrition. *Gastroenterology* 2012.
- 195.** Walthall K, Cappon GD, HurttME, Zoetis T. Postnatal development of the gastrointestinal system: a species comparison. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 2005;74(02):132–156
- 196.** Wang H, Zhao JX, Hu N, Ren J, Du M, Zhu MJ. Side-stream smoking reduces intestinal inflammation and increases expression of tight junction proteins. *World J Gastroenterol* 2012; 18:2180-7; PMID:22611310; <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v18.i18.2180>
- 197.** Wang L, Li J, Li Q, Zhang J, Duan X-L. Morphological changes of cell proliferation and apoptosis in rat jejunal mucosa at different ages. *World J Gastroenterol* 2003;9(09):2060–2064
- 198.** Wang W, Craig ZR, Basavarajappa MS, Gupta RK, Flaws JA. Di (2-ethylhexyl) phthalate inhibits growth of mouse ovarian antral follicles through an oxidative stress pathway. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2012;258:288-95.
- 199.** Wang Y, Liu Y, Sidhu A, Ma Z, McClain C, Feng W. Lactobacillus rhamnosus GG culture supernatant ameliorates acute alcohol-induced intestinal permeability and liver injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2012; 303:G32-41; PMID:22538402; <http://dx.doi.org/10.1152/ajpgi.00024.2012>
- 200.** Watson, C. J., M. Rowland, et al. (2001). "Functional modeling of tight junctions in intestinal cell monolayers using polyethylene glycol oligomers." *Am J Physiol Cell Physiol* **281**(2): C388-97.
- 201.** Wenzel, A.G.; Brock, J.W.; Cruze, L.; Newman, R.B.; Unal, E.R.; Wolf, B.J.; Somerville, S.E.; Kucklick, J.R. Prevalence and predictors of phthalate exposure in pregnant women in Charleston, SC. *Chemosphere* **2018**, *193*, 394–402.

- 202.** Wild GE, Searles LE, Koski KG, Drozdowski LA, Begum-Hasan J, Thomson ABR. Oral polyamine administration modifies the ontogeny of hexose transporter gene expression in the postnatal rat intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007;293(02): G453–G460
- 203.** Wilson T.H., Wisemang. : The use of sacs of everted small intestine for the study of the transference of substances from the mucosal to the serosal surface. *J. Physiol.*, 1954, **123**, 116-125.
- 204.** Worthington JJ. The intestinal immunoendocrine axis: novel cross-talk between enteroendocrine cells and the immune system during infection and inflammatory disease. *Biochem Soc Trans* (2015) 43(4):727–33. doi:10.1042/ BST20150090
- 205.** Xia XM, Wang FY, Zhou J, Hu KF, Li SW, Zou BB. CXCR4 antagonist AMD3100 modulates claudin expression and intestinal barrier function in experimental colitis. *PLoS One* 2011; 6:e27282; PMID:22073304; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0027282>
- 206.** Xu H, Ghishan FK. Molecular Physiology of Gastrointestinal Function During Development. In: *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. 6th ed. Elsevier Inc. 2018:235–269
- 207.** Xu Y, Cook TJ, Knipp GT. Effects of di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) and its metabolites on fatty acid homeostasis regulating proteins in rat placental HRP-1 trophoblast cells. *Toxicol Sci* 2005;84(02):287–300
- 208.** Yamashita U, Sugiura T, Kuroda E. Effect of endocrine disrupters on immune responses in vitro. *J UOEH*. 2002; 24: 1–10. [[PubMed](#)]
- 209.** Yamashita U, Sugiura T, Yoshida Y, Kuroda E. Effect of endocrine disrupters on macrophage functions in vitro. *J UOEH*. 2005; 27: 1–10. [[PubMed](#)]
- 210.** Yang JJ, Ma YL, Zhang P, Chen HQ, Liu ZH, Qin HL. Histidine decarboxylase is identified as a potential biomarker of intestinal mucosal injury in patients with acute intestinal obstruction. *Mol Med* 2011; 17:1323- 37; PMID:21915437; <http://dx.doi.org/10.2119/mol>
- 211.** med.2011.00107
- 212.** Yao PL, Lin YC, Richburg JH. Mono-(2-ethylhexyl) phthalate induced disruption of junctional complexes in the seminiferous epithelium of the rodent testis is mediated by MMP2. *Biol Reprod*. 2010;82:516–527.
- 213.** Yuhan R, Koutsouris A, Savkovic SD, Hecht G. Enteropathogenic *Escherichia coli*-induced myosin light chain phosphorylation alters intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* 1997 ; 113(6) :1873-1882.
- 214.** Zhang Y, Lin L, Cao Y, Chen B, Zheng L, Ge RS. Phthalate levels and low birth weight: a nested case-control study of Chinese newborns. *J Pediatr* 2009;155(04):500–504

215.Zhang YH, Lin L, Liu ZW, Jiang XZ, Chen BH. Disruption effects of monophthalate exposures on inter-Sertoli tight junction in a two-compartment culture model. *Environ Toxicol.* 2008;23:302– 308.

216.Zheng S-J, Tian H-J, Cao J, Gao Y-Q. Exposure to di(n-butyl)phthalate and benzo(a)pyrene alters IL-1beta secretion and subset expression of testicular macrophages, resulting in decreased testosterone production in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 2010; 248: 28–37. doi: 10.1016/j.taap.2010.07.008 [PubMed]