



HAL
open science

Évaluation de la toxicité des perturbateurs endocriniens dans le cerveau en développement : impacts cellulaires et épigénétiques

Margaux Sechet

► To cite this version:

Margaux Sechet. Évaluation de la toxicité des perturbateurs endocriniens dans le cerveau en développement : impacts cellulaires et épigénétiques. Sciences du Vivant [q-bio]. 2020. dumas-03160786

HAL Id: dumas-03160786

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03160786>

Submitted on 5 Mar 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

U.F.R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 2020

Thèse n° 91

THESE POUR L'OBTENTION DU
DIPLOME D'ETAT de DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement

Par SECHET, Margaux

Née le 24/12/1993 à Lorient

Le 09/09/2020

**EVALUATION DE LA TOXICITE DES PERTURBATEURS
ENDOCRINIENS DANS LE CERVEAU EN DEVELOPPEMENT :
IMPACTS CELLULAIRES ET EPIGENETIQUES**

Sous la direction de : Isabelle PASSAGNE, Maître de Conférence Universitaire

Membres du jury :

M. GUILLON, Jean, Professeur Universitaire

M. COURTOIS, Arnaud, Maître de Conférence Universitaire

M. BERTHELON, Patrick, Pharmacien d'Officine

Président

Rapporteur

Examineur

Remerciements

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué au succès de mes années de pharmacie et qui ont participé au cheminement de ce rapport.

Je tiens, tout d'abord, à exprimer ma gratitude aux membres du jury pour avoir accepté d'évaluer ce travail et de m'honorer de leur présence : Professeur Jean GUILLON, Arnaud COURTOIS ainsi que Patrick BERTHELON.

Je remercie Isabelle PASSAGNE, ma directrice de thèse, pour m'avoir initiée et formée à la recherche lors de mon premier stage en recherche, il y a quelques années maintenant. Je la remercie d'avoir accepté de suivre cette thèse, de sa confiance et de la liberté qu'elle m'a accordée.

Je tiens à remercier vivement mon encadrante de stage de master 2, Anne-Laure SCHANG, pour m'avoir permis de travailler dans son équipe, pour son encadrement et son implication tout au long de ce projet, pour le temps passé ensemble et le partage de son expérience au quotidien. Grâce à sa confiance, j'ai pu m'accomplir totalement dans mes missions. J'ai énormément appris à ses côtés, tant sur le plan scientifique que sur l'aspect général de la recherche. Merci également de m'avoir encouragée et permis de participer à des congrès dont un premier en tant qu'intervenante. Je m'en souviendrai !

J'adresse mes remerciements à Olivier LAPREVOTE pour m'avoir permis d'intégrer le master 2 THERV, pour son accueil chaleureux au sein de son laboratoire, pour sa gentillesse et son éternelle bienveillance.

J'exprime également ma reconnaissance envers Pierre GRESSENS pour m'avoir accueillie et donné l'opportunité de mener mes expériences dans son laboratoire de neurologie lors de mon stage de master 2. Je remercie également les différentes équipes de l'unité que j'ai

pu côtoyer, Juliette, Sophie, Emilie, Alice et Pierre pour leur gentillesse, leurs conseils avisés et pour le temps qu'ils m'ont accordé.

Je remercie particulièrement Orlane, Yann, Romain et Nicolas pour nos discussions entre stagiaires, nos partages et leurs ondes positives.

Je remercie tous les membres des unités UMR 8638 et INSERM 1141 pour les six mois de stage qui ont permis d'aboutir à cette thèse. C'était une expérience riche en découverte et apprentissage.

Merci à mes amis, les anciens comme les plus récents, ceux qui m'ont soutenue et encouragée pour que je finisse enfin cette thèse.

Et enfin, merci à ma famille. Ma mère, pour les multiples relectures et ses conseils pour une bibliographie parfaite. Ma sœur et ma grand-mère pour m'avoir (presque) harcelée quant à la date de la soutenance de ma thèse... tout vient à point à qui sait attendre, nous y sommes !

Table des matières

REMERCIEMENTS	3
TABLE DES MATIERES	5
LISTE DES FIGURES.....	8
LISTE DES TABLEAUX.....	9
LISTE DES ABREVIATIONS.....	10
INTRODUCTION GENERALE	13
A. CONTEXTE SCIENTIFIQUE	15
1 GENERALITES SUR LES TROUBLES NEURODEVELOPPEMENTAUX	15
1.1 DEFINITION ET INCIDENCE DES TND	15
1.2 LES CAUSES DES TND	17
1.3 MECANISMES NEURODEVELOPPEMENTAUX	18
1.4 MARQUEURS DE DIFFERENCIATION CELLULAIRE	21
1.4.1 <i>Différenciation neuronale et expression de KCC2</i>	21
1.4.2 <i>Différenciation oligodendrocytaire et marqueurs de myélinisation</i>	22
1.4.3 <i>Facteurs sécrétés et TND</i>	23
1.4.3.1 Les marqueurs de neuroinflammation	23
1.4.3.2 Le BDNF, un marqueur du neurodéveloppement et de TND	24
1.5 MECANISMES EPIGENETIQUES IMPLIQUE DANS LES TND	25
1.5.1 <i>L'épigénétique : origine et définitions</i>	25
1.5.2 <i>Hérédité épigénétique versus plasticité</i>	28
1.5.3 <i>L'épigénétique au cours du neurodéveloppement normal ou altéré</i>	31
1.5.4 <i>Exemple de mécanisme épigénétique : la méthylation de l'ADN</i>	31
2 PERTURBATEURS ENDOCRINIENS	33
2.1 HISTORIQUE ET CADRE REGLEMENTAIRE	33
2.2 PRESENTATION DES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS CONNUS	37
2.2.1 <i>Les substances naturelles</i>	38

2.2.2	<i>Les polluants organiques persistants</i>	38
2.2.3	<i>Les pesticides</i>	39
2.2.4	<i>Les plastifiants</i>	40
2.2.5	<i>Les médicaments</i>	41
2.3	MECANISMES D’ACTION DES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS	41
2.3.1	<i>Effets hormono-mimétiques</i>	43
2.3.2	<i>Effets antagonistes</i>	44
2.3.3	<i>Effets directs sur les hormones</i>	44
2.4	IMPACTS POSSIBLES DES PE SUR LA SANTE HUMAINE	44
2.5	IMPACTS DES PE ET TND	47
2.5.1	<i>Le bisphénol A</i>	47
2.5.1.1	Cibles du BPA	48
2.5.1.2	Impact sur le neurodéveloppement	49
2.5.2	<i>Les phtalates</i>	50
2.5.2.1	Cibles des phtalates	51
2.5.2.2	Impact sur le neurodéveloppement	51
2.5.3	<i>Les méthodes d’évaluation du risque neurodéveloppemental des PE</i>	52
B.	TRAVAIL EXPERIMENTAL	55
1	OBJECTIFS DE LA THESE	55
2	MATERIEL ET METHODES	57
2.1	CULTURES	57
2.1.1	<i>Culture organotypique murine</i>	57
2.1.2	<i>Culture primaire de microglie murine</i>	59
2.2	EXTRACTION D’ARN, TRANSCRIPTION INVERSE ET REACTION DE POLYMERISATION EN CHAINE QUANTITATIVE EN TEMPS REEL (RT-QPCR)	60
2.2.1	<i>Extraction des ARNs de culture organotypique</i>	60
2.2.2	<i>Extraction des ARNs de culture primaire microgliale</i>	61
2.2.3	<i>Transcription inverse et PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR)</i>	61
2.3	EXTRACTION D’ADN ET ANALYSE DE METHYLATION CIBLEE	63

2.3.1	<i>Extraction des ADNs de culture organotypique</i>	63
2.3.1	<i>Méthylation d'ADN</i>	65
2.3.2	<i>PCR quantitative en temps réel (qPCR)</i>	65
2.4	TEST ELISA TNF- α ET IL-1 β	66
2.5	METHODOLOGIE ET STATISTIQUES	67
3	RESULTATS	69
3.1	IMPACT DES PE SUR L'EXPRESSION DE <i>BDNF</i> ET <i>KCC2</i>	69
3.2	AUTRES MARQUEURS DU NEURODEVELOPPEMENT	71
3.2.1	<i>Impact des PE sur la myélinisation</i>	71
3.2.2	<i>Impacts sur l'inflammation et sur le phénotype microglial</i>	71
3.1	IMPACTS EPIGENETIQUES DES PE	75
3.1.1	<i>Impact sur l'expression des gènes codant les DNMT (1, 3a et 3b)</i>	75
3.1.2	<i>Analyse de méthylation</i>	75
4	DISCUSSION	76
4.1	IMPACTS SUR <i>KCC2</i> ET <i>BDNF</i>	76
4.2	IMPACT SUR LA MYELINISATION	77
4.3	IMPACT SUR L'INFLAMMATION	78
4.4	IMPACTS EPIGENETIQUES	79
4.5	MECANISMES D'ACTION POSSIBLES	80
5	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	82
6	REFERENCES	83
7	ANNEXES	94
7.1	ANNEXE 1 : PRINCIPAUX SUPPORTS DE L'INFORMATION EPIGENETIQUE	94
7.1.1	<i>Composants de l'héochromatine</i>	94
7.1.2	<i>Protéines polycomb</i>	94
7.1.3	<i>ARN non codants</i>	95
7.1.4	<i>Méthylation de l'ADN</i>	95
7.2	ANNEXE 2 : PRINCIPE DU DOSAGE ENZYMATIQUE EN SANDWICH ELISA.....	97

Liste des figures

Figure 1 : Les différents troubles neurodéveloppementaux.	16
Figure 2 : Étapes de développement du SNC de la conception à l'âge adulte	20
Figure 3 : Mécanismes épigénétiques maintenant les identités cellulaires au cours du développement puis tout au long de la vie (Cavalli et Heard 2019)..	26
Figure 4 : Variation du niveau de méthylation de l'ADN lors de la reprogrammation et programmation épigénétique (Kundakovic et Jaric 2017).	30
Figure 5 : Historique de la perturbation endocrinienne	34
Figure 6 : Les perturbateurs endocriniens	36
Figure 7 : Mécanismes d'action des PE	42
Figure 8 : Structure chimique du bisphénol A	46
Figure 9 : Métabolisme simplifié du DEHP (di-(2-éthylhexyl)phtalate) en MEHP (mono-(2-éthylhexyl)phtalate) (Monfort et al. 2012).	46
Figure 10 : Choix des paramètres expérimentaux des cultures organotypiques	58
Figure 11 : Schéma représentant le déroulement de la culture organotypique de cerveaux de souriceaux du jour de coupe jusqu'au DIV6 correspondant à l'arrêt de l'exposition	58
Figure 12 : Représentation du locus <i>Bdnf</i> ciblé par l'analyse de méthylation..	64
Figure 13 : Le BPA et le MEHP perturbent l'expression des gènes <i>Bdnf</i> et <i>Kcc2</i> dans les cultures mâles	68
Figure 14 : Le BPA augmente l'expression de <i>Mog</i> à la concentration de 10 µM chez le mâle	70
Figure 15 : Le MEHP augmente l'expression de <i>Il1b</i> à la concentration de 10 µM dans les cultures organotypiques mâles	72
Figure 16 : Le BPA perturbe l'expression des gènes <i>Dnmt1</i> , <i>Dnmt3a</i> et <i>Dnmt3b</i> chez le mâle	74

Liste des tableaux

Tableau 1 : Séquences des amorces utilisées en PCR quantitative. 61

Tableau 2 : Séquences des amorces utilisées pour l'étude de la méthylation ciblée. 64

Liste des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire

ARN : acide ribonucléique

ARNm : acide ribonucléique messenger

BDNF / *Bdnf* : Brain-Derived Neurotrophic Factor

BPA : bisphénol A

CNPase / *Cnp* : 2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase

DEHP : di-(2-éthylhexyl)phtalate

DIV : Day In Vitro

DMSO : diméthylsulfoxyde

DNMT : DNA méthyltransférase

HBSS : Hank's Balanced Salt Solution

HEPES : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique

HS : Horse Serum

Il-1 β / *Il1b* : Interleukine 1-beta

KCC2 / *Kcc2* : Cotransporteur Chlorure-Potassium 2

MBP / *Mbp* : Myelin Basic Protein

MEHP : mono-(2-éthylhexyl)phtalate

MEM : Minimum Essential Medium Eagle

MOG / *Mog* : Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein

P2 / P5 : 2 ou 5 jours post-natal

PBS : tampon phosphate salin

PCR : Polymerase Chain Reaction

PE : Perturbateur Endocrinien

PPAR γ / *Pparg* : Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma

qPCR : quantitative polymerase chain reaction

Rpl13 : Ribosomal protein L13 (gene)

SNC : Système Nerveux Central

TDAH : Troubles du Déficit de l'Attention avec Hyperactivité

TND : Troubles Neurodéveloppementaux

TNF- α / *Tnfa* : Tumor Necrosis Factor alpha

TSA : Troubles du Spectre Autistique

Introduction générale

Les troubles neurodéveloppementaux (TND), incluant des déficits cognitifs, d'apprentissage, de l'attention ou encore les troubles du spectre autistique, touchent plus de 10 % des enfants dans le monde. L'augmentation de leur incidence soulève des inquiétudes quant au rôle que pourraient jouer les polluants environnementaux, en particulier les perturbateurs endocriniens (PE). Depuis plusieurs années, le grand public, la recherche et les organismes réglementaires se questionnent sur la problématique des PE. Malgré la caractérisation de nombreuses cibles et modes d'action des PE, la mise en place d'outils hautement spécifiques ainsi que le développement de cadres réglementaires, de nouveaux défis émergent en permanence avec l'apparition de nouvelles questions sur les PE et des limites sont encore aujourd'hui inhérentes à l'évaluation de la toxicité des PE.

Face au manque de preuves directes de leur toxicité, ce projet a pour objectif de développer une approche alternative aux méthodes *in vivo*, combinant l'utilisation de modèles cellulaires et de sections cérébrales murines. Cette approche sera tout d'abord validée en reproduisant *in vitro* certains effets déjà décrits *in vivo* de PE largement répandus dans l'environnement tels que le bisphénol A et les phtalates. Les voies de toxicité en jeu seront alors analysées, en privilégiant les altérations épigénétiques en tant que mécanismes susceptibles de contribuer aux effets indésirables des PE. L'analyse de ces altérations pourrait augmenter la sensibilité de la méthode d'évaluation et permettre de définir des biomarqueurs traduisant l'exposition aux PE.

Dans une première partie, nous exposerons le contexte scientifique de cette thèse. Nous commencerons par les généralités sur les TND incluant leur incidence, les mécanismes neurodéveloppementaux, les marqueurs de différenciation cellulaire et les mécanismes épigénétiques pouvant être à l'origine de ces troubles. Nous parlerons ensuite des PE en détaillant leurs mécanismes d'action, leurs impacts sur la santé humaine et plus particulièrement leur implication dans les TND.

Dans une seconde partie, nous présenterons les objectifs et travaux expérimentaux mis en œuvre pour ce projet de thèse. Le matériel et méthodes sera développé avant d'aborder les résultats obtenus au cours de la présente étude. Nous discuterons des données présentées puis nous conclurons.

A. Contexte scientifique

1 Généralités sur les troubles neurodéveloppementaux

1.1 Définition et incidence des TND

Les troubles neurodéveloppementaux (TND) constituent un groupe de troubles hétérogènes et chroniques qui reposent sur une perturbation dans l'acquisition des fonctions cérébrales. Les capacités altérées recouvrent la motricité fine et globale, le langage, les interactions sociales ou encore la cognition, entraînant des conséquences directes sur les activités de la vie quotidienne. Les pathologies les plus sévères sont généralement identifiées plus tôt que les formes mineures et modérées, qui sont les formes les plus fréquentes. Les troubles de développement incluent la paralysie cérébrale, le retard de développement, le handicap mental, le trouble primaire du langage ou dysphasie, les troubles du spectre autistique (TSA), les troubles du déficit de l'attention avec/sans hyperactivité (TDAH ou TDA), les troubles d'apprentissage, et le trouble d'acquisition de la coordination (Shevell 2010) (**Figure 1**). Ils constituent une part importante de la neurologie pédiatrique et touchent plus de 10% des enfants dans le monde (Grandjean et Landrigan 2014).

Il existe une certaine cooccurrence de plusieurs de ces pathologies dans le cas de TND. Ainsi, jusqu'à 70% des personnes atteintes de TSA présentent une déficience intellectuelle. Les TDAH ou TDA peuvent être associés à d'autres troubles notamment à la dyslexie développementale (DD) et au trouble développemental de la coordination (TDC).

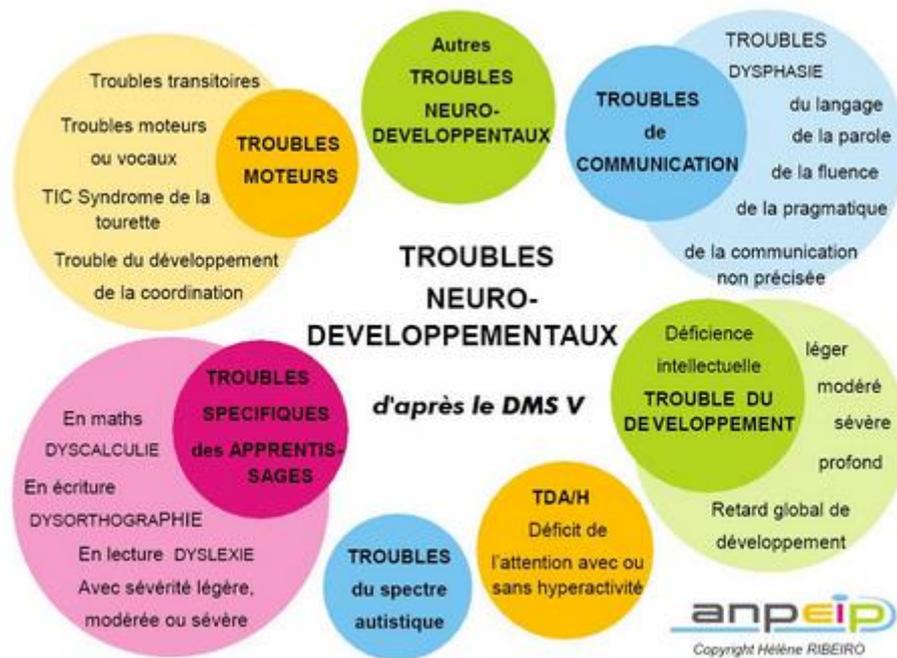


Figure 1 : Les différents troubles neurodéveloppementaux (d’après l’Anpeip (1)).

En plus de ces troubles du développement qui apparaissent précocement pendant l'enfance, d'autres maladies d'apparition beaucoup plus tardive semblent, elles aussi, être liées à une perturbation du développement cérébral. C'est notamment le cas des maladies neuropsychiatriques telles que la schizophrénie, qui apparaît à la fin de l'adolescence ou au début de l'âge adulte, et des maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson ou encore la maladie d'Alzheimer. A titre d'exemple, des études épidémiologiques et *in vivo* ont montré un possible lien entre une infection chez la mère pendant la grossesse et l'apparition de ces maladies (Knuesel et al. 2014). En effet, ces perturbations développementales peuvent d'abord s'avérer silencieuses, mettant en jeu une modification persistante du système nerveux central (SNC), cliniquement inapparente à moins d'être démasquée par un événement secondaire, par exemple au cours du vieillissement (Kraft et al. 2016). Cette neurotoxicité silencieuse, induisant des pathologies tardives, s'inscrit dans la théorie des origines développementales de la santé (DOHaD), qui suggère que les événements survenant durant la vie fœtale ou l'enfance pourraient prédisposer au développement de maladies à l'âge adulte, notamment à la suite d'une seconde exposition (2) (3).

1.2 Les causes des TND

Les facteurs génétiques semblent être impliqués uniquement dans 30 à 40% des cas de TND ; les autres causes restent encore non élucidées ou mal comprises. En effet, même si des facteurs génétiques ont été identifiés, ils ne peuvent à eux seuls expliquer l'augmentation de la fréquence des TND au cours des dernières années (Grandjean et Landrigan 2014). Les troubles du neurodéveloppement sont d'origine multifactorielle, provoquée par la combinaison de facteurs génétiques, épigénétiques mais également environnementaux. Dans le cas de l'autisme, dans les années 1990 en France, la prévalence était estimée à une naissance sur 10 000. En 2000, elle passait à une naissance sur 1000 puis, en 2013, à une naissance sur 100, pour arriver à une naissance sur 50 aujourd'hui. Cette évolution peut être expliquée par une augmentation du diagnostic des TSA et à un élargissement des critères compris dans ce diagnostic (4).

Cependant, l'implication des facteurs environnementaux est de plus en plus invoquée, notamment au cours du développement fœtal et post-natal. Parmi les facteurs environnementaux, l'exposition à certaines substances chimiques pendant la vie fœtale est suggérée comme cause. En particulier, l'exposition du cerveau aux perturbateurs endocriniens

(PE) est aujourd'hui mise en cause dans l'augmentation de l'incidence des TND. Un nombre croissant d'études a maintenant permis d'entrevoir une possible association entre l'exposition à certains PE et le risque de développer des TND (Braun 2017). Il a par exemple été montré que l'exposition prénatale à plusieurs phtalates était associée à des troubles autistiques (Miodovnik et al. 2011) et à un développement mental et psychomoteur réduit (Whyatt et al. 2011). De plus, l'exposition prénatale au bisphénol A (BPA) a été associée à des comportements plus intériorisés chez les enfants (Evans et al. 2014) et à un risque accru de comportements caractérisant un TDAH à 4 ans (Casas et al. 2015).

1.3 Mécanismes neurodéveloppementaux

Pour comprendre l'impact des PE sur le cerveau, il est nécessaire de connaître le développement normal du SNC qui correspond à une séquence de processus développementaux interdépendants.

Malgré les récents progrès faits ces dernières années sur les mécanismes physiopathologiques, environ 40% des TND restent inexplicables. Ceci démontre un vrai besoin d'accélérer les recherches dans ce domaine. Pour ce faire, il faut d'abord comprendre les différentes étapes clés du développement cérébral. Les étapes impliquées dans la formation du SNC vont être nombreuses comme notamment la prolifération, la migration et la différenciation cellulaire, ainsi que l'apoptose. Il existe des phases « critiques », correspondant à des périodes pendant lesquelles certaines étapes doivent impérativement se produire car elles ne pourront être compensées à posteriori. Au cours de ces périodes critiques, l'environnement a un rôle déterminant dans le bon développement des circuits neuronaux. Ce sont des fenêtres de vulnérabilité accrue.

Le développement du SNC débute très tôt au cours de l'embryogénèse. La première étape de formation du système nerveux, la neurulation, se termine durant la quatrième semaine du développement embryonnaire. Par la suite, les neurones puis les cellules gliales d'origine neurale (astrocytes et oligodendrocytes) prolifèrent et migrent ; certaines cellules meurent par apoptose ; les synapses se forment et les axones sont myélinisés par les oligodendrocytes. La microglie constitue une population supplémentaire de cellules gliales d'origine extra-cérébrale.

Issue de la lignée myéloïde, la microglie colonise le cerveau pendant les deux premiers trimestres, dès la quatrième semaine de gestation. Tous ces processus se produisent selon un schéma spatio-temporel bien défini et finement régulé au cours du développement (**Figure 2**) (Knuesel et al. 2014). Le développement du système nerveux découle d'une succession d'étapes et certains processus se déroulent quasi-uniquement pendant la vie utérine comme la migration neuronale. D'autres continueront jusqu'à l'âge adulte comme la myélinisation. En fonction de la période à laquelle l'exposition survient, les processus développementaux affectés seront donc différents.

Si on s'intéresse aux perturbateurs endocriniens, la fenêtre d'exposition est essentielle en termes d'impacts sur le développement ; celle-ci est critique en particulier lorsqu'elle survient pendant la période fœtale. Au cours du développement fœtal, les PE peuvent traverser la barrière placentaire et atteindre le cerveau, en fonction notamment de leur lipophilie. Les effets induits peuvent apparaître des années plus tard et être permanents. A l'âge adulte, l'exposition pourra entraîner un effet immédiat potentiellement réversible. Pour exemple, le diéthylstilbestrol (DES) ou le BPA, auraient une action sur un nombre important de mécanismes cellulaires et moléculaires, jouant un rôle primordial dans le neurodéveloppement. Le BPA aurait plusieurs points d'impacts dans le neurodéveloppement. A l'heure actuelle, les mécanismes sont loin d'être élucidés. Le BPA pourrait notamment stimuler le récepteur androgénique pour affecter la neurogenèse, dans le cerveau en développement. On observerait une diminution de l'expression de protéines synaptiques (synapsine 1 et PSD-95) au niveau de l'hippocampe lors d'une exposition juvénile. Il a été montré dans une étude sur l'analyse du sang du cordon ombilicale que le BPA diminuait l'expression de certains facteurs de transcription, comme Sox2 et Pax6, impliqués dans des processus neurodéveloppementaux (Nesan et al. 2018).

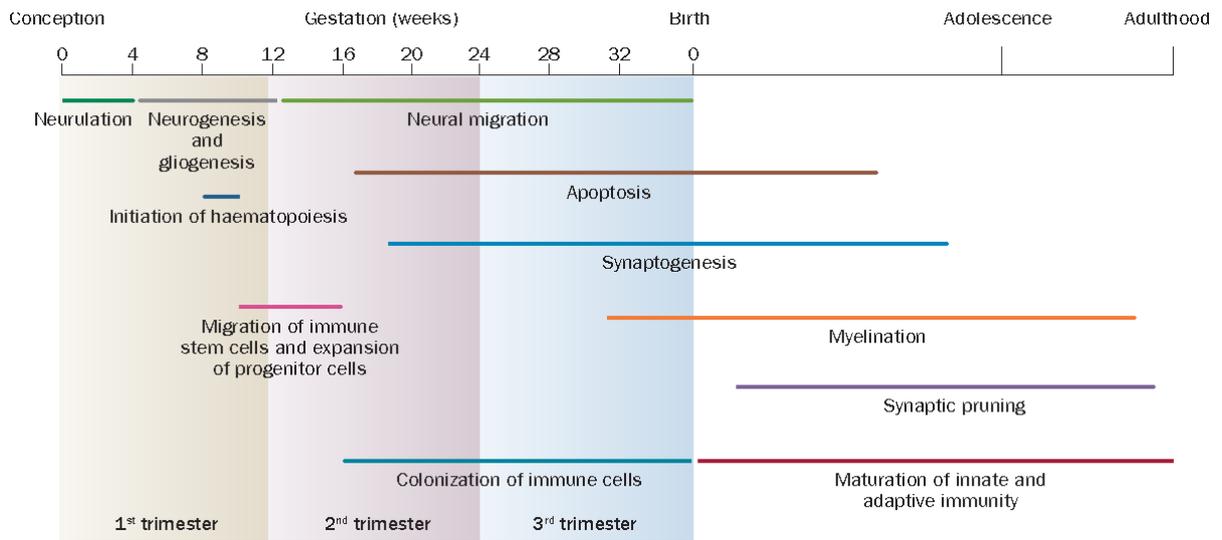


Figure 2 : Étapes de développement du SNC de la conception à l'âge adulte (Knuesel et al. 2014).

1.4 Marqueurs de différenciation cellulaire

Certains marqueurs de différenciation spécifiques d'un type cellulaire sont classiquement étudiés pour suivre le bon déroulement d'un processus développemental donné. De plus, ces étapes mettent en jeu de nombreuses interactions entre les différents types cellulaires, par l'intermédiaire de contacts directs et de signaux sécrétés. Par exemple, les interactions entre les facteurs inflammatoires et la signalisation par les facteurs de croissance tels que le BDNF (facteur neurotrophique dérivé du cerveau) sont suspectées de contribuer au développement de TND. L'étude de ces marqueurs de différenciation connus pourrait ainsi permettre de prédire l'incidence ou l'apparition des TND.

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés aux marqueurs de différenciation de différents types cellulaires du SNC, à savoir les marqueurs de différenciation des neurones et des oligodendrocytes, mais aussi à des marqueurs de neuroinflammation et de neurodéveloppement.

1.4.1 Différenciation neuronale et expression de KCC2

Les neurones sont les premières cellules à se mettre en place dans le SNC (**Figure 2**) (Knuesel et al. 2014). Au début de la neurogenèse, des défauts de prolifération et/ou de migration conduisent à des anomalies sévères, souvent non viables. Certaines perturbations plus tardives peuvent entraîner des altérations du fonctionnement neuronal affectant notamment le fonctionnement des synapses et la neurotransmission.

Dans le SNC, le chlorure neuronal est un paramètre cellulaire fondamental qui dicte la neurotransmission par le GABA (acide γ -aminobutyrique), neurotransmetteur inhibiteur principal (Ganguly et al. 2001). Le maintien de faibles niveaux en chlorure intracellulaire est assuré par le cotransporteur chlorure-potassium 2 (KCC2), qui est exclusivement responsable de l'extrusion du chlorure des neurones matures. Le développement du SNC est caractérisé par un taux de chlorure neuronal initialement élevé dans les neurones immatures, corrélé avec leur phénotype migratoire, suivi d'une diminution au cours du développement périnatal.

Ce changement hautement dynamique est induit par l'augmentation de l'expression de KCC2 et dénommé le *chloride shift*, dont la perturbation représente une voie de toxicité potentielle pour les PE (Yeo et al. 2013).

1.4.2 Différenciation oligodendrocytaire et marqueurs de myélinisation

Une fois les neurones en place, la myélinisation représente une étape importante de la maturation du SNC, qui débute avec la différenciation des oligodendrocytes et se poursuit longtemps après la naissance (**Figure 2**). Après induction par des signaux adéquats, ces cellules dites spécifiées puis déterminées sont appelées progéniteurs des oligodendrocytes (OPC). Les progéniteurs donnent progressivement naissance aux précurseurs, préoligodendrocytes, oligodendrocytes immatures non myélinisants, et enfin aux oligodendrocytes matures myélinisants c'est-à-dire fonctionnels (Volpe et al. 2011). Les oligodendrocytes synthétisent la gaine de myéline entourant les axones de nombreux neurones, assurant ainsi la conduction saltatoire des potentiels d'action. La gaine de myéline est formée par l'enroulement en spirale des extensions plasmatiques des oligodendrocytes autour d'un axone, suivi de l'extrusion du cytoplasme et de la compaction des différentes couches membranaires. Bien que principalement composée de lipides, la myéline contient également des protéines spécifiques qui jouent un rôle important dans sa structure et son intégrité. Dans le SNC, les principales protéines de la myéline synthétisées par les oligodendrocytes sont la Myelin Proteolipid Protein (PLP/DM-20) et la Myelin Basic Protein (MBP). Elles constituent à elles seules 80% des protéines totales. Dans des proportions nettement moins abondantes sont retrouvées la Myelin-Associated Glycoprotein (MAG), la Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein (MOG) ou encore la 2'-3'-Cyclic Nucleotide 3'-Phosphodiesterase (CNP) (Baumann et Pham-Dinh 2001). Ces protéines et leurs transcrits respectifs sont utilisés comme marqueurs de la différenciation et de la maturation oligodendrocytaire. Ainsi, une diminution de leur expression peut refléter, à nombre égal d'oligodendrocytes, un défaut de maturation de ces cellules et de la myélinisation.

1.4.3 Facteurs sécrétés et TND

Au cours des TND, des facteurs peuvent être libérés et perturber ainsi le développement neuronal normal. Il s'agit principalement de l'activation de facteurs pro-inflammatoires et de modification de l'expression ou de la libération d'un facteur de croissance, le BDNF.

1.4.3.1 *Les marqueurs de neuroinflammation*

La neuroinflammation (inflammation du SNC) est impliquée dans la physiopathologie d'un grand nombre de TND, y compris les TSA (Pozzi et al. 2018). En cas de perturbation d'origine environnementale, l'activation de la microglie dans un premier temps, puis des astrocytes dans un second temps, entraînent la libération de facteurs pro-inflammatoires participant à la défense et à la réparation éventuelle de lésions, mais qui peuvent aussi perturber ces événements de différenciation et exercer une neurotoxicité vis-à-vis des neurones et des oligodendrocytes (Liddel et al. 2017). Les cellules microgliales sont aujourd'hui définies comme étant les macrophages résidents du SNC et constituent la principale défense immunitaire du parenchyme cérébral. Leur activation est un processus cellulaire modifiant rapidement les propriétés microgliales lors de changements dans leur environnement (lésion, changement de concentration des composants du milieu extracellulaire, entrée de pathogènes...). Cette réponse se caractérise généralement par un changement morphologique (rétraction des prolongements les plus fins, augmentation de la taille du soma), l'expression de nouvelles protéines, la sécrétion de facteurs pro et anti-inflammatoires, une prolifération, éventuellement la migration des cellules aux sites lésés, et une activité de phagocytose pour éliminer des débris cellulaires. Les facteurs impliqués dans la réponse pro-inflammatoire sont, notamment, le facteur de nécrose tumorale α (TNF- α), l'interleukine 1- β (IL-1 β), l'interleukine 6 (IL-6) et la cyclooxygénase 2 (COX2) (Mantovani et al. 2002; Belarbi et Rosi 2013). Les facteurs pro-inflammatoires libérés déclenchent alors rapidement d'autres réponses cellulaires, incluant l'activation des astrocytes. L'induction de l'expression de ces facteurs pro-inflammatoires représente un mécanisme potentiel de toxicité neurodéveloppementale (Kraft et Harry 2011).

De plus, on sait maintenant que ces cellules exercent des fonctions développementales cruciales, en particulier dans l'élimination des synapses en excès (*synaptic pruning*, **Figure 2**) et la maturation des réseaux neuronaux (Neniskyte et Gross 2017). La modulation du

fonctionnement de ces cellules par des agents environnementaux immunomodulateurs pourrait affecter ces fonctions et entraîner des troubles fonctionnels associés à des défauts synaptiques, comme cela est suggéré dans le cas de l'autisme (Ohja et al. 2018; Pozzi et al. 2018). Dans leur étude, Ohja et collaborateurs explorent notamment les inter-relations entre les facteurs neuroimmunologiques et les facteurs de croissance, en particulier la signalisation par le BDNF.

1.4.3.2 Le BDNF, un marqueur du neurodéveloppement et de TND

Le BDNF est une petite protéine sécrétée qui fait partie de la famille des neurotrophines (Boulle et al. 2012). Son action dépend de deux récepteurs distincts qui diffèrent dans leurs voies de signalisation respectives en aval. Le BDNF joue un rôle important dans le développement neuronal normal (Ernfors et al. 1995). Le BDNF est fortement exprimé dans les structures limbiques et le cortex cérébral, et est important pour la neurogenèse et la potentialisation à long terme, faisant de ce facteur trophique un acteur clé de l'apprentissage et de la mémoire.

L'expression de BDNF est finement régulée dans le cerveau et des modifications de l'expression ou de la libération neuronale du BDNF sont supposées induire un fonctionnement anormal de certaines régions du cerveau (Martinowich et al. 2007; Greenberg et al. 2009). L'expression de ce facteur est aujourd'hui considérée, dans de nombreux contextes différents, comme un marqueur de perturbation neurodéveloppementale (Kundakovic et Jaric 2017). Il a ainsi été montré dans un modèle murin que la diminution de l'expression de BDNF était corrélée à des défauts de myélinisation caractérisés par la diminution de l'expression de MBP (Peckham et al. 2016). D'autres exemples illustreront ce point dans la suite de l'introduction consacrée à la toxicité neurodéveloppementale des PE. De façon importante, ces études ont permis de mieux comprendre les mécanismes de mémoire moléculaire liant une perturbation précoce au développement plus tardif de TND. En particulier, un intérêt récent a été porté à la régulation épigénétique de l'expression du BDNF et, plus largement, aux modifications épigénétiques induites par les polluants environnementaux tels que les PE.

1.5 Mécanismes épigénétiques impliqué dans les TND

L'importance des mécanismes épigénétiques dans les processus neurodéveloppementaux a été récemment mise en lumière. Pour comprendre cela, nous ferons une présentation de l'épigénétique, de son implication au cours du neurodéveloppement normal ou altéré puis, afin d'illustrer ces propos, nous aborderons un exemple de mécanisme épigénétique.

1.5.1 L'épigénétique : origine et définitions

Les biologistes cherchent depuis longtemps à comprendre comment un ovule fécondé peut former un organisme composé de centaines de types cellulaires spécialisés, chacun exprimant un ensemble défini de gènes.

L'identité cellulaire est désormais reconnue comme le résultat de l'expression de combinaisons spécifiques de gènes (**Figure 3**). Ce modèle d'expression doit être établi et maintenu : deux processus distincts mais connectés. La pluripotence de la cellule initiale et l'établissement de types cellulaires dépendent dans une large mesure du déploiement coordonné de centaines de facteurs de transcription qui se lient à des séquences d'ADN spécifiques pour activer ou réprimer la transcription des gènes de la lignée cellulaire (Srivastava et DeWitt 2016). Cette phase d'établissement correspond à ce qui est généralement cité comme la première définition de l'épigénétique par Conrad Waddington, à savoir l'étude des mécanismes par lesquels le génotype produit le phénotype dans le contexte du développement (Waddington 2012). La phase de maintenance implique souvent beaucoup de cofacteurs de chromatine non spécifiques de séquence d'ADN qui établissent et maintiennent des états de chromatine par division cellulaire et pendant de longues périodes de temps, parfois en l'absence des facteurs de transcription initiaux (Schuettengruber et al. 2017). Cette phase s'apparente davantage à une définition de l'épigénétique proposée par Nanney, puis élaborée par Riggs et Holliday et modifiée par Bird pour signifier l'héritage d'autres états de chromatine en l'absence de changements dans la séquence d'ADN (Cavalli et Heard 2019).

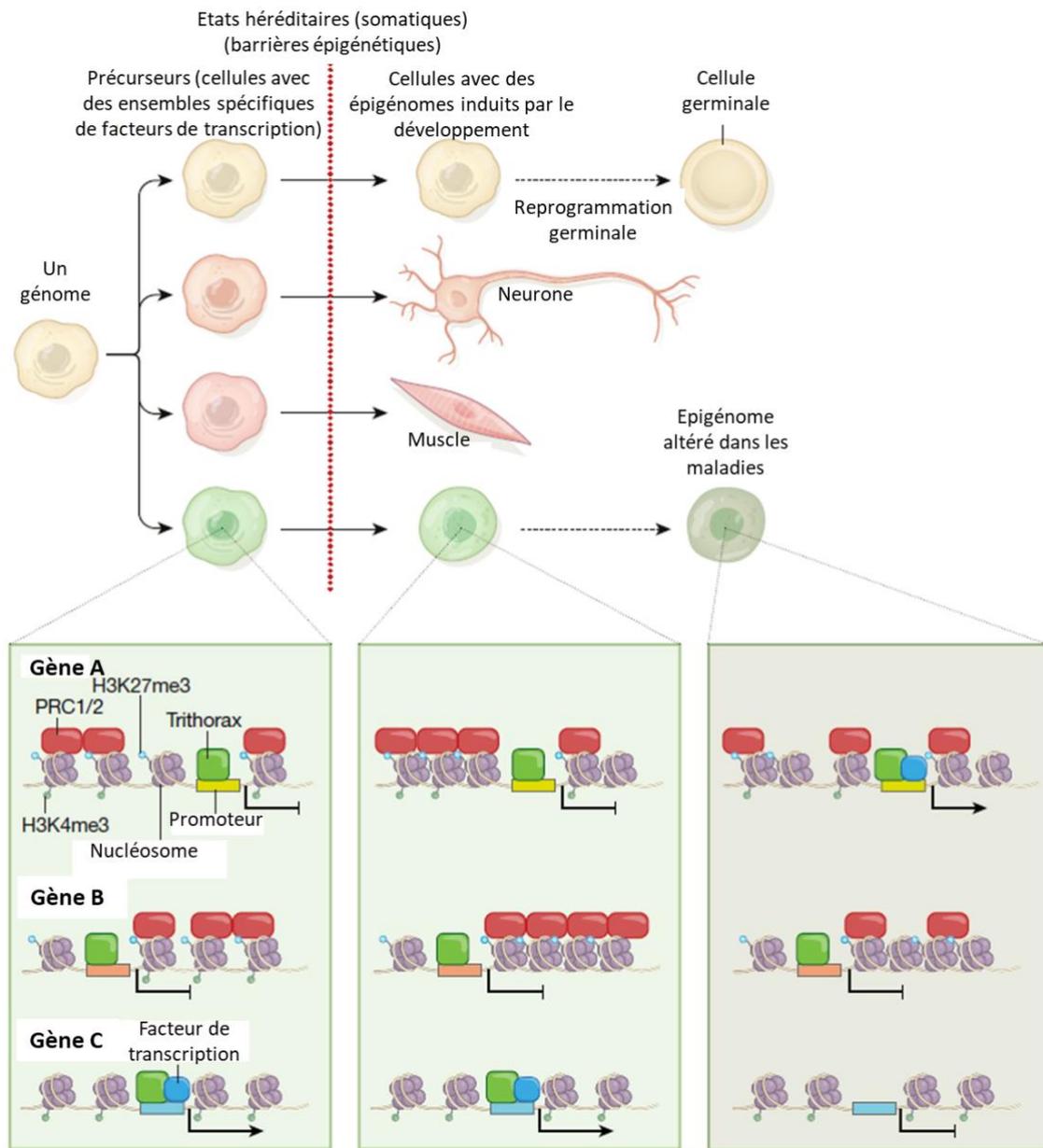


Figure 3 : Mécanismes épigénétiques maintenant les identités cellulaires au cours du développement puis tout au long de la vie (Cavalli et Heard 2019). A partir du génome, des facteurs de transcription spécifiques du stade et du type cellulaire déclenchent des cascades de régulation induisant la différenciation cellulaire. Les composants épigénétiques (par exemple Polycomb PRC1/2 et les protéines Trithorax) maintiennent des états « on » ou « off » sur les gènes (sur la partie base de cette figure sont schématisés trois gènes sous forme de chromatine dans lesquels la transcription est déclenchée par des facteurs de transcription spécifiques et des états silencieux ou actifs sont maintenus par les protéines PRC1/2 ou Trithorax respectivement). Ils constituent donc des obstacles à une reprogrammation accidentelle ce qui permet le maintien de l'homéostasie développementale et physiologique. Des épigénomes altérés peuvent entraîner des changements dans la différenciation cellulaire programmée et des maladies (en bas à droite). La reprogrammation germinale réinitialise la majorité (mais pas la totalité) de l'épigénome pour atteindre la reproduction (en haut à droite).

La méthylation de l'ADN a été proposée très tôt comme vecteur d'informations épigénétiques, des travaux ultérieurs révélant que les protéines de chromatine et les ARN non codants sont également importants pour ce processus (Chen et al. 2016; Festuccia et al. 2017; Sharma et Rando 2017).

Depuis 1942, date à laquelle le mot a été inventé pour la première fois, l'épigénétique a été redéfinie plusieurs fois (Nicoglou et Merlin 2017). Dans leur revue, Cavalli et Heard utilisent l'épigénétique pour signifier « l'étude des molécules et des mécanismes qui peuvent perpétuer d'autres états d'activité génique dans le contexte de la même séquence d'ADN » (Cavalli et Heard 2019). Premièrement, cette définition englobe l'hérédité transgénérationnelle ainsi que l'hérédité mitotique et la persistance de l'activité des gènes ou des états de la chromatine pendant de longues périodes, même sans division cellulaire (par exemple, dans les cellules post-mitotiques à longue durée de vie comme les neurones adultes). Deuxièmement, la séquence d'ADN à considérer dépend du système biologique. Dans l'hérédité mitotique, il faut considérer la séquence génomique des cellules individuelles, tandis que dans l'hérédité transgénérationnelle, il faut considérer l'ADN de l'organisme entier (y compris son microbiote, si cela peut contribuer à l'hérédité). Enfin, cette définition étend explicitement l'utilisation de « l'épigénétique » aux processus de régulation qui impliquent des molécules connues pour participer à l'héritage épigénétique, même si elles ne traitent pas la fonction de mémoire épigénétique en soi. Les auteurs soutiennent que cette pratique courante devrait être acceptée, car elle transmet à des non-spécialistes le domaine plus large de la recherche épigénétique. Il faut noter également que des cas d'hérédité qui n'impliquent pas de composants chromosomiques ont été documentés (Sharma et Rando 2017; Wan et al. 2018) et il serait important d'étudier leur ampleur et si des phénomènes similaires se produisent chez l'homme.

En résumé, l'épigénétique peut être décrite comme les différents mécanismes qui régissent la conformation de la chromatine et l'expression des gènes, incluant la méthylation de l'ADN, les modifications des histones et l'interférence ARN. Ensemble, ces marques épigénétiques peuvent altérer la structure tridimensionnelle de l'ADN et ainsi inhiber ou favoriser la transcription des gènes (Moggs 2004). Contrairement aux mutations génétiques qui affectent irréversiblement la séquence de l'ADN, les altérations épigénétiques impliquent de nombreux mécanismes dynamiques incluant des modifications chimiques de l'ADN (méthylation), des altérations de ses partenaires protéiques au sein de la chromatine, les histones (méthylation, acétylation...), ou l'intervention de molécules d'ARN régulatrices (micro-ARNs, longs ARNs non codants). Ces modifications, à l'interface entre environnement et santé,

suscitent un intérêt croissant dans le domaine de la toxicologie environnementale. Au cours des périodes prénatale et postnatale, les processus épigénétiques affinent le développement neurologique vers un état final qui détermine comment un organisme interagit avec et répond aux expositions et aux expériences tout au long de la vie (Bale 2015). Les altérations épigénétiques pourraient donc représenter la mémoire moléculaire des expositions précoces aux PE (Vineis et al. 2017).

1.5.2 Hérité épigénétique versus plasticité

L'étude du processus biologique et des organismes modèles a permis d'apprécier le rôle de la chromatine en tant que vecteur d'informations épigénétiques pouvant propager des états d'activité actifs et silencieux pendant la division cellulaire. Ceux-ci incluent notamment, l'hérité de l'hétérochromatine dans la levure ; l'inactivation des chromosomes X (le processus par lequel l'une des copies du chromosome X femelle est réduite au silence) ou l'empreinte génomique (la répression spécifique au parent d'origine de certains gènes) chez les mammifères ; la vernalisation (induction de la floraison par exposition à un froid prolongé en hiver) chez les plantes. Ces études ont démontré que des états exprimés différemment peuvent être transmis à travers les divisions cellulaires, une fois qu'ils sont établis et en l'absence du signal d'origine. Des études de reprogrammation cellulaire dans la lignée germinale et l'embryogenèse précoce (Eckersley-Maslin et al. 2018; Kobayashi et Surani 2018), pendant la pluripotence induite (iPS) (Tischler et al. 2019), ou lors d'un transfert nucléaire somatique (Hörmanseder et al. 2017) ont montré que la chromatine et la méthylation de l'ADN agissent comme d'importantes « barrières épigénétiques » (**Figure 3**) qui empêchent les modifications de l'expression des gènes et de l'identité cellulaire.

Les systèmes épigénétiques comprennent les complexes d'hétérochromatine (HP1 et H3K9me3 (triméthylation de l'histone 3 lysine 9)), Polycomb (PRC1 et PRC2) et Trithorax (COMPASS (protéines complexes associées à SET1)). Un récapitulatif des principaux supports l'information épigénétique est disponible en **Annexe 1**. Cavalli et Heard pensent que ces complexes perpétuent les réponses fonctionnelles en modifiant les protéines d'histones dans la chromatine et en liant leurs propres marques d'histones afin de transmettre un hérité stable (Cavalli et Heard 2019). En effet, les nucléosomes sont soumis à un remodelage constant, les

histones sont échangées et toutes les marques d'ADN et d'histones découvertes jusqu'à présent sont réversibles, bien que les taux d'échange et la stabilité des marques varient dans différents domaines génomiques (Allis et Jenuwein 2016). Par conséquent, la plupart des signaux de régulation seraient rapidement perdus en l'absence de boucles serrées qui maintiennent la mémoire de l'état de la chromatine (Reinberg et Vales 2018).

De plus, l'hérédité des marques épigénétiques par division cellulaire nécessite qu'elles survivent à la réplication de l'ADN et à la mitose. Cela est particulièrement pertinent pour les modifications des histones, car les nucléosomes n'ont pas de système de duplication basé sur une matrice d'ADN. Le dépôt des histones parentales H3 et H4 se produit à quelques centaines de paires de bases de leur position de pré-réplication et, lors de la réplication, elles sont réparties à peu près également entre les molécules d'ADN fille du brin principal et du brin retardé, grâce à l'action de complexes moléculaires dédiés (Yu et al. 2018). Les facteurs de maturation de la chromatine, incluant DNMT1 - UHRF1, EZH2 et HP1, utilisent l'antigène nucléaire des cellules proliférantes (PCNA : une pince d'ADN qui est essentielle pour la réplication) ou les protéines du complexe de reconnaissance d'origine (ORC) comme composants d'attache (Liu et al. 2013; Ferry et al. 2017). L'hérédité par méiose est également possible au moins dans une certaine mesure, comme le montre la capacité du H3K27me3 déposé par la mère à contrôler l'empreinte indépendante de la méthylation de l'ADN (Inoue et al. 2017). Une possibilité supplémentaire est que seule une fraction des marques peut être transmise par voie méiotique, mais cela pourrait être suffisant pour reconstruire l'organisation de la chromatine dans la génération suivante (Miska et Ferguson-Smith 2016).

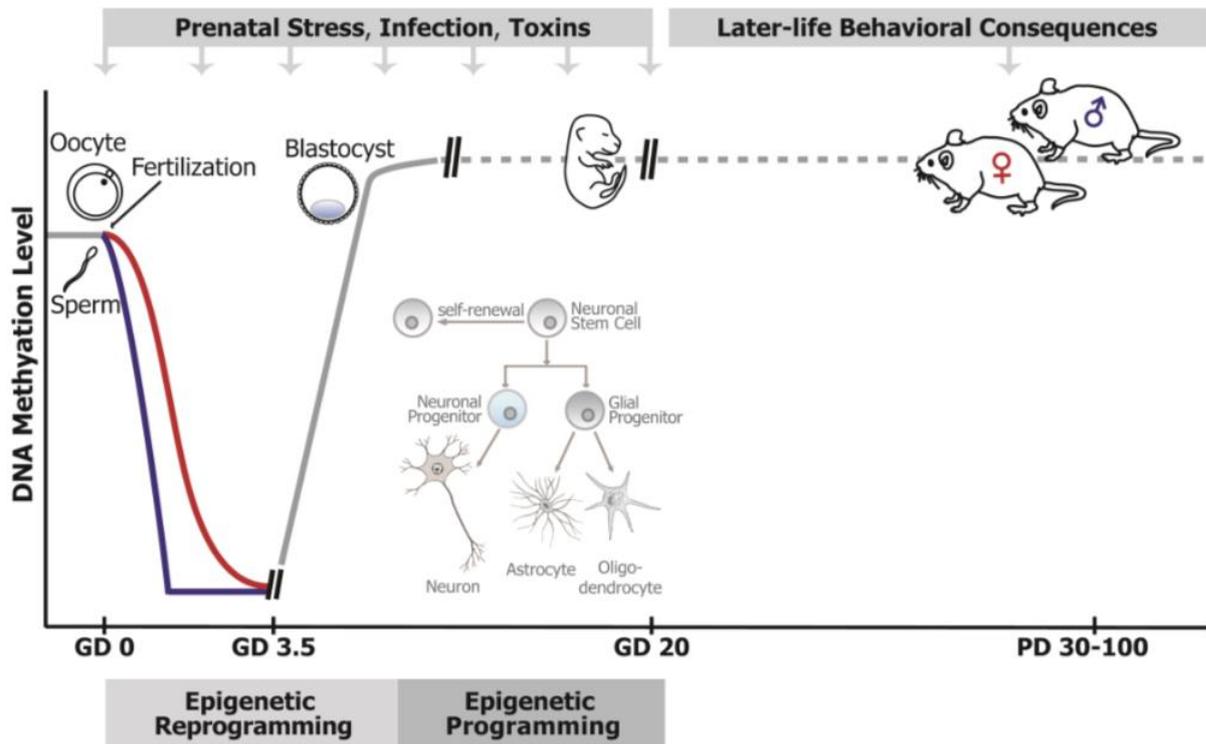


Figure 4 : Variation du niveau de méthylation de l'ADN lors de la reprogrammation et programmation épigénétique (Kundakovic et Jaric 2017). L'épigénome est particulièrement vulnérable aux perturbations causées par les agents environnementaux pendant le développement prénatal, lorsqu'une reprogrammation et une programmation des modifications épigénétiques ont lieu. La reprogrammation épigénétique post-fécondation (du stade zygote au blastocyste) comprend la disparition presque complète de la méthylation de l'ADN dans les génomes paternel et maternel (lignes bleu et rouge respectivement). La méthylation de l'ADN est ensuite rétablie (ligne grise continue), conduisant à différents motifs de méthylation d'ADN et d'expression génique dans les premières lignées cellulaires. Aux stades ultérieurs du développement, les marques épigénétiques sont moins dynamiques (ligne grise en pointillés) mais participent toujours activement à la programmation de l'expression génique, pertinente pour les stades suivants de la différenciation cellulaire.

1.5.3 L'épigénétique au cours du neurodéveloppement normal ou altéré

Au cours de l'embryogenèse précoce, plusieurs événements épigénétiques globaux majeurs se produisent dans le génome, régulant l'expression ou la répression en temps opportun des gènes associés à la pluripotence et au développement. Les marques épigénétiques parentales sont d'abord éliminées après la fécondation, puis rétablies en partie sous l'influence des facteurs environnementaux (**Figure 4**) (Reik 2007; Kundakovic et Jaric 2017). Les processus épigénétiques ont également la capacité de reprogrammer l'épigénome en réponse à des stress environnementaux (psychosocial, nutritionnel, infectieux, chimique...), rendant l'organisme plus ou moins adaptable en fonction des expositions ultérieures. Les marques épigénétiques générées dans les cellules germinales à la suite des influences de l'environnement tout au long de la vie peuvent également façonner les générations futures bien avant que la conception ne se produise (Bale 2015). Le phénomène peut être transitoire, mais il existe des modifications épigénétiques pérennes, qui persistent lorsque le signal qui les a induites disparaît (Kanherkar et al. 2014). Concrètement, ces modifications sont matérialisées par des marques biochimiques, apposées par des enzymes spécialisées sur l'ADN ou sur des protéines qui le structurent, les histones. Les marques les mieux caractérisées et les plus étudiées sont les groupements méthyle (CH₃) apposés sur l'ADN.

1.5.4 Exemple de mécanisme épigénétique : la méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN est effectuée sur des cytosines situées en amont des guanines dans le génome (sites CpG). Elle affecte la structure de la chromatine car elle induit la liaison des protéines dans le sillon majeur de l'hélice d'ADN, rendant souvent les régions hyperméthylées moins actives sur le plan transcriptionnel (Jones et Takai 2011). La méthylation des cytosines est relativement stable, ce qui signifie que la méthylation de l'ADN mise en place tôt dans la vie n'est pas susceptible de changer par la suite (**Figure 4**). Ainsi, le développement précoce est particulièrement sensible aux perturbations de méthylation induites par les substances toxiques (Reik 2007). Les enzymes réalisant la méthylation des cytosines appartiennent à la famille des DNA méthyltransférases (DNMT). La DNMT1 est

principalement impliquée dans le maintien des marques de méthylation au cours des divisions cellulaires, tandis que les DNMT3A et 3B sont impliquées dans les méthylation *de novo* (Singh et Li 2012; Li et al. 2017).

La méthylation de l'ADN est, de loin, la marque épigénétique la plus retrouvée dans les études de toxicologie environnementale. En effet, un nombre croissant d'études rapporte des changements dans la méthylation de l'ADN génomique chez de multiples espèces après exposition à des agents environnementaux tels que la pollution de l'air, des polluants chimiques dont le BPA et les phtalates, les radiations et la privation nutritionnelle. Puisque l'épigénome des mammifères est reprogrammé au cours de l'embryogenèse précoce, les expositions périnatales à des concentrations même relativement faibles pendant cette période critique peuvent avoir des effets persistants sur la santé (Faulk et al. 2016).

L'identification de signatures épigénétiques de l'exposition aux PE recouvre de multiples enjeux. Leur identification pourrait d'abord permettre d'améliorer notre compréhension des mécanismes de toxicité de ces substances. Les marques épigénétiques persistantes pourraient également représenter des biomarqueurs de durée de l'effet toxique ainsi que la mémoire moléculaire des expositions précoces aux PE (Vineis et al. 2017). Dans le cadre de ce projet, l'enjeu majeur réside cependant dans l'utilisation de ces marques comme signes précoces de toxicité silencieuse. L'identification de ces signatures épigénétiques pourrait ainsi permettre d'élargir le panel des marqueurs recherchés dans l'évaluation de la toxicité des PE.

2 Perturbateurs endocriniens

Dans cette partie, nous commencerons par une présentation historique de l'apparition des perturbateurs endocriniens et du cadre réglementaire les régissant. Nous aborderons ensuite les principaux PE connus aujourd'hui et leurs mécanismes d'action avant de souligner leurs impacts sur la santé humaine. Pour finir, nous nous intéresserons à deux PE, le BPA et les phtalates, largement répandus dans l'environnement et connus pour leurs effets sur l'augmentation de l'incidence des TND. Nous détaillerons l'impact de ces deux PE sur le neurodéveloppement.

2.1 Historique et cadre réglementaire

Les effets des polluants et des produits chimiques sur la santé humaine et animale sont depuis plusieurs années au centre des préoccupations scientifiques et politiques. Depuis le début des années 1990, la prise de conscience sur la présence de ces substances dans notre environnement a mené les autorités sanitaires à mettre en place de nombreux programmes de gestion et d'évaluation des risques, tels que la législation REACH (Registration, Evaluation, Authorization of CHemicals). Parmi ces composés chimiques, la famille des PE est au centre des débats. Le nombre d'articles à destination du grand public a conduit à une prise de conscience générale sur l'impact néfaste de ces substances sur l'Homme. La **Figure 5** présente l'intérêt historique de la perturbation endocrinienne.

D'origine naturelle ou synthétique, les PE peuvent altérer le fonctionnement du système hormonal animal. Certaines de ces substances pourraient induire des effets néfastes sur la santé d'un individu, de sa descendance ou d'une population et ainsi constituer un véritable danger sanitaire. L'intérêt pour ce sujet croît régulièrement et en parallèle, des plateformes de décision réunissant des représentants de la science, de l'industrie et des autorités ont été créées comme par exemple le programme de détection des PE lancé en 1996 par l'US EPA (Environmental Protection Agency) (Usepa 1998), le plan national santé-environnement (PNSE) débuté en 2004 ou encore le pôle national applicatif en toxicologie et écotoxicologie lancé en 2009 en France (Darde 2017).

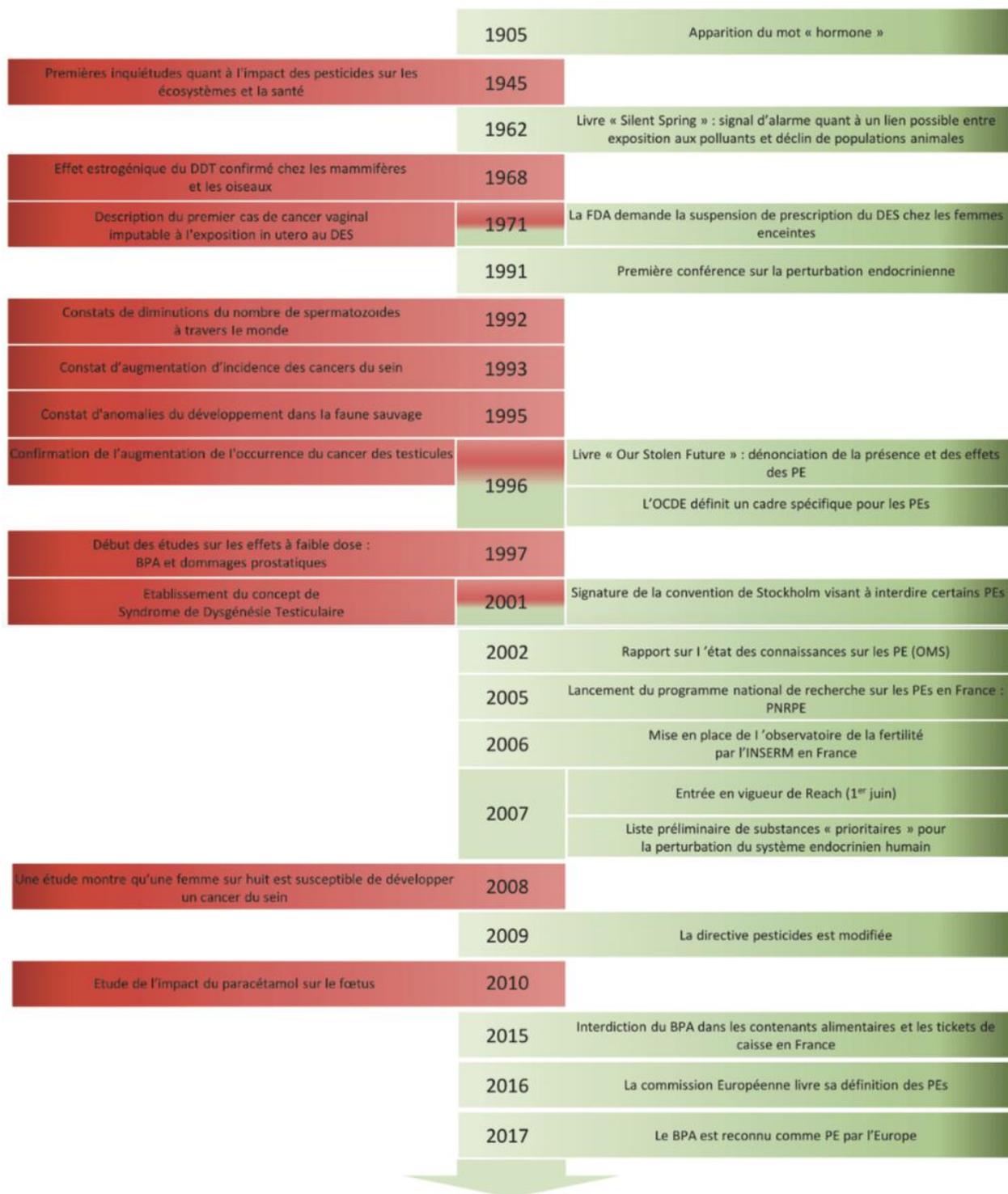


Figure 5 : Historique de la perturbation endocrinienne. En rouge sont présentés les faits graves et en vert les actions mises en place par les organismes réglementaires.

Elles prévoient des mesures à court, moyen et long terme, parmi lesquelles l'identification des PE, la priorisation de l'évaluation des risques, l'élaboration de programmes de monitoring, la recherche sur les mécanismes d'action de ces substances et enfin l'adaptation de la législation.

Depuis 2007, l'Union Européenne a coordonné une campagne de recensement de ces substances afin de les classer en fonction de leur dangerosité, via la mise en place du programme REACH. Cette directive vise à approfondir les connaissances scientifiques concernant les effets des substances chimiques sur la santé humaine et sur l'environnement, afin d'optimiser la gestion des risques liés à l'utilisation de ces produits. À terme, ce programme vise à l'interdiction et à la substitution dans l'Union Européenne des substances chimiques les plus dangereuses, en particulier les substances CMR (cancérogènes, mutagènes, reprotoxiques), en prévoyant notamment des obligations à l'encontre des producteurs et importateurs de produits chimiques. Il revient donc aux industriels de démontrer l'innocuité des substances utilisées (Penman et al. 2015). Face à cette tâche, REACH incite notamment les scientifiques à développer et à mettre en place de nouvelles approches, dites *in silico*, complémentaires aux approches de toxicologie classiquement utilisées (*in vivo*, *ex vivo*, *in vitro*), afin d'améliorer et d'accélérer le criblage des substances potentiellement dangereuses.

De nos jours, la production mondiale de substances chimiques, dont certaines d'entre elles s'avèrent nocives pour l'environnement et la santé humaine, est 400 fois plus importante qu'il y a un siècle. Selon l'Inventaire Européen des Substances Chimiques Commerciales Existantes (EINECS), le nombre de produits chimiques manufacturés dans le monde est estimé à plus de 100 000, dont seulement 3% ont fait l'objet d'analyses approfondies pour en évaluer leur toxicité et établir des liens avec des pathologies et des phénotypes délétères chez l'Homme. Ce chiffre ne semble cependant représenter qu'une infime partie du nombre total de substances chimiques présentes dans le monde, revendiquées à plus de 140 millions par le site du CAS (Chemical Abstract Service) de l'American Chemical Society.

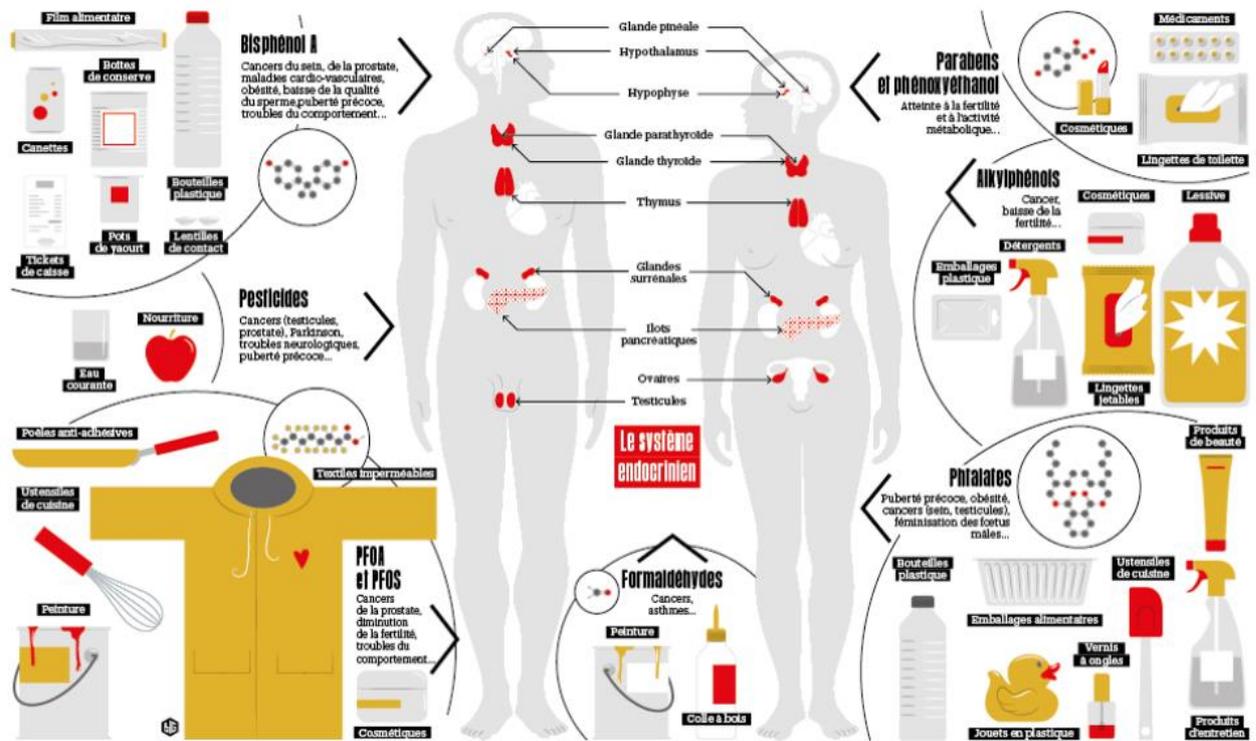


Figure 6 : Les perturbateurs endocriniens (5).

Ces composés sont omniprésents, rendant notre exposition quasi-constante aux pesticides (McKinlay et al. 2008), plastifiants (Romani et al. 2013), cigarettes, cosmétiques, détergents, médicaments, et bien d'autres (**Figure 6**).

Il est aujourd'hui très difficile de mesurer l'exposition d'un individu à un composé précis tant les sources d'exposition et les mélanges de substances chimiques (« effets cocktails ») sont multiples. Ce problème d'évaluation est préoccupant, et des questions se posent concernant l'exposition fœtale chez la femme enceinte et les conséquences pour l'enfant à naître. En effet, ces périodes de développement fœto-embryonnaire et de la petite enfance correspondent à des « fenêtres d'exposition » au cours desquelles la sensibilité aux PE est plus importante. C'est également le cas de la puberté où un dérèglement hormonal peut altérer de manière irréversible certaines fonctions de l'organisme.

2.2 Présentation des perturbateurs endocriniens connus

Les PE sont très hétérogènes et peuvent être classés de deux façons selon leurs catégories ou leurs origines.

Dans le classement en catégorie, deux groupes se distinguent (Diamanti-Kandarakis et al. 2009) : ceux qui se produisent naturellement comme les produits chimiques naturels présents dans les aliments pour humains et animaux (les phytoestrogènes par exemple) et ceux qui sont synthétisés. Ces derniers peuvent être regroupés en plusieurs catégories, à savoir les produits chimiques synthétiques utilisés comme solvants industriels ou lubrifiants et leurs sous-produits (par exemple les biphényles polychlorés (PCB), biphényles polybromés (PBB), dioxines), les pesticides (par exemple, le dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT)), les plastifiants (par exemple le BPA), et pour finir certaines substances médicamenteuses.

Les PE peuvent aussi être regroupées selon leurs origines (Caliman et Gavrilescu 2009) : les hormones naturelles et artificielles (par exemple, les œstrogènes, les acides gras oméga-3, les pilules contraceptives et les médicaments pour la thyroïde), les médicaments ayant des effets secondaires hormonaux, les produits chimiques industriels et ménagers (par exemple, les phtalates, les détergents, les ignifugeants, les plastifiants, les solvants...) ou encore les produits

secondaires des procédés industriels et domestiques (par exemple, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), les dioxines...).

A partir d'observations différentes, les PE de synthèse peuvent être classés en trois groupes distincts : les polluants organiques persistants, les pesticides et les plastifiants.

2.2.1 Les substances naturelles

Certains PE sont d'origine naturelle, produits, par exemple, par les végétaux et retrouvés dans les aliments. C'est le cas des phytoestrogènes, molécules présentes dans certains végétaux comme le germe de blé ou le soja, du coumestrol retrouvé dans les haricots ou encore des mycotoxines présentes dans certaines espèces de champignons.

Le plomb est un composé naturel et est régulièrement utilisé dans les mines, les fonderies, le raffinage, l'essence au plomb, les batteries au plomb, les peintures, les bijoux et les produits pour enfants. Les enfants sont des candidats potentiels à un empoisonnement au plomb, car la quantité ingérée par unité de poids corporel est évidemment plus élevée, ils peuvent en ingérer une grande quantité et ont un cerveau en cours de développement. Cela devrait être sérieusement considéré car les effets neurologiques sont toujours plus élevés chez les enfants comparés aux adultes (Gore et al. 2014).

2.2.2 Les polluants organiques persistants

Les polluants organiques persistants (POP) sont des composés organiques qui sont capables de résister à la dégradation biologique, chimique et photolytique dans l'environnement. Les POP sont persistants dans l'environnement et se bioaccumulent dans les tissus vivants, notamment dans les tissus adipeux de par leurs propriétés de molécules halogénées (Lee et al. 2017). Ces polluants sont mobiles et bioamplifiables, c'est-à-dire que leur concentration, et donc leur toxicité potentielle, augmente dans les maillons de la chaîne alimentaire. Les POP peuvent avoir des effets nocifs sur la santé et sont, pour cela, limités par un traité international, la convention de Stockholm, entrée en vigueur en 2004 et ratifiée par

150 pays, ayant pour objectif de protéger la santé de la population et l'environnement des POP en interdisant certains produits polluants.

Les biphényles polychlorés (PCB), utilisés depuis les années 1930 comme isolants thermiques pour les appareils électroniques, sont classés comme PE avérés et « cancérigènes certains ». Malgré leur interdiction depuis 1979, les PCB persistent dans l'environnement et se bioaccumulent. Des effets sur la reproduction et la croissance ont notamment été observés chez l'Homme (Vabre et al. 2017).

2.2.3 Les pesticides

Les pesticides ont été mis sur le marché à un rythme soutenu et ce, depuis plusieurs décennies, générant de nombreux problèmes sanitaires. Ces substances sont généralement conçues de telle manière qu'elles peuvent être très sensibles aux systèmes reproducteurs et neuronaux des organismes. Mais la similitude de ces processus avec le système physiologique humain indique que ces produits chimiques peuvent également affecter le corps humain. Le caractère néfaste des pesticides est très étudié dans la littérature, cependant il est difficile de les supprimer du marché car ils sont sujets à un important lobbying industriel (Fevrey et al. 2015).

Les pesticides utilisés couramment incluent le dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT) et les chlorpyrifos. Le DDT était autrefois utilisé au hasard comme pesticide dans les secteurs agricoles, dans la production de cultures et de bétail, dans les ménages, les jardins, les lieux publics et les institutions, mais, en raison de sa nature dangereuse, il a été interdit il y a quelques années. Cependant, ce composé est toujours utilisé dans certains pays. Le DDT peut interférer avec les systèmes thyroïdien, œstrogénique, androgénique, rénine-angiotensine, insulinique et neuroendocrine qui peuvent influencer directement les systèmes reproducteurs, cardiovasculaires et métaboliques du corps humain. Ces raisons en ont fait l'un des candidats les plus potentiels aux PE d'autant plus qu'il s'agit d'un POP (Gore et al. 2014).

Les pesticides organophosphorés sont les insecticides les plus couramment utilisés et le chlorpyrifos est un exemple unique de cette classe d'insecticides. L'insecticide est utilisé à la fois dans les secteurs domestiques et agricoles pour lutter contre les ravageurs tels que les blattes, les mouches, les termites, les fourmis de feu et les moustiques. Cependant, des études

ont confirmé que le composé est hautement toxique de par son effet sur le système nerveux (Gore et al. 2014).

Le glyphosate, quant à lui, est l'herbicide le plus utilisé (utilisation multipliée par 100 de 1974 à 2014) et le plus controversé au monde. Bien que dégradable dans l'environnement, son utilisation massive en fait un polluant systématiquement retrouvé dans les écosystèmes. Le principal débat autour du glyphosate vient de ses effets sur la santé humaine et sur sa possibilité d'être un perturbateur endocrinien (Vandenberg et al. 2017). Des études ont montré que le glyphosate pouvait avoir des effets sur les organes reproducteurs de par son effet anti-androgénique (Mesnage et al. 2015). En 2015, le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) classait le glyphosate comme cancérogène probable, alors que quelques mois plus tard, l'EFSA (European Food Safety Authority) estimait qu'il était improbable que ce pesticide soit cancérigène pour l'Homme mais que les signes d'activité endocrinienne ne pouvaient pas être complètement exclus (Vandenberg et al. 2017). En 2017, l'Agence Européenne des Produits Chimiques (ECHA) a réapprouvé l'utilisation du glyphosate pour 5 ans. Suite aux controverses sur le classement cancérogène du glyphosate, l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) a sélectionné des équipes scientifiques pour réaliser des études toxicologiques complémentaires dont les résultats serviront à la réévaluation du glyphosate par l'Union Européenne fin 2022 (6).

2.2.4 Les plastifiants

Plusieurs millions de tonnes de plastifiants sont utilisées chaque année pour améliorer la solidité, l'aspect et la souplesse des plastiques. Le BPA et les phtalates sont les plus connus et sont au centre de nombreuses interrogations scientifiques et médiatiques. Ces deux substances sont celles étudiées dans cette thèse et sont détaillées ultérieurement en sections 2.5.1 et 2.5.2.

2.2.5 Les médicaments

Un nombre croissant d'études met en garde contre la consommation de certaines substances médicamenteuses, comme évidemment les pilules contraceptives mais aussi l'aspirine ou encore le paracétamol.

La pilule contraceptive permet de contrôler le cycle ovarien chez la femme et est basée essentiellement sur l'utilisation d'œstrogènes ou de prostagènes. Ces molécules bloquent l'ovulation et provoquent un épaissement de la paroi utérine, empêchant ainsi toute nidation d'œuf fécondé. Connaissant le mode d'action des molécules utilisées dans ces contraceptifs et leur mécanisme d'action, il s'agit bien de perturbation endocrinienne. En effet, les œstrogènes viennent bloquer l'ovulation grâce à un rétrocontrôle sur l'axe hypothalamo-hypophysaire empêchant la production de GnRH, de LH et de FSH, hormones impliquées dans le cycle ovarien de la femme.

Le paracétamol et les AINS (anti-inflammatoires non stéroïdiens) comme l'aspirine, figurent parmi les médicaments les plus utilisés, leur consommation mondiale ne cesse d'augmenter. Leur effet de PE chez l'Homme a été mis en avant par l'équipe d'Albert en 2013. Ils ont observé une modification de la production de testostérones par les cellules de Leyding après exposition de testicules à ces deux molécules (Albert et al. 2013). De plus, ces médicaments sont à l'origine du développement de cryptorchidie (absence d'un ou des deux testicules dans le scrotum) chez le nouveau-né après exposition de la femme enceinte (Mazaud-Guittot et al. 2013). Pour cette raison, ils sont déconseillés durant le dernier trimestre de la grossesse.

2.3 Mécanismes d'action des perturbateurs endocriniens

L'Environmental Protection Agency (EPA) a défini un composé perturbant le système endocrinien comme « un agent qui interfère avec la synthèse, la sécrétion, le transport, la liaison ou l'élimination des hormones naturelles dans le corps qui sont responsables du maintien de l'homéostasie, la reproduction, le développement et le comportement » (Kavlock et al. 1996).

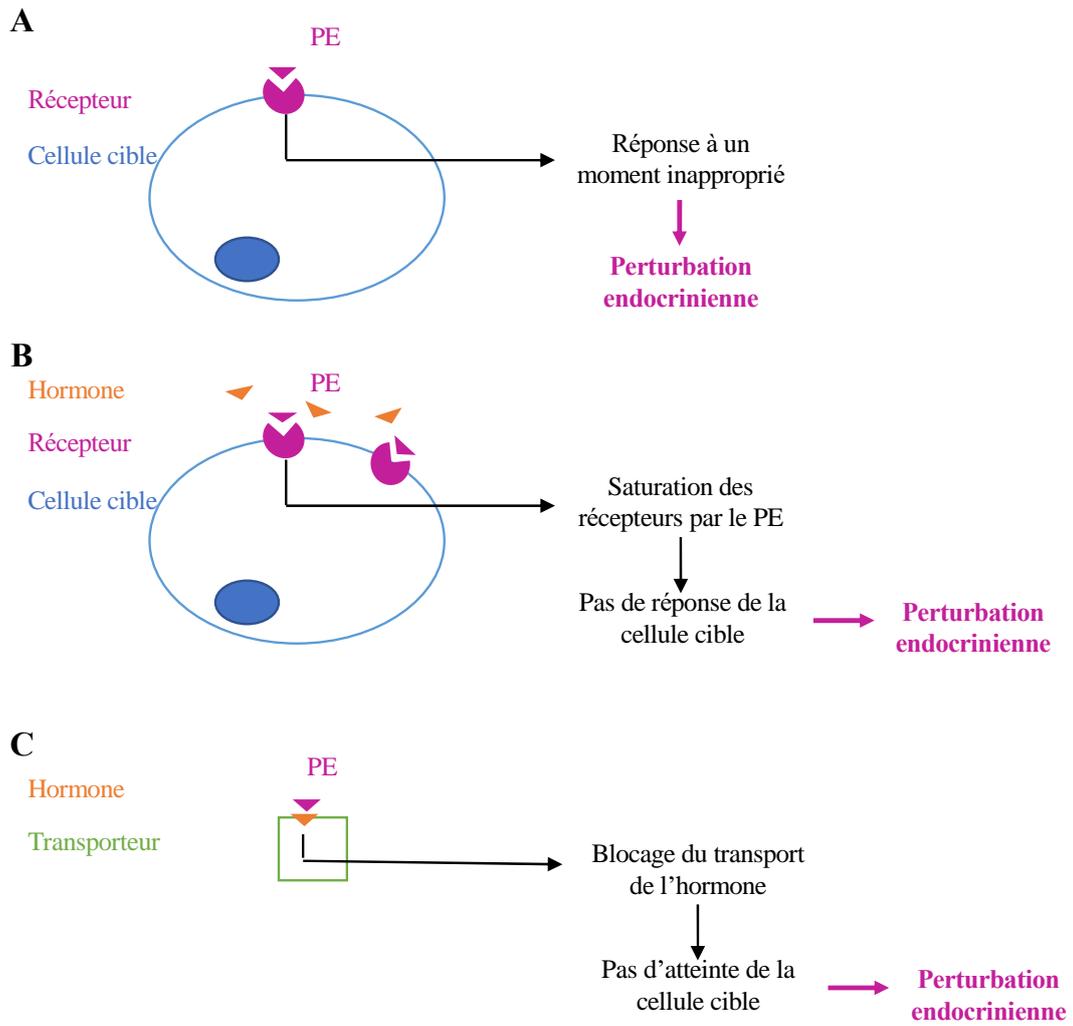


Figure 7 : Mécanismes d'action des PE. (A) Action hormono-mimétique du PE. (B) Action antagoniste du PE. (C) Effet direct sur l'hormone via blocage de son transporteur par le PE.

Plus simplement, cela signifie que les PE sont des produits chimiques ou des mélanges chimiques qui interfèrent avec la fonction hormonale normale et peuvent ainsi entraîner des effets néfastes sur la santé et l'environnement.

La santé dépend du bon fonctionnement du système endocrinien. Celui-ci est composé de plusieurs organes appelées glandes (composées de cellules endocrines), qui produisent des hormones et les libèrent ensuite dans le sang. Distribuées dans tout l'organisme, les hormones jouent un rôle de « messenger chimique ». Elles ont des fonctions essentielles et variées : stimuler la croissance et le développement, réguler les pulsions et les humeurs, contrôler les grandes constantes physiologiques. Cela signifie que la moindre altération du système endocrinien peut perturber notre équilibre, à l'image du diabète par exemple.

Les hormones sont, en général, produites à distance et libérées dans la circulation sanguine. Elles se déplacent librement ou à l'aide d'un transporteur jusqu'à leurs cellules cibles et se fixent sur un récepteur extra ou intracellulaire de ces dernières. Du fait de la complexité des voies de signalisation hormonale, la perturbation par les PE à différents niveaux et endroits de l'organisme est possible et difficilement identifiable. Aujourd'hui, la majorité des connaissances sur le mécanisme d'action des PE concerne leur capacité à interférer au niveau des récepteurs nucléaires hormonaux et de leurs transporteurs.

2.3.1 Effets hormono-mimétiques

Une substance hormono-mimétique est capable de mimer l'action d'une hormone endogène grâce à une forte similarité de structure moléculaire avec l'hormone. La substance peut ainsi se lier au récepteur cible et induire les mêmes effets appelés effets agonistes (**Figure 7A**).

Les PE à activité œstrogénique comme le DES et le Chlordécone sont les PE ayant un effet hormono-mimétique les plus connus (Waring et Harris 2005).

2.3.2 Effets antagonistes

Comme pour les substances à effet hormono-mimétique, les substances ayant un effet antagoniste présentent une structure moléculaire similaire à l'hormone et se lient à son récepteur cible, mais sans l'activer. La substance peut saturer les récepteurs de la cellule cible, bloquant ainsi le récepteur et les fonctions cellulaires associées comme la fixation du complexe hormone/récepteur sur l'ADN (**Figure 7B**). Par exemple, le vinclozoline ou le flutamide sont qualifiés de PE anti-androgéniques car ils présentent des effets antagonistes sur le récepteur des androgènes (van Ravenzwaay et al. 2013).

2.3.3 Effets directs sur les hormones

Certaines substances n'altèrent pas le récepteur de l'hormone, mais agissent sur l'hormone elle-même. Elles peuvent déréguler la synthèse de l'hormone, comme le kétoconazole qui inhibe les cytochromes P450 et par conséquent la synthèse de testostérone (Bird et Abbott 2016). D'autres substances comme les phtalates bloquent le transport de l'hormone (**Figure 7C**), en particulier les hormones lipophiles dépendantes de transporteurs pour atteindre leurs cellules cibles, comme la Sex Hormone-Binding Globulin (SHBG) (Sheikh et al. 2016).

2.4 Impacts possibles des PE sur la santé humaine

La perturbation du système endocrinien est un domaine de recherche nommé, très actif depuis plus de 10 ans, bien que les effets des PE sur la faune sauvage aient été étudiés principalement dans les années 1940. De nos jours, des composés potentiellement PE sont détectables un peu partout dans l'environnement. En effet, comme nous venons de le voir, les PE sont présents dans les produits que nous utilisons au quotidien, à commencer par les produits pour enfants, les produits électroniques, les produits de soins personnels, les textiles et les vêtements. Cependant, dans la plupart des cas, nous ne sommes pas au courant de leur présence, car ils ne figurent pas toujours dans leur liste de composés chimiques. Il s'agit d'un sujet

préoccupant car la probabilité que ces produits chimiques soient libérés dans l'environnement et entrent en contact avec nous est forte. Le risque est d'autant plus important chez les enfants qui peuvent ramasser ces produits contenant des PE et les mettre dans leur bouche. En dehors de cela, les PE sont fréquemment présents dans les produits de soins personnels comme le dentifrice, les produits que nous appliquons sur notre peau, les savons, dans lesquels des agents antimicrobiens sont utilisés.

De nombreuses études ont démontré que des expositions régulières, voire continues, à certains de ces composés sont responsables d'un nombre important de pathologies développées chez la personne exposée, mais également potentiellement chez sa descendance (Nassouri AS, Archambeaud F, Desailoud R. 2012). De nombreuses substances chimiques ont été identifiées comme PE et les humains peuvent y être exposés en raison de leur occupation ou de l'exposition alimentaire et environnementale (eau, sol et air). Les substances chimiques perturbatrices du système endocrinien sont des composés qui altèrent le fonctionnement normal du système endocrinien des humains et de la faune. Un nombre important d'associations entre des expositions environnementales et des effets néfastes, notamment des troubles du système nerveux ou du développement embryonnaire, ont été mis en évidence dans la littérature.

Afin de comprendre la vulnérabilité et les facteurs de risque des personnes souffrant de perturbations endocriniennes ainsi que les traitements nécessaires, des méthodes doivent être mises au point pour prédire les effets sur les populations. Depuis plusieurs années, le mécanisme et l'effet des PE, leur relation avec l'environnement ainsi que les effets sur la santé humaine suscitent un intérêt croissant. En 2013, l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) a fait l'état des connaissances sur les PE ainsi que leurs effets chez l'Homme (Bergman et al. 2015).

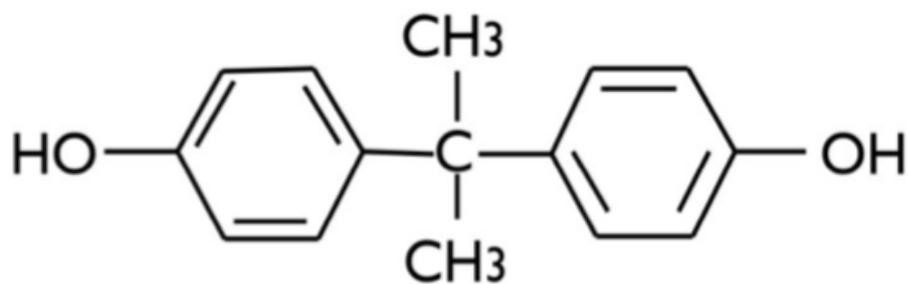


Figure 8 : Structure chimique du bisphénol A.

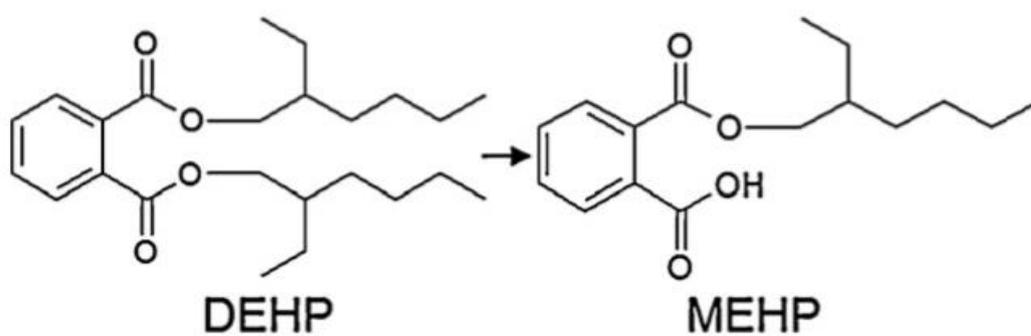


Figure 9 : Métabolisme simplifié du DEHP (di-(2-éthylhexyl)phtalate) en MEHP (mono-(2-éthylhexyl)phtalate) (Monfort et al. 2012).

2.5 Impacts des PE et TND

De plus en plus d'inquiétudes sont émises par les agences gouvernementales comme l'OMS et le Programme National de Toxicologie aux États-Unis concernant l'effet des perturbateurs endocriniens sur le cerveau et le comportement (Bergman et al. 2013). Une étude sur les capacités cognitives des enfants exposés (ou dont les parents ont été exposés) à des PE a mis en évidence une augmentation des troubles psychiatriques et neurologiques chez ces derniers (Boyle et al. 2011). Ils comprennent, entre autres, des troubles du spectre autistique, des troubles du déficit de l'attention, des troubles du comportement, des troubles de l'humeur, des troubles d'apprentissage ou encore des syndromes dépressifs.

Parmi les PE incriminés dans l'augmentation de l'incidence des TND, le BPA et les phtalates, entrant dans la composition des plastiques alimentaires, sont très répandus (Braun 2017). Dans ce projet, il a été choisi d'étudier l'impact de ces deux PE en prenant notamment appui sur plusieurs études qui ont permis d'établir leur neurotoxicité développementale, et d'initier l'étude des mécanismes en jeu.

2.5.1 Le bisphénol A

Le BPA, 4,4'-isopropylidènediphénol, est un composé organique de la famille des aromatiques issu de la réaction entre deux équivalents de phénol et un équivalent d'acétone (**Figure 8**). Le BPA est omniprésent dans l'environnement urbain. En effet, il s'agit d'une substance chimique de synthèse utilisée depuis plus de 50 ans dans un grand nombre d'applications industrielles. Ses deux principales utilisations ont longtemps été la fabrication industrielle de plastiques (de type polycarbonate) et de résines époxydes. Il est aussi utilisé comme composant d'autres polymères et résines (polyester, polysulfone, résines vinylesters...). Il intervient dans la synthèse de certains retardateurs de flamme et comme révélateur dans les papiers thermiques (tickets de caisse notamment) (INERIS 2010) (Flint et al. 2012).

La forme biologiquement active du BPA est la forme libre. Chez l'Homme, par voie orale, le BPA est facilement absorbé et rapidement transformé dans l'intestin et le foie en monoglucuronide de BPA, substance dépourvue d'activité endocrine. La métabolisation du BPA par une enzyme hépatique (l'uridine diphosphoglucuronyltransférase ou UGT) semble

être une voie métabolique importante *in vivo* chez le rat, impliquant plus précisément l'isoforme UGT2B1 (Yokota et al. 1999). Le BPA est principalement éliminé *via* les fèces, mais cette élimination est plus lente chez les rongeurs que chez l'Homme (OMS 2009). En ce qui concerne le rat, cette enzyme UGT2B1 est peu active chez les nouveaux-nés et atteint le niveau d'activité adulte seulement trois semaines après la naissance, ce qui fait des nouveaux-nés une sous-population potentiellement sensible (INERIS 2010).

L'écotoxicité du BPA fait encore débat, mais en juin 2017, après que le Canada l'ait classé comme reprotoxique, le comité des États-membres de l'ECHA a classé à l'unanimité le BPA parmi les « substances extrêmement préoccupantes » du règlement REACH, en tant que PE (7). Autrefois très présent dans le plastique des biberons, il est interdit pour des raisons de sécurité sanitaire au Canada le 17 octobre 2008, puis le 23 juin 2010 en France. Le Sénat français vote son interdiction à partir du 1^{er} juillet 2015 dans tous les contenants alimentaires. Le Sénat vote également l'interdiction non seulement du BPA mais plus généralement de tous les PE et substances cancérigènes pour les dispositifs médicaux destinés aux bébés et femmes enceintes (8). Il est souvent remplacé par le bisphénol B ou le bisphénol S, qui semblent néanmoins représenter des PE tous deux aussi actifs que le BPA (Rochester et Bolden 2015).

2.5.1.1 *Cibles du BPA*

Le BPA est un agoniste faible des œstrogènes (Rubin 2011; World Health Organization 2012) pouvant se lier aux récepteurs nucléaires des œstrogènes α et β (ER α et β) et activer une réponse qui a été largement considérée comme la source de ses effets indésirables dans certaines études animales. Certaines études *in vitro* ont également montré que le BPA avait des effets anti-androgéniques et pouvait se lier au récepteur des androgènes (AR) (Sun et al. 2006).

2.5.1.2 *Impact sur le neurodéveloppement*

Chez l'Homme, des effets sont suspectés sur la neurogenèse, le dimorphisme sexuel comportemental, l'anxiété, le comportement exploratoire (Braun et al. 2011; Miodovnik et al. 2011). Dans l'ensemble, les données disponibles suggèrent que l'exposition au BPA prénatale et postnatale est associée à des problèmes de comportement déclarés par les parents chez les enfants (Braun 2017). Il est également possible que le BPA puisse reprogrammer la régulation des gènes dans le SNC en développement en modifiant l'épigénome.

Plusieurs études chez l'animal ont démontré un effet délétère du BPA sur le développement neurologique en cas d'exposition *in utero* ou périnatale. Plus précisément, Kundakovic et collaborateurs ont montré qu'une exposition *in utero* au BPA induisait des effets durables et spécifiques du sexe sur l'expression du gène *Bdnf* chez des souris juvéniles et jeunes adultes. Ils ont observé, aux deux âges, une régulation négative de l'expression de *Bdnf* dans l'hippocampe des mâles, associée à une hyperméthylation des sites CpG dans la région régulatrice du gène, en lien avec les déficits comportementaux observés chez les jeunes mâles adultes (Kundakovic et al. 2015). Comme l'expression de ce gène et sa méthylation sont altérées dans plusieurs troubles psychiatriques associés à une adversité précoce, notamment la dépression, la schizophrénie, le trouble bipolaire et l'autisme, la méthylation du gène *Bdnf* peut représenter un biomarqueur pour la détection précoce de psychopathologies. La même équipe a également montré qu'une exposition *in utero* au BPA chez la souris induisait des changements dans l'expression et la méthylation de gènes codant les récepteurs des œstrogènes ($ER\alpha$ et $ER\beta$) et, simultanément, une modification des niveaux d'ARNm des régulateurs épigénétiques DNMT1 et DNMT3A dans le cortex et l'hypothalamus (Kundakovic et al. 2013).

D'après Yeo et collaborateurs, le BPA diminue également l'expression du gène *Kcc2* par des mécanismes épigénétiques incluant l'augmentation de la méthylation de l'ADN et la diminution de l'acétylation des histones, conduisant à une altération du *chloride shift* (Yeo et al. 2013). Ici encore, les auteurs ont décrit un dimorphisme sexuel avec cette fois un effet plus accentué chez les femelles que chez les mâles après exposition au BPA *in utero* chez le rat et la souris. Certaines de ces observations ont été reproduites sur des modèles *in vitro* de cultures primaires neuronales et organotypiques de tranches cérébrales.

2.5.2 Les phtalates

Les phtalates sont synthétisés depuis les années 1930 pour leurs propriétés plastifiantes. La production mondiale de phtalates n'a cessé d'augmenter pour atteindre 4,3 millions de tonnes en 2006 (Peijnenburg et Struijs 2006). En Europe, la production est constante depuis 20 ans, à un million de tonnes par an.

La caractéristique principale des phtalates est de rendre souples les matériaux rigides tels que le polychlorure de vinyle (PVC). Ainsi, ils sont surtout utilisés comme plastifiants dans l'industrie des polymères, à 97% dans le cas du DEHP, di-(2-éthylhexyl)phtalate, principal phtalate retrouvé dans l'environnement (Commission OSPAR 2006). Ils sont donc retrouvés dans de nombreux produits comme les dispositifs médicaux (poches de sang, matériel de dialyse, gants), les emballages alimentaires, les matériaux de construction (revêtements, câbles, toitures, joints d'étanchéité) et les jouets en plastique (Schettler 2006). Les phtalates sont employés dans plusieurs autres produits de consommation domestique : les adhésifs et solvants, les laques et peintures, les encres, les vernis à ongles, les produits de soin personnel et les produits cosmétiques (Schettler 2006). Dans les dernières applications citées, leurs capacités à augmenter la pénétration cutanée d'un produit sont mises à profit. Ces usages sont minoritaires. Les phtalates trouvent donc des applications dans plusieurs secteurs : bâtiment, automobile, médical, alimentaire et textile, qui constituent autant de sources potentielles d'exposition. Mais les travailleurs ne sont pas les seuls à pouvoir être exposés aux phtalates, les consommateurs n'y échappent pas, parmi lesquels certains sont plus vulnérables comme les nouveaux-nés, les enfants et les femmes enceintes.

Le phtalate le plus abondant dans les aliments et l'environnement est le DEHP et son principal métabolite est le mono-(2-éthylhexyl)phtalate (MEHP) (World Health Organization 2012; Braun et al. 2013) (**Figure 9**). Le DEHP est rapidement absorbé chez l'homme et l'animal par voie orale après hydrolyse en MEHP. L'absorption par voie cutanée semble faible chez l'homme alors qu'elle a été mise en évidence par inhalation. Le MEHP est largement distribué dans les tissus sans qu'une accumulation soit observée, puis il subit une série d'oxydations dans le foie, très poussées chez le rat et plus réduites chez les primates et l'Homme. Chez ce dernier, les métabolites sont ensuite largement conjugués à l'acide glucuronique. L'excrétion intervient rapidement par voies urinaire et fécale avec une grande variabilité inter-espèce et interindividuelle chez l'Homme (Braun et al. 2013).

2.5.2.1 *Cibles des phtalates*

Les cibles principales des phtalates parmi les récepteurs nucléaires sont les récepteurs PPAR α et γ (Desvergne et al. 2009). Le MEHP est un agoniste partiel de PPAR γ et son activité est plus faible sur le PPAR γ de souris que sur le PPAR γ humain (Feige et al. 2007). Certains phtalates sont anti-androgéniques et réduisent la production de testostérone testiculaire en diminuant l'expression des gènes impliqués dans la stéroïdogénèse (Hannas et al. 2011) comme le gène de l'aromatase *Cyp19A1* (Lehraiki et al. 2009). Parmi les récepteurs nucléaires, les récepteurs des œstrogènes (ER) et des androgènes (AR) sont également des cibles des phtalates.

2.5.2.2 *Impact sur le neurodéveloppement*

Des études de cohorte prospectives ont montré que l'exposition prénatale à plusieurs phtalates différents était associée aux comportements de TDAH (Engel et al. 2010; Kobrosly et al. 2014), aux comportements autistes (Miodovnik et al. 2011), à des troubles mentaux et psychomoteurs, émotionnels (Whyatt et al. 2011) et à des déficits intellectuels (Factor-Litvak et al. 2014). L'exposition des enfants à certains phtalates a également été associée à une diminution des capacités cognitives (Huang et al. 2015) et à des problèmes de comportement (Kim, B. N. et al 2009). D'autres études n'ont trouvé aucune association entre l'exposition prénatale aux phtalates et le comportement neurologique de l'enfant (Gascon et al. 2015). Les résultats apparemment contradictoires entre les études peuvent être dus à des différences de moment d'évaluation de l'exposition aux phtalates (par exemple, gestation précoce ou tardive), à une mauvaise classification de l'exposition aux phtalates, à des études utilisant un seul échantillon d'urine pour évaluer l'exposition ou encore à des différences d'âge au cours de l'évaluation du développement neurologique.

Afin de préciser les mécanismes de toxicité en jeu, Smith et Holahan se sont intéressés au lien entre l'exposition précoce au DEHP et les changements neurodéveloppementaux chez les rongeurs (Smith et Holahan 2014). Ils ont mis en évidence une diminution de l'expression de *Bdnf*, spécifique du sexe, dans l'hippocampe des rats mâles. D'autres auteurs ont étudié les effets de l'exposition gestationnelle du DEHP sur les profils d'expression génique dans le cerveau de rat néonatal et les fonctions cognitives à l'âge adulte (Lin et al. 2015). Certains gènes critiques pour la prolifération des neurones, tels que *Ccnd1* et *Cdc2*, sont significativement

régulés à la baisse. Ce mécanisme pourrait donc être impliqué dans les déficits d'apprentissage et de mémoire spatiale observés à l'âge adulte après exposition fœtale au DEHP. Dans deux contextes, les phtalates ont induit une surexpression de marqueurs pro-inflammatoires dans le SNC, associée dans l'un des cas à des signes de TND (comportement anxieux, mémoire altérée) (Win-Shwe et al. 2013; Barakat et al. 2018). Peu de données sont disponibles sur les impacts épigénétiques des phtalates. Hors du SNC, il a été montré que l'exposition au DEHP pendant la différenciation sexuelle des rats induisait des malformations de l'appareil reproducteur et une expression anormale du facteur de croissance analogue à l'insuline (IGF-1), du ligand c-kit (KITL) et du facteur inhibiteur de la leucémie (LIF), pouvant contribuer à la reprotoxicité des phtalates et impliquant des modifications de méthylation de l'ADN (Perera et Herbstman 2011).

2.5.3 Les méthodes d'évaluation du risque neurodéveloppemental des PE

Les données de neurotoxicité développementale des PE reposent essentiellement sur des études épidémiologiques et des études *in vivo*, qui sont actuellement les seules études recommandées dans les lignes directrices d'évaluation de cette toxicité (Smirnova 2014). Ces substances sont très variées et nous sommes en réalité exposés à un mélange de substances présentes dans l'environnement : on parle ainsi d'effet « cocktail » qui rend leur étude particulièrement complexe. De plus, les effets des PE sont souvent modérés et retardés, compliquant les études *in vivo* nécessaires à l'établissement de preuves directes de leur toxicité (Smirnova 2014). En outre, pour des raisons pratiques (durée, coût) et éthiques, ces études ne permettent pas de cribler de nombreux PE ni d'analyser d'éventuels effets « cocktail ». Ces difficultés ont abouti à un manque de preuves de la toxicité neurodéveloppementale des PE et à un manque de données sur leurs mécanismes de toxicité.

Les cultures cellulaires *in vitro* sont adaptées à l'étude de grandes quantités de cellules homogènes dans un environnement isolé. Dans le contexte d'études neurodéveloppementales, plusieurs lignées cellulaires sont utilisées, ainsi que des cultures primaires des différents types cellulaires du cerveau provenant le plus souvent de cerveaux de rongeurs. En particulier, au vu du nombre croissant d'expériences de recherche sur les animaux, les cultures cellulaires permettent de réduire sensiblement le nombre d'animaux expérimentaux et leur souffrance. Les

cultures cellulaires permettent d'étudier la survie, la morphologie, la fonction ainsi que l'influence de produits chimiques toxiques ou protecteurs. Cependant, les cellules isolées ne sont pas adaptées pour étudier certains processus complexes mettant en jeu de nombreuses interactions entre les types cellulaires, comme c'est le cas au cours du neurodéveloppement (Humpel 2015). Ainsi, au cours des dernières décennies, les cultures organotypiques ont été considérées comme un important pas en avant dans la simulation de situations plus semblables à *l'in vivo*. Les cultures organotypiques permettent en effet de préserver plusieurs aspects de l'organisation structurale et synaptique du tissu originel (Noraberg et al. 2005). Ces cultures de sections cérébrales, en plus de conserver tous les types cellulaires dans une configuration tridimensionnelle, permettent également d'étudier la différenciation *in vitro* avec notamment la poursuite de la myélinisation (Ghoumari et al. 2003; Dean et al. 2011). De plus, ce type de culture peut être maintenu sur des périodes prolongées, rendant possibles des expositions chroniques (Noraberg et al. 2005).

B. Travail expérimental

Dans une seconde partie, nous présenterons un travail expérimental réalisé. Il s'inscrit dans la démarche générale de développer une approche *in vitro* permettant d'améliorer l'évaluation de la toxicité des PE, adaptée au criblage de nombreuses conditions d'exposition.

1 Objectifs de la thèse

Les effets des PE sont souvent modérés et retardés, compliquant les études *in vivo* nécessaires à l'établissement de preuves directes de leur toxicité. En outre, pour les raisons détaillées précédemment dans le paragraphe sur les méthodes d'évaluation du risque neurodéveloppemental des PE, ces études ne permettent pas de cribler de nombreux PE ni d'analyser d'éventuels effets « cocktail ». Les approches *in vitro*, quant à elles, concernent, la plupart du temps, l'étude des effets des PE sur les récepteurs aux œstrogènes ou aux androgènes et sur la synthèse des hormones stéroïdiennes. Peu d'études *in vitro* traitent de l'impact des PE sur neurodéveloppement et les troubles pouvant en découler. Pour remédier à ce manque de données et face au manque de preuves directes de la toxicité des PE pour le cerveau en développement, il est nécessaire de développer des approches alternatives aux méthodes *in vivo* et *in vitro* existantes.

Afin de valider notre approche, nous avons choisi le BPA et le DEHP (en utilisant le MEHP *in vitro*) pour lesquels de nombreuses données *in vivo* sont déjà disponibles dans la bibliographie. Nous avons pour cela utilisé des cultures organotypiques de sections de cerveaux de souris, complétées au besoin par des cultures cellulaires isolées. L'étude a été menée en parallèle sur des cultures issues d'animaux mâles et femelles, compte-tenu de l'importance d'acquérir des connaissances dans les deux sexes et des impacts spécifiques du sexe des PE qui sont très souvent décrits, y compris dans des systèmes *in vitro* non soumis aux contrôles endocriniens.

Plus précisément, après avoir mené des études préliminaires permettant de maîtriser le modèle de cultures organotypiques et de choisir certains paramètres expérimentaux, nous avons

d'abord recherché des effets décrits *in vivo* suite à l'exposition précoce au BPA et/ou au DEHP, tels que leurs impacts sur l'expression des gènes *Bdnf* et *Kcc2*. En parallèle, de nouvelles pistes sur les mécanismes de toxicité qui pourraient conduire à l'apparition des TND ont été explorées, incluant l'analyse de la myélinisation et de la neuroinflammation.

Enfin, l'un des objectifs du projet a été d'initier l'analyse d'altérations épigénétiques en tant que mécanismes susceptibles de contribuer aux effets indésirables des PE et pouvant servir de marqueurs d'exposition à ces substances. L'analyse de ces altérations pourrait augmenter la sensibilité de la méthode d'évaluation et permettre de définir des biomarqueurs traduisant l'exposition aux PE. Situées à l'interface entre gènes et environnement, ces modifications épigénétiques pourraient représenter la mémoire moléculaire des expositions précoces aux PE

A plus long terme, ce projet pourrait contribuer à établir une méthode adaptée au criblage *in vitro* de conditions d'exposition multiples responsables d'effets « cocktail », qui sera un préalable à des études de toxicité *in vivo* ciblées. Ce projet pourrait ainsi contribuer à améliorer l'évaluation du risque lié aux PE.

2 Matériel et Méthodes

2.1 Cultures

Deux modèles complémentaires ont été utilisés, une culture organotypique murine et une culture primaire de microglies murines. Toutes les cultures ont été conservées dans un incubateur à 37°C, 5% de CO₂ et 98% d'humidité.

2.1.1 Culture organotypique murine

Après sacrifice par décapitation de souriceaux mâles et femelles à P2 (2 jours post-natal) provenant de souris gestantes albinos SWISS de Janvier Labs©, les cortex ont été prélevés puis chaque hémisphère a été inclus dans une solution de PBS / agarose à bas point de fusion (low melt) à 2,5%. Après quelques minutes, les hémisphères ont été figés dans le gel d'agarose formant un bloc qui a ensuite été taillé et collé au porte-objet du vibratome (Vibrating microtome, HM 650V, VWR®) par la face sagittale afin de réaliser des sections para-sagittales, plus homogènes en termes de structures cérébrales que les coupes coronales (**Figure 10A**). Les paramètres optimaux ont été sélectionnés : 350 µm d'épaisseur, fréquence de vibration de 50 Hertz, amplitude de 0,8 mm et vitesse de découpe de 20 mm/s. En comptant les coupes depuis le côté latéral (externe) de l'hémisphère vers le plan sagittal (collé au porte objet), les sections para-sagittales 5, 6 et 7 de chaque hémisphère, ne présentant pas de variations d'expression majeures des marqueurs de différents types cellulaires (**Figure 10B**), ont été récupérées et placées dans des inserts (Insert de culture 6 puits thincert Greiner Bio-One) contenant une solution de PBS 1X / Glucose 1%. Cette solution a ensuite été retirée des inserts puis chaque insert a été placé dans un puits de culture contenant 1,5 ml de milieu de culture composé d'une solution de Minimum Essential Medium Eagle (MEM, Sigma) (48%), du Horse Serum (HS) (25%) décomplémenté, une solution de Hank's Balanced Salt Solution 1X (HBSS) sans calcium et sans magnésium (24%), de la pénicilline / streptomycine (1%), de l'amphotéricine B (0,4%), de l'HEPES 20 mM, du glucose (1,1%) et du glutamax (1%).

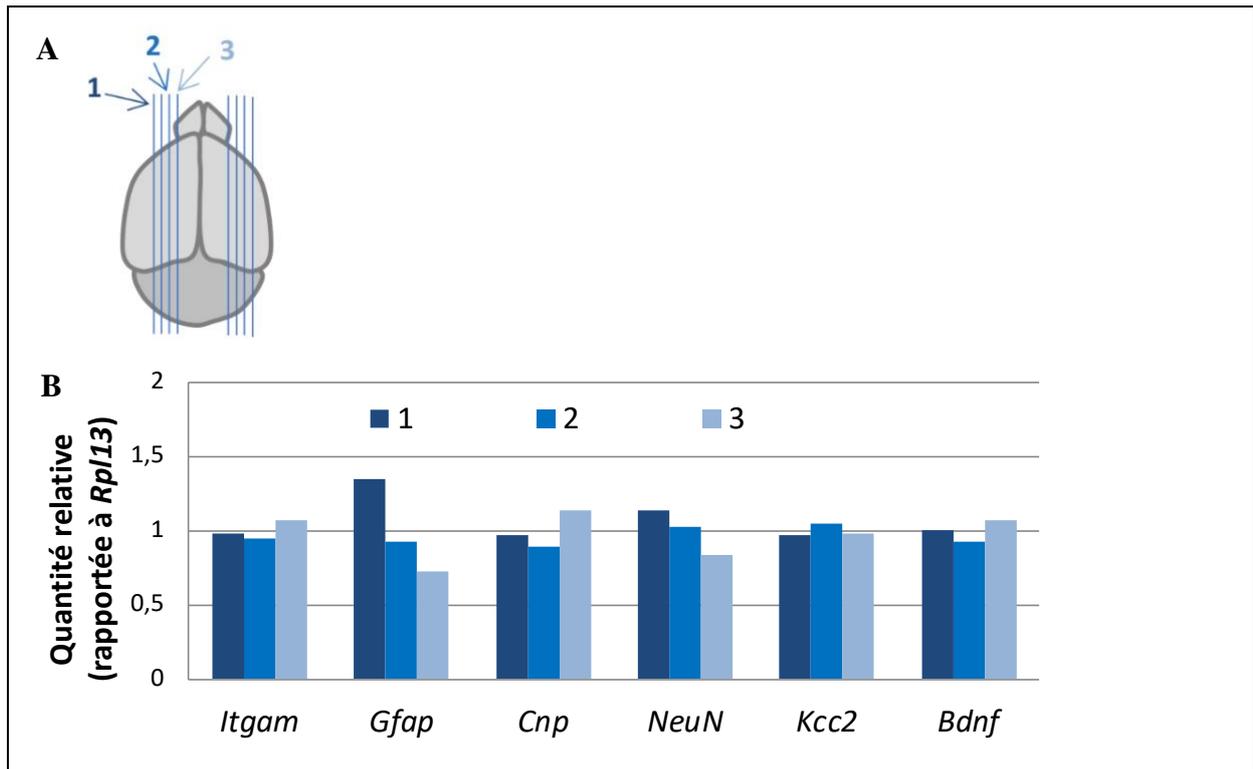


Figure 10 : Choix des paramètres expérimentaux des cultures organotypiques. (A) Orientation des coupes sagittales au niveau du tiers central de chaque hémisphère. **(B)** Quantité relative de marqueurs de différents types cellulaires dans trois sections de cerveau en RT-qPCR montrant une homogénéité des sections de cerveau. *Itgam* = marqueur de microglie ; *Gfap* = marqueur des astrocytes ; *Cnp* = marqueur des oligodendrocytes ; *NeuN* et *Kcc2* = marqueurs des neurones ; *Bdnf* = marqueur de neurodéveloppement. Aucun test statistique n'a été réalisé ($N \leq 3$).

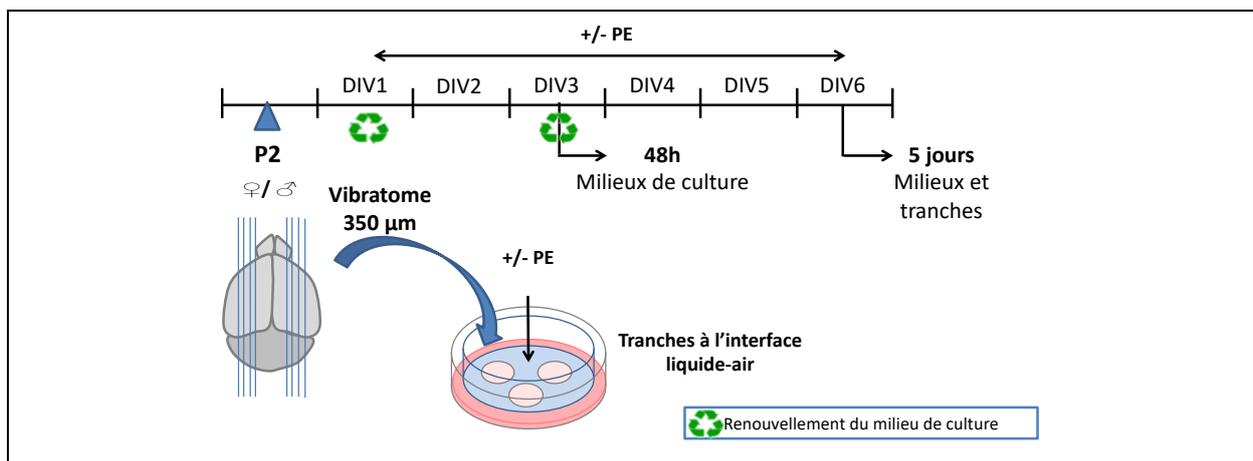


Figure 11 : Schéma représentant le déroulement de la culture organotypique de cerveaux de souriceaux du jour de coupe jusqu'au DIV6 correspondant à l'arrêt de l'exposition (voir les détails dans la partie 2.1.1).

Il s'agit d'une culture à l'interface air/liquide où les sections de cerveaux reposent sur une membrane poreuse (pores de 0,4 μm de diamètre). Des solutions-mères 1000x (à diluer au 1/1000^{ème}) de BPA (Sigma 239658) et de MEHP (Sigma 796832) ont été préparées dans du diméthylsulfoxyde (DMSO). Après 24h (DIV1 : 1 day *in vitro*, **Figure 11**), le milieu a été changé, les sections mâles ont été incubées avec du DMSO seul (0,1%), du BPA (0,1 μM ou 1 μM) ou du MEHP (0,1 μM , 1 μM ou 10 μM) et les sections femelles avec du DMSO (0,1%), du BPA (0,1 μM) ou du MEHP (1 μM). L'exposition a été renouvelée au bout de 48h (DIV3). A la fin du traitement (DIV6), les cellules ont été lysées pour extraction des ARNs. Les milieux (DIV3 et DIV6) ont été conservés à -80°C pour l'analyse par ELISA ciblant des cytokines pro-inflammatoires (**Figure 11**).

2.1.2 Culture primaire de microglie murine

Ces cellules ont été obtenues par tri cellulaire magnétique (MACS pour Magnetic Activated Cell Sorting, Miltenyi). Après sacrifice des souriceaux à P5 (6 mâles et 6 femelles mélangés) par décapitation, les cortex ont été prélevés et mis dans du HBSS sans calcium et sans magnésium, afin de laver le sang tout en évitant d'activer les cellules cérébrales. Les cortex ont été immergés dans des tubes de dissociation contenant un mix enzymatique à base de papaine (Neural Tissue Dissociation kit Papain, Miltenyi) puis dissociés grâce à un programme alternant des étapes de broyage mécanique et d'incubation à 37°C , dans un appareil de dissociation (gentle MACS® Octo dissociator). A l'issue de cette étape, la suspension cellulaire obtenue a été filtrée sur un filtre de 70 μm et rincée deux fois avec du HBSS avec calcium et magnésium. Le culot cellulaire obtenu a ensuite été incubé avec des anticorps anti-CD11b couplés à des billes magnétiques (MACS® technology) dans un tampon de tri contenant du PBS et de la sérum albumine bovine à 0,5%. Après 15 minutes d'incubation, les cellules ont été rincées avec le tampon de tri par dilution suivie d'une centrifugation (10 min, 300g, 4°C), afin d'éliminer les anticorps non liés aux cellules. Les cellules CD11b-positives marquées par l'anticorps ont été retenues dans une colonne soumise à un champ magnétique, puis rincées pour éliminer les cellules non marquées. Les cellules CD11b-positives ont finalement été éluées après avoir ôté la colonne du champ magnétique. Après une étape de centrifugation, les cellules microgliales ont été resuspendues dans du milieu complet composé de Serum-free Macrophage medium 1X contenant de la L-Glutamine (Gibco) et 1% de pénicilline/streptomycine puis

ensemencées dans des plaques de 12 puits à la densité de 400 000 cellules par puits. Le milieu a été changé à 24h (DIV1) puis après 48h (DIV2), les cellules ont été incubées avec du BPA (0,1 μ M), du MEHP (1 μ M) ou du lipopolysaccharide (LPS) à 0,1 μ M, ou avec du DMSO seul à 0,1%, sans renouveler le milieu de culture. Ce protocole (changement du milieu à 24h et exposition à 48h) permet le retour des cellules à un état de quasi-quiescence au début de la stimulation, car le tri cellulaire et la mise en culture peuvent déclencher l'activation de ces cellules. A la fin du traitement (24h et 48h), les cellules ont été lysées pour extraction des ARNs. Les milieux ont été conservés à -80°C pour l'analyse par ELISA en ciblant des cytokines pro-inflammatoires.

2.2 Extraction d'ARN, transcription inverse et réaction de polymérisation en chaîne quantitative en temps réel (RT-qPCR)

2.2.1 Extraction des ARNs de culture organotypique

L'extraction a été effectuée à l'air du Kit NucleoSpin® RNA Set for NucleoZOL (Macherey-Nagel). Les cellules ont été lysées par incubation dans un réactif NucleoZOL qui permet l'inactivation des RNases. Après ajout d'eau exempte de RNases et centrifugation à 12.000g, le surnageant a été transféré dans un nouveau tube auquel a été ajouté un tampon de liaison au filtre. La solution a été transférée dans une colonne NucleoSpin® RNA qui permet de retenir les ARNs. Après 2 étapes de rinçage – centrifugation afin d'éliminer les sels, les métabolites et les macromolécules cellulaires, les ARNs ont été élués dans de l'eau exempte de RNases puis dosés par spectrophotométrie à 260 nm sur Nanodrop (Labtech) afin de déterminer les concentrations en ARN ainsi que la pureté des échantillons, définie par les valeurs de ratios 260/230 (égale à 2) et 260/280 (entre 1,8 et 2,2).

2.2.2 Extraction des ARNs de culture primaire microgliale

L'extraction a été effectuée à l'aide du Kit NucleoSpin® RNA Plus (Macherey-Nagel). Les cellules ont été lysées par incubation dans un tampon chaotropique qui permet également l'inactivation des RNases. Le lysat a ensuite été transféré dans une colonne NucleoSpin® gDNA Removal qui permet de retenir l'ADN génomique et autres débris. Après centrifugation à 11.000g et ajout d'un tampon de liaison au filtre, la solution a été transférée dans une colonne NucleoSpin® RNA Plus qui permet de retenir les ARNs. Après 3 étapes de rinçage – centrifugation afin d'éliminer les sels, les métabolites et les macromolécules cellulaires, les ARNs ont été élués et dosés comme décrit précédemment (2.2.1).

2.2.3 Transcription inverse et PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR)

La synthèse des brins d'ADN complémentaires (ADNc) a été réalisée à partir d'une même quantité d'ARN pour tous les échantillons (500 ou 1000 ng), grâce au kit de reverse transcription IScript Cdna synthesis (BioRad). La réaction a été réalisée dans un volume final de 20 µl contenant 4 µl de tampon et 1 µl d'enzyme. Le programme comprend une étape de 5 minutes à 25°C, puis 30 minutes à 42°C, température à laquelle l'enzyme est active, et enfin 5 minutes à 85°C pour inactiver l'enzyme.

A la fin de la RT, une gamme de dilution (1/5) a été réalisée à partir d'un mélange de l'ensemble des échantillons afin de déterminer l'efficacité de l'amplification pour chaque couple d'amorces (90-105%). Les échantillons ont été dilués au 1/10^{ème}. Dans chaque puits de plaque à 96 puits ont été déposés 2 µl d'ADNc (gamme ou échantillons dilués) et 8 µl de mélange réactionnel composé de 5µl de SybrGreen 2X (BioRad) contenant la polymérase Taq, le tampon, le produit de fluorescence (fluorescéine) et les désoxynucléotides (dNTPs), de 0,2 µl de chaque amorce (sens et anti-sens qui sont aux concentrations initiales de 15 µM) et de 2,6 µl d'eau Milli-Q®. Les séquences des amorces sont indiquées dans le **Tableau 1**.

Tableau 1 : Séquences des amorces utilisées en PCR quantitative.

Gène	Amorce sens 5'	Amorce anti-sens 3'
<i>Bdnf</i>	GGCCCAACGAAGAAAACCAT	GTTTGCGGCATCCAGGTAAT
<i>Kcc2</i>	CAATGGTGTGTGCCTGCTG	GATCTCGATCGTGCCAAGGA
<i>Cnp</i>	AGACAGCGTGGCGACTAGACT	GGGCTTCAGCTTCTTCAGGT
<i>Mbp</i>	CCGGACCCAAGATGAAAAC	CTTGGGATGGAGGTGGTGT
<i>Mog</i>	AAGAGGCAGCAATGGAGTTG	GACCTGCAGGAGGATCGTAG
<i>Tnfa</i>	GCCTCTTCTCATTCTGCTT	AGGGTCTGGGCCATAGAACT
<i>Il1b</i>	GGGCCTCAAAGGAAAGATTC	TCTTCTTTGGGTATTGCTTGG
<i>Dnmt1</i>	CGTTGTGGTGGATGACAAGA	GAACCAGGACAGTGGCTCT
<i>Dnmt3a</i>	ATGCCTCCAATGAAGAGTGG	ACAACCGTCCATTCTTCTGG
<i>Dnmt3b</i>	GTGAGCAGCAGACACCTTGA	GGCCCAACGAAGAAAACCAT
<i>Rpl13</i>	ACAGCCACTCTGGAGGAGAA	GAGTCCGTTGGTCTTGAGGA

La réaction de PCR a été réalisée dans un thermocycleur CFX-96 (BioRad) selon le protocole suivant : une première étape à 98°C (30 secondes) qui permet la dénaturation préliminaire de l'ADNc et l'activation de la Taq polymérase. Cette étape est suivie par un cycle répété 40 fois qui se compose de trois étapes : la dénaturation du double brin d'ADN (95°C, 5 secondes), l'hybridation d'amorces spécifiques (60°C, 10 secondes) et l'élongation du produit de PCR (72°C, 10 secondes). Pour chaque gène étudié, les Cq (Cycle de quantification, à partir duquel la fluorescence est significativement différente du bruit de fond) des différents échantillons ont été déterminés et les calculs de quantification relative réalisés à l'aide du logiciel CFX manager 2.1 (BioRad) selon la formule $Q = (\text{Efficacité}/50)^{-Cq}$. La spécificité d'amplification a été vérifiée en analysant les courbes de fusion. Le gène de référence utilisé pour normaliser les résultats est *Rpl13* (Ribosomal Protein L13). Ce gène a été choisi en raison de la stabilité de son expression dans les conditions expérimentales utilisées.

2.3 Extraction d'ADN et analyse de méthylation ciblée

2.3.1 Extraction des ADNs de culture organotypique

L'extraction a été effectuée à l'aide du Kit NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel). La lyse a été réalisée par incubation de l'échantillon dans une solution de protéinase K / tampon de lyse à 56°C pendant 3 heures. Un second tampon de lyse a ensuite été ajouté dans les échantillons qui ont ensuite été incubés 10 minutes à 70°C. Des conditions appropriées pour la liaison de l'ADN à la membrane de silice dans les colonnes NucleoSpin® sont obtenues par l'addition de sels chaotropiques et d'éthanol au lysat. Le processus de liaison est réversible et spécifique aux acides nucléiques. Les contaminations sont éliminées par lavage avec deux tampons différents. L'ADN génomique pur est finalement élué dans de faibles conditions de force ionique dans un tampon d'éluion légèrement alcalin (Tris 10 mM, pH 7.9) puis dosé par spectrophotométrie à 260 nm sur Nanodrop (Labtech) afin de déterminer les concentrations en ADN ainsi que la pureté des échantillons, définie par les valeurs de ratios 260/230 (égale à 2) et 260/280 (entre 1,8 et 2,2).

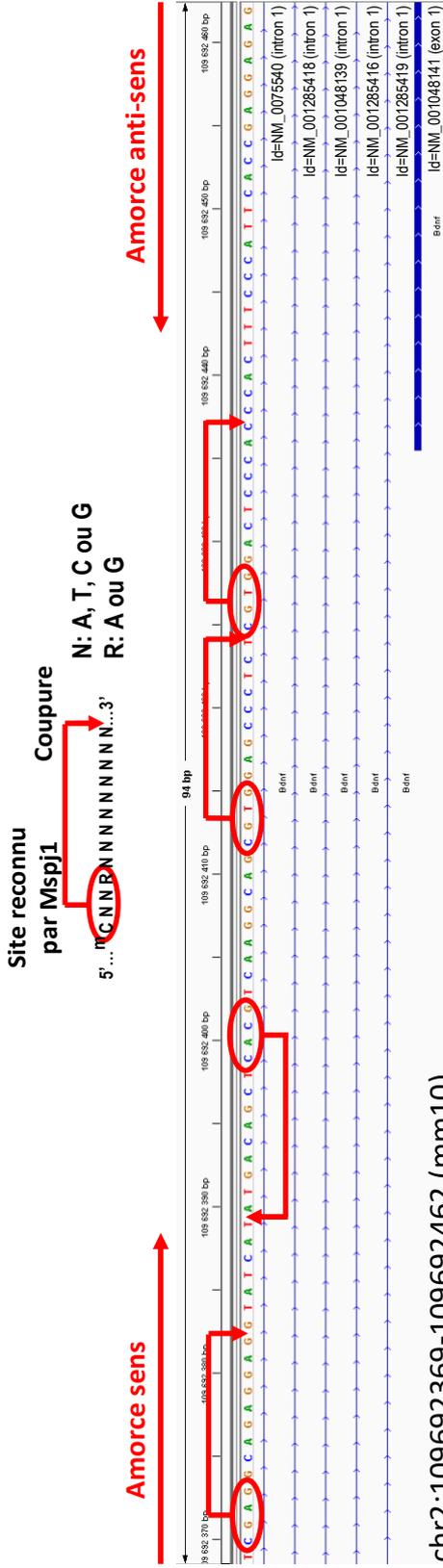


Figure 12 : Représentation du locus *Bdnf* ciblé par l'analyse de méthylation. Les amorces d'amplification sont localisées au-dessus du schéma. Les quatre sites reconnus et coupés par l'enzyme de restriction Mspj1 sont entourés en rouge. La capture d'écran a été faite sur le logiciel IGV (<http://software.broadinstitute.org/software/igv/>).

Tableau 2 : Séquences des amorces utilisées pour l'étude de la méthylation ciblée.

Locus	Amorce sens 5'	Amorce anti-sens 3'	Position du locus (mm10)
<i>Bdnf</i>	TCGAGGCAGAGGAGGTATCA	CTCTCTCGGTGAATGGGAA	chr2:109692369-109692462
<i>CGfree</i>	AGTCTGGATGCCTCAACCTG	GGCAGGCCCTGATAAAGGAAC	chr18:31916482-31916609

2.3.1 Méthylation d'ADN

L'analyse de méthylation ciblée avec une enzyme de restriction sensible à la méthylation a été réalisée à partir des échantillons d'ADN extraits. Ces échantillons ont été digérés par une première enzyme de restriction MseI (New England Biolabs) coupant au niveau des sites TTAA, permettant de fragmenter le génome et d'améliorer l'efficacité de l'analyse. Le mix contient pour un échantillon : 39,5 µl d'eau Milli-Q®, 5 µl de tampon cutsmart (10X) et 0,5 µl d'enzyme MseI (à 50 U/µl). Les échantillons ont été incubés 1h30 au bain marie à 37°C. En parallèle, un mélange de tous les échantillons d'ADN a été digéré par l'enzyme MseI dans les mêmes conditions et traité simultanément par une CpG Methyltransferase (M.SssI) permettant d'obtenir un contrôle positif de méthylation (cette enzyme présente une efficacité de 100% dans le tampon cutsmart). Le mélange a été traité par 2 µl de méthylase à 4 U/µl.

Après cette première étape de digestion (+ méthylation du mélange), l'enzyme de restriction Mspj1 (coupe l'ADN méthylé selon la séquence représentée sur la **Figure 12**) a été ajoutée dans chaque mélange avec son activateur à raison de 0,8 µl d'enzyme à 5 U/µl et 1,7 µl d'activateur par échantillon. La digestion a été réalisée au bain-marie pendant 1h30 à 37°C.

Les ADN digérés ont été purifiés à l'aide du Kit NucleoSpin® gDNA clean up (Macherey-Nagel). L'ADN a été mélangé avec un tampon de liaison et chargé sur une colonne de nettoyage d'ADN génomique NucleoSpin®. Tous les types de contaminants ont été éliminés par deux étapes de lavage avec un tampon de rinçage. Après une étape de séchage, l'ADN pur et concentré a été élué dans 50 µl de tampon d'éluion (Tris/HCl 5 mM, pH 8,5).

2.3.2 PCR quantitative en temps réel (qPCR)

L'analyse de l'ADN a été réalisée par PCR quantitative en plaques de 96 puits selon le protocole décrit précédemment (2.2.3). Les séquences des amorces sont indiquées dans le **Tableau 2**.

Les sites génomiques analysés par PCR ne contiennent pas de site de restriction pour MseI (TTAA), qui a été utilisée pour fragmenter le génome. Le principe de la quantification repose sur l'analyse de sites contenant au moins un site sensible à Mspj1. Ici, le locus d'intérêt

est dans la région du gène *Bdnf* et contient quatre sites sensibles à *Mspj1* (**Figure 12**). Si au moins un de ces sites est méthylé, il en résulte une coupure par *Mspj1*, ce qui induit une diminution de la quantité d'ADN détecté par qPCR. Un locus ne contenant aucun site CpG (*CGfree*) a également été amplifié afin de normaliser les résultats. La quantité d'ADN à ce locus ne variant pas en fonction de la méthylation, il permet d'éliminer les variations inter-échantillons (quantités d'ADN avant et après les étapes de digestion / purification). Les résultats ont été calculés selon la formule suivante : $Q = 2^{E(Ct_{Bdnf} - Ct_{CGfree})}$ puis rapportés au contrôle (DSMO=1, $Q > 1$ correspond à une augmentation de la méthylation et inversement).

2.4 Test ELISA TNF- α et IL-1 β

Ces tests ont été réalisés à l'aide des kits Quantikine® ELISA Mouse TNF- α ou IL-1 β /IL-1F2 (R&DSystems®). Ils utilisent la technique quantitative d'immunoessai enzymatique en sandwich présentée en **Annexe 2** (9). Un anticorps monoclonal spécifique du TNF- α ou d'IL-1 β de souris a été pré-enduit sur une microplaque. Les étalons, le contrôle et les échantillons ont été pipetés dans les puits et les molécules de TNF- α ou d'IL-1 β présentes se sont liées à l'anticorps immobilisé. Après élimination de toute substance non liée, un anticorps secondaire couplé à une enzyme (Horseradish Peroxidase) a été ajouté dans les puits. Après un lavage pour éliminer tout couple anticorps-enzyme non lié, une solution de substrat a été ajoutée aux puits. La réaction enzymatique donne un produit bleu qui devient jaune lorsque la solution d'arrêt est ajoutée. L'intensité de coloration, mesurée au spectrophotomètre à 540 nm, est proportionnelle à la quantité du TNF- α ou d'IL-1 β liée dans l'étape initiale. Les concentrations de cytokines sont calculées grâce à la courbe standard.

2.5 Méthodologie et statistiques

Afin de renforcer la confiance dans les résultats, les observations ont été réalisées en duplicat au cours d'une même expérience. Le nombre d'observations pour réaliser chaque expérience est indiqué dans la légende de chaque figure.

Les graphiques représentent des données relatives, sous la forme de moyennes \pm SEM (écart-type de la moyenne). Ils ont été réalisés, de même que les tests statistiques, à l'aide du logiciel GraphPad Prism 5 pour Windows (GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com). En raison du faible nombre d'échantillons comparés, ne permettant pas de tester la normalité de la distribution des données, les résultats ont été soumis à des tests statistiques non paramétriques. Pour les cultures mâles, un test de variance à une voie non-paramétrique de Kruskal-Wallis a été réalisé entre les différentes doses de chaque traitement : BPA (0 μ M, 0,1 μ M, 1 μ M) ou MEHP (0 μ M, 0,1 μ M, 1 μ M, 10 μ M). En cas de significativité ($p < 0,05$), un post-test de comparaisons multiples de Dunn a été mené pour comparer les différentes doses par rapport au contrôle. Concernant les cultures femelles, les comparaisons de deux groupes de données (une concentration de BPA ou MEHP testée versus DMSO) ont été soumises à un t-test non paramétrique de Mann-Whitney, dans le cas où chaque groupe comportait au minimum 4 échantillons. Les résultats statistiquement significatifs sont indiqués par des étoiles : *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.

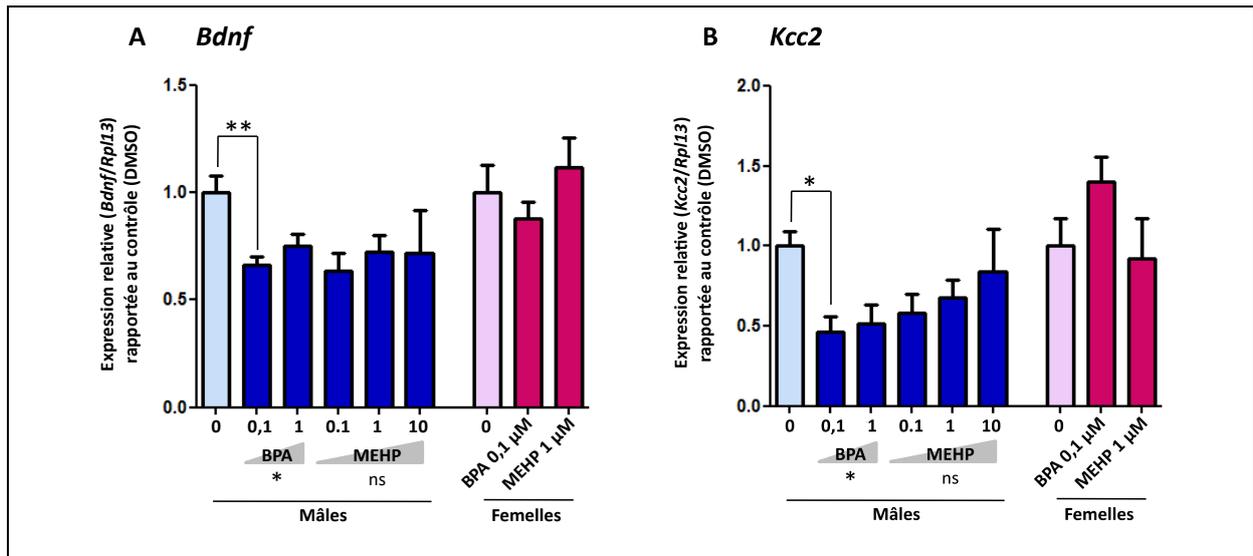


Figure 13 : Le BPA et le MEHP perturbent l'expression des gènes *Bdnf* et *Kcc2* dans les cultures mâles. Les sections de cerveaux de souris ont été incubées pendant 5 jours avec les concentrations de BPA, de MEHP ou de DMSO indiquées, selon le protocole décrit dans le matériel et méthodes. L'expression relative des gènes *Bdnf* et *Kcc2* a été quantifiée par RT-qPCR et rapportée à l'expression de *Rpl13*. Les résultats sont exprimés en moyennes \pm SEM normalisées par rapport aux échantillons contrôles (DMSO). Le nombre d'observations pour les groupes mâles est : DMSO (6), BPA 0,1 μ M (6), BPA 1 μ M (3), MEHP 0,1 μ M (3), MEHP 1 μ M (5), MEHP 10 μ M (3) et pour les groupes femelles : DMSO (6), BPA 0,1 μ M (6) et MEHP 1 μ M (4). Pour les cultures mâles, un test de Kruskal-Wallis a été réalisé entre les différentes doses de chaque traitement. Dans le cas où $p < 0,05$, un post-test de Dunn a été réalisé entre chaque dose et son contrôle. Les étoiles sous le graphique indiquent un résultat significatif pour le test de Kruskal-Wallis et les étoiles au-dessus des barres indiquent un résultat significatif pour le post-test de Dunn. Pour les cultures femelles, un test de Mann-Whitney a été réalisé entre les traitements au BPA ou au MEHP et le contrôle. * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$, ns : non significatif.

3 Résultats

3.1 Impact des PE sur l'expression de *Bdnf* et *Kcc2*

Afin de rechercher les effets déjà décrits *in vivo* dans notre modèle de culture organotypique, les sections de cerveaux de souriceaux des deux sexes ont été traitées par le BPA, le MEHP ou le DMSO seul pendant cinq jours selon le schéma décrit sur la **Figure 11**. Les cultures mâles ont été traitées par différentes concentrations de BPA (0,1 μ M, 1 μ M) ou de MEHP (0,1 μ M, 1 μ M, 10 μ M). Les cultures femelles ont été traitées avec du BPA à 0,1 μ M ou du MEHP à 1 μ M. Après extraction des ARNs, l'expression relative des gènes *Bdnf* et *Kcc2* a été évaluée par RT-qPCR.

Dans les cultures issues de cerveaux de souriceaux mâles, l'expression des gènes *Bdnf* (**Figure 13A**) et *Kcc2* (**Figure 13B**) a été significativement diminuée après traitement au BPA à la concentration de 0,1 μ M (*Bdnf* : $x 0,66 \pm 0,04$; *Kcc2* : $x 0,46 \pm 0,1$). L'expression de *Bdnf* et *Kcc2* dans les cultures mâles a également été perturbée par le BPA à 1 μ M et par le MEHP aux différentes concentrations testées, avec une tendance à la diminution, mais aucune de ces conditions n'a induit de changement significativement différent du contrôle. Enfin, aucun des PE n'a entraîné d'effet significatif sur l'expression des gènes *Bdnf* et *Kcc2* dans les cultures issues de cerveaux de souriceaux femelles aux concentrations testées.

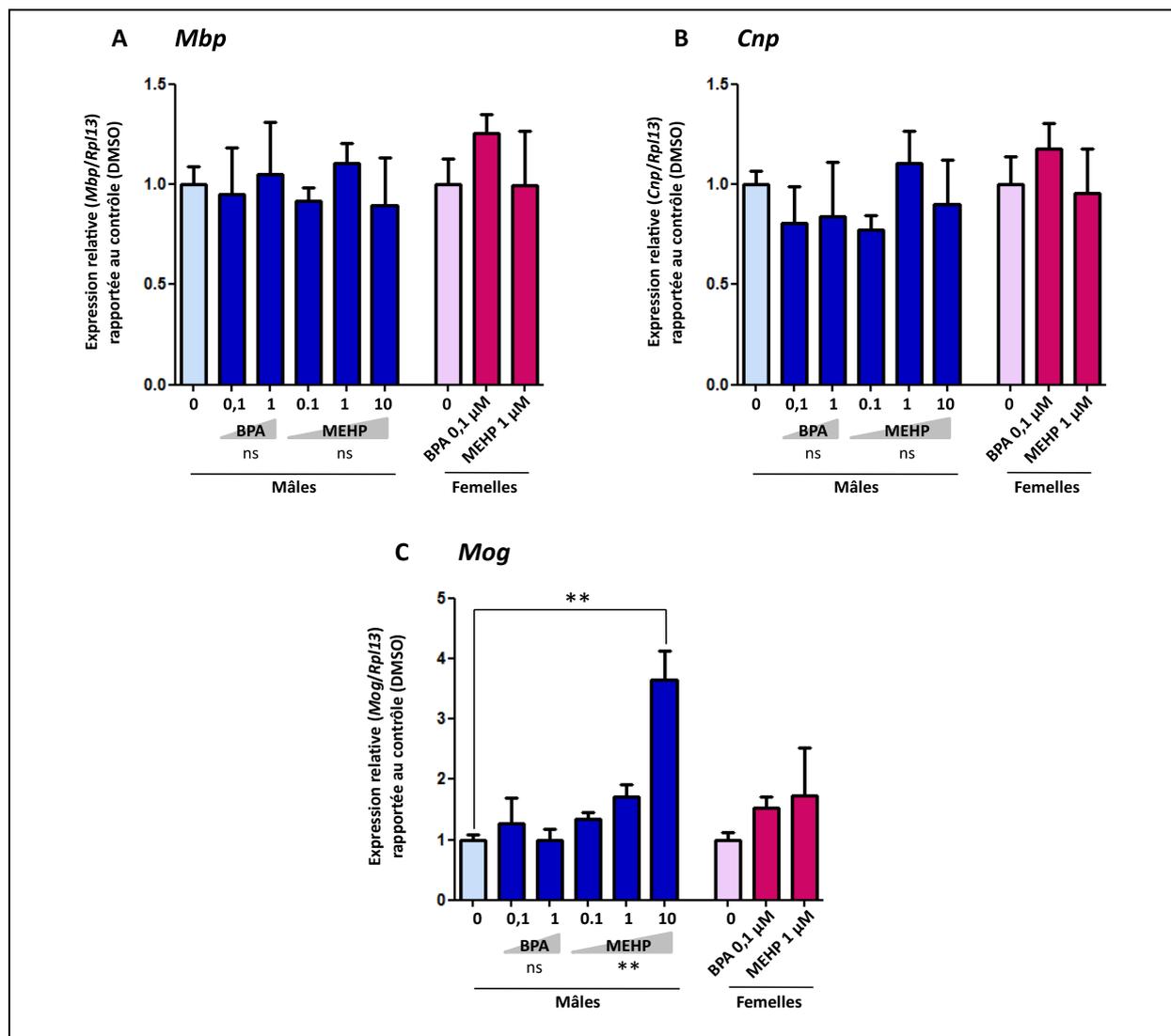


Figure 14 : Le BPA augmente l'expression de *Mog* à la concentration de 10 μ M chez le mâle. Les sections de cerveaux de souris ont été incubées pendant 5 jours avec les concentrations de BPA, de MEHP ou de DMSO indiquées, selon le protocole décrit dans le matériel et méthodes. L'expression relative des gènes *Mbp*, *Cnp* et *Mog* a été quantifiée par RT-qPCR et rapportée à l'expression de *Rpl13*. Les résultats sont exprimés en moyennes \pm SEM normalisées par rapport aux échantillons contrôles (DMSO). Le nombre d'observations pour les groupes mâles est : DMSO (6), BPA 0,1 μ M (6), BPA 1 μ M (3), MEHP 0,1 μ M (3 pour *Mbp* et *Cnp* et 2 pour *Mog*), MEHP 1 μ M (5), MEHP 10 μ M (3) et pour les groupes femelles : DMSO (6), BPA 0,1 μ M (6) et MEHP 1 μ M (4). Pour les cultures mâles, un test de Kruskal-Wallis a été réalisé entre les différentes doses de chaque traitement. Dans le cas où $p < 0,05$, un post-test de Dunn a été réalisé entre chaque dose et son contrôle. Les étoiles sous le graphique indiquent un résultat significatif pour le test de Kruskal-Wallis et les étoiles au-dessus des barres indiquent un résultat significatif pour le post-test de Dunn. Pour les cultures femelles, un test de Mann-Whitney a été réalisé entre les traitements au BPA ou au MEHP et le contrôle. **: $p < 0,01$, ns : non significatif.

3.2 Autres marqueurs du neurodéveloppement

3.2.1 Impact des PE sur la myélinisation

Nous avons ensuite analysé l'effet des PE sur l'expression des gènes *Mbp* (**Figure 14A**), *Cnp* (**Figure 14B**) et *Mog* (**Figure 14C**), marqueurs de différenciation des oligodendrocytes. Concernant *Mbp* et *Cnp*, aucun effet des différentes concentrations de BPA et de MEHP n'a été constaté dans les cultures mâles et femelles. L'expression de *Mog* a, quant à elle, été augmentée par le MEHP à la concentration de 10 μM ($\times 3,6 \pm 0,49$) dans les cultures mâles. Cette concentration n'a pas été testée chez la femelle.

3.2.2 Impacts sur l'inflammation et sur le phénotype microglial

Nous avons également évalué l'effet du BPA et du MEHP sur l'expression des cytokines pro-inflammatoires $\text{TNF}\alpha$ et $\text{IL-1}\beta$ dans les cultures organotypiques. En parallèle, nous avons traité des microglies purifiées à ces deux PE pendant 48h et avons également soumis ces cultures à une exposition au LPS afin de disposer d'un contrôle positif. En effet, le LPS est connu pour induire l'expression de ces deux cytokines. L'expression des cytokines a été évaluée par RT-qPCR à la fin de l'exposition (DIV6 pour les cultures organotypiques et 48h pour la microglie) et par dosage ELISA des cytokines sécrétées dans le milieu de culture (DIV3 et DIV6 pour les cultures organotypiques et 48h pour la microglie) (**Figure 11**).

Dans les cultures organotypiques mâles, l'expression de *Il1b* (**Figure 15B**) a été significativement augmentée par le MEHP à la concentration de 10 μM ($\times 3,5 \pm 0,03$). Le BPA n'a pas entraîné d'effet significatif sur l'expression de *Il1b* dans les cultures issues de cerveaux de souriceaux mâles et femelles aux concentrations testées. Aucun des deux PE n'a eu d'effet sur l'expression du gène *Tnfa* (**Figure 15A**).

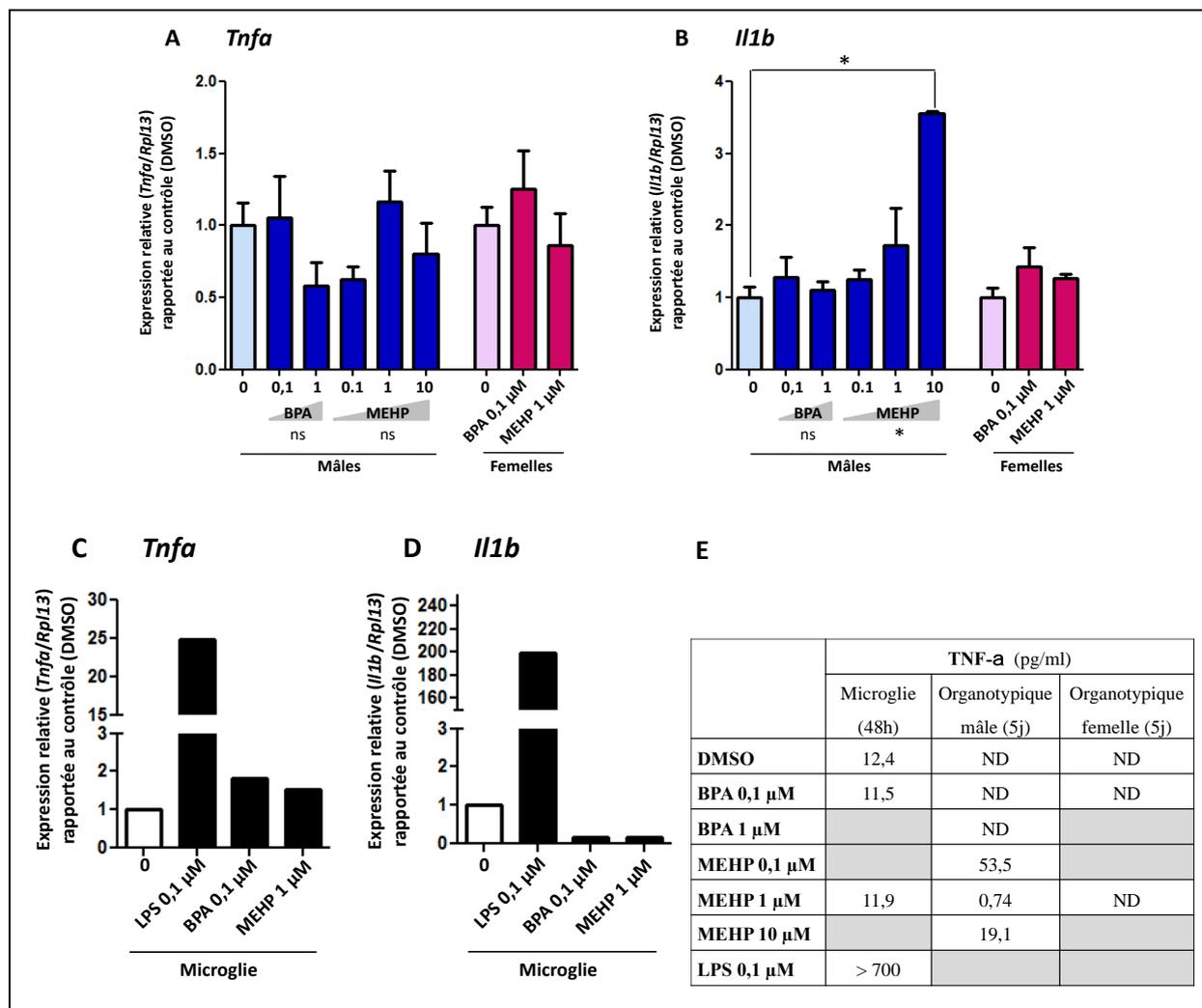


Figure 15 : Le MEHP augmente l'expression de *Il1b* à la concentration de 10 μ M dans les cultures organotypiques mâles. Les sections de cerveaux de souriceaux et les microglies purifiées ont été incubées pendant 5 jours et 48h respectivement, avec les concentrations de BPA, de MEHP ou de DMSO indiquées, selon le protocole décrit dans le matériel et méthodes. **(A,B)** L'expression relative de *Tnfa* et *Il1b* a été quantifiée par RT-qPCR et rapportée à l'expression de *Rpl13*. Les résultats sont exprimés en moyennes \pm SEM normalisées par rapport aux échantillons contrôles (DMSO). Le nombre d'observations pour les groupes mâles est : DMSO (6), BPA 0,1 μ M (6), BPA 1 μ M (3), MEHP 0,1 μ M (3 pour *Tnfa* et 2 pour *Il1b*), MEHP 1 μ M (5), MEHP 10 μ M (3) et pour les groupes femelles : DMSO (6), BPA 0,1 μ M (6) et MEHP 1 μ M (4). Pour les cultures mâles, un test de de Kruskal-Wallis a été réalisé entre les différentes doses de chaque traitement. Dans le cas où $p < 0,05$, un post-test de Dunn a été réalisé entre chaque dose et son contrôle. Les étoiles sous le graphique indiquent le résultat du le test de Kruskal-Wallis et les étoiles au-dessus des barres indiquent un résultat significatif pour le post-test de Dunn. Pour les cultures femelles, un test de Mann-Whitney a été réalisé entre les traitements au BPA ou au MEHP et le contrôle. * : $p < 0,05$, ns : non significatif. **(C,D)** Les microglies purifiées ont été traitées avec 0,1 μ M de BPA, 1 μ M de MEHP, 0,1 μ M de LPS ou avec 0,1 % de DMSO pendant 48h. L'expression relative des gènes *Tnfa* et *Il1b* a été quantifiée par RT-qPCR et rapportée à l'expression de *Rpl13*. Aucun test statistique n'a été réalisé ($N \leq 3$). **(E)** Quantification par dosage ELISA de TNF- α sécrétée dans les milieux des microglies et des cultures organotypiques après traitement avec différentes concentrations de BPA et MEHP pendant 48h et 5 jours respectivement. ND : non détecté, case grisée : non analysée.

Dans les cultures primaires de microglie, le BPA et le MEHP n'ont pas eu d'effet sur l'expression de *Tnfa* (**Figure 15C**) et de *Il1b* (**Figure 15D**) aux concentrations testées. Le LPS, servant de contrôle positif, a induit une forte sur-expression des deux gènes pro-inflammatoires.

Concernant maintenant le dosage ELISA de la cytokine TNF- α dans les milieux de culture de la microglie, le traitement au LPS a entraîné une saturation de la coloration, indiquant la présence de TNF- α dans le milieu de culture à une concentration $>$ à 700 pg/ml, correspondant à la valeur la plus élevée de la gamme d'étalonnage utilisée (**Figure 15E**). Ce résultat représente un contrôle positif et permet d'interpréter les autres résultats. En revanche, aucune augmentation de la quantité de TNF- α n'a été observée dans le milieu de culture de la microglie traitée par le BPA (0,1 μ M) et le MEHP (1 μ M) après 48h par rapport aux cellules contrôle. Dans les milieux des cultures organotypiques, le TNF- α s'est révélé indétectable dans toutes les conditions à DIV3, après les premières 48h de traitement (données non illustrées). A DIV6, après les dernières 72h de culture soit un total de 5 jours de traitement, le TNF- α a été détecté dans les milieux des cultures mâles exposées aux différentes concentrations de MEHP, contrairement aux cultures mâles contrôles ou exposées au BPA et aux milieux des cultures femelles. Les concentrations de TNF- α , mesurées dans un seul puits de culture, ont varié de façon non monotone, allant de 0,74 pg/ml pour la concentration de 1 μ M à 53,5 pg/ml pour la concentration de 0,1 μ M, en passant par une concentration intermédiaire de 19,1 pg/ml pour la concentration de 10 μ M. Enfin, la cytokine IL-1 β n'a été détectée dans aucun milieu de culture, y compris dans le contrôle positif, rendant impossible l'interprétation des résultats (données non illustrées).

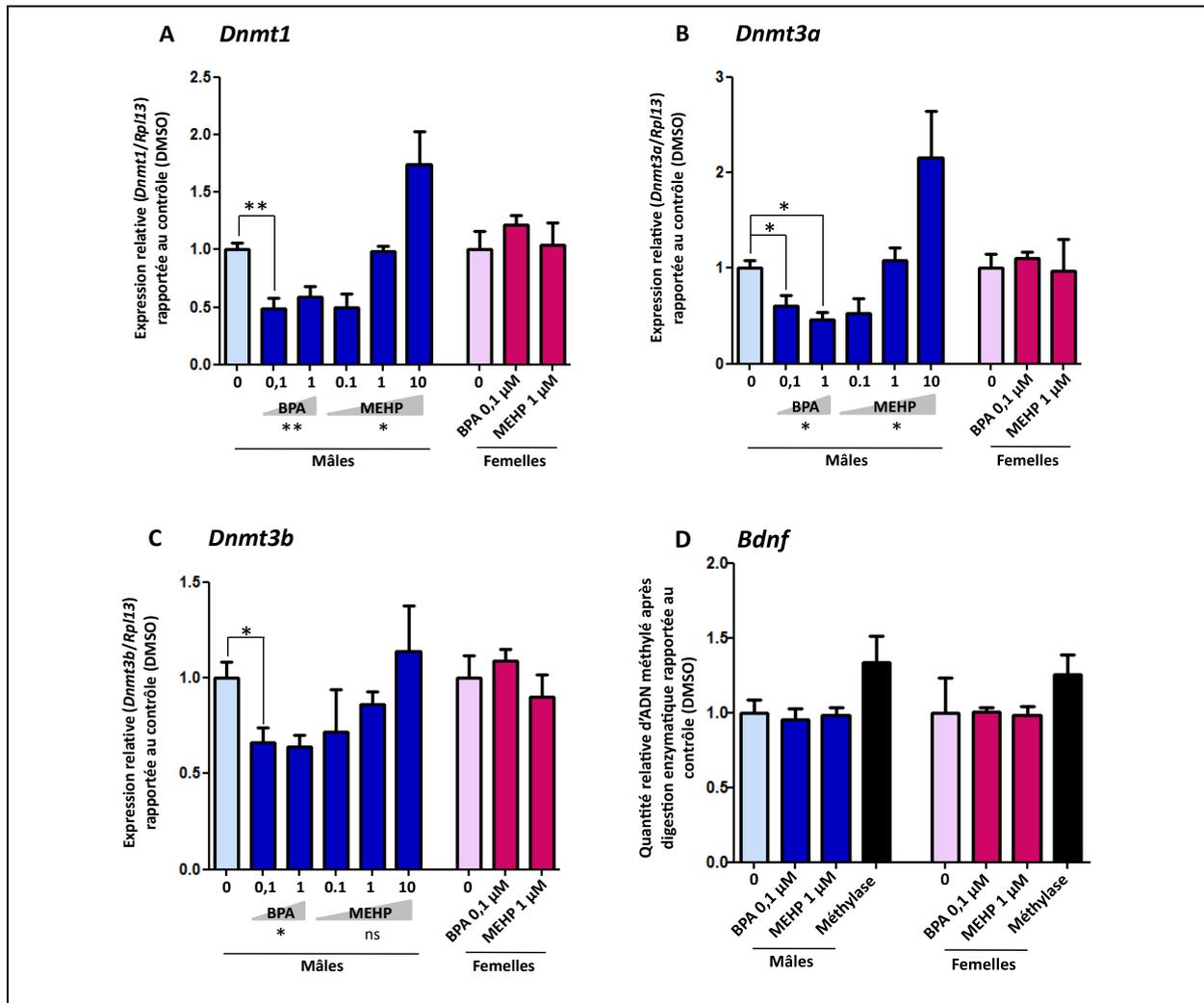


Figure 16 : Le BPA perturbe l'expression des gènes *Dnmt1*, *Dnmt3a* et *Dnmt3b* chez le mâle. La quantité d'ADN méthylé sur le gène *Bdnf* n'est pas modifiée après traitement au BPA ou MEHP. Les sections de cerveaux de souris ont été incubées pendant 5 jours avec les concentrations de BPA, de MEHP ou de DMSO indiquées, selon le protocole décrit dans le matériel et méthodes. (A,B,C) L'expression relative des gènes *Dnmt1*, *Dnmt3a* et *Dnmt3b* a été quantifiée par RT-qPCR et rapportée à l'expression de *Rpl13*. Les résultats sont exprimés en moyennes \pm SEM normalisées par rapport aux échantillons contrôles (DMSO). Le nombre d'observations pour les groupes mâles est : DMSO (6), BPA 0,1 μ M (6), BPA 1 μ M (3), MEHP 0,1 μ M (2), MEHP 1 μ M (5), MEHP 10 μ M (3) et pour les groupes femelles : DMSO (6), BPA 0,1 μ M (6) et MEHP 1 μ M (4). Pour les cultures mâles, un test de variance à une voie de Kruskal-Wallis a été réalisé entre les différentes doses de chaque traitement. Dans le cas où $p < 0,05$, un post-test de Dunn a été réalisé entre chaque dose et son contrôle. Les étoiles sous le graphique indiquent un résultat significatif pour le test de Kruskal-Wallis et les étoiles au-dessus des barres indiquent un résultat significatif pour le post-test de Dunn. Pour les cultures femelles, un t-test non paramétrique de Mann-Whitney a été réalisé entre les traitements au BPA ou au MEHP et le contrôle. * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$, ns : non significatif. (D) Analyse de méthylation ciblée par *Msp1j* au niveau du locus du gène *Bdnf*. Aucun test statistique n'a été fait pour le traitement par la méthylase ($N \leq 3$).

3.1 Impacts épigénétiques des PE

3.1.1 Impact sur l'expression des gènes codant les DNMT (1, 3a et 3b)

Pour examiner si les mécanismes épigénétiques peuvent sous-tendre les effets du BPA et du MEHP sur l'expression de gènes d'intérêt, nous avons analysé l'expression de l'ARNm des enzymes catalysant la méthylation de l'ADN, DNMT1, DNMT3a et DNMT3b.

Dans les cultures issues de cerveaux de souriceaux mâles, l'expression des gènes *Dnmt1* (**Figure 16A**), *Dnmt3a* (**Figure 16B**) et *Dnmt3b* (**Figure 16C**) a été significativement diminuée après traitement au BPA à la concentration de 0,1 μM (*Dnmt1* : $x 0,48 \pm 0,09$; *Dnmt3a* : $x 0,60 \pm 0,12$; *Dnmt3b* : $x 0,66 \pm 0,08$) et à la concentration de 1 μM pour *Dnmt3a* ($x 0,47 \pm 0,08$). L'expression de *Dnmt1* et *Dnmt3a* dans les cultures mâles a également été significativement perturbée par le MEHP (résultat significatif de l'analyse de variance), mais aucune concentration n'a induit de changement d'expression significativement différent du contrôle (post-tests de Dunn non significatifs). Cependant, une tendance à la diminution d'expression pour 0,1 μM de MEHP et à l'augmentation pour 10 μM a été observée. Enfin, aucun des PE n'a entraîné d'effet significatif sur l'expression des gènes *Dnmt1*, *Dnmt3a* et *Dnmt3b* dans les cultures issues de cerveaux de souriceaux femelles aux concentrations testées.

3.1.2 Analyse de méthylation

Ensuite, nous avons réalisé une analyse de méthylation ciblée avec une enzyme de restriction sensible à la méthylation (*Mspj1*) sur un site du gène *Bdnf* (**Figure 12**) puis avons évalué la quantité relative d'ADN méthylé par qPCR.

La méthylase, utilisée comme contrôle positif de méthylation, a bien entraîné une augmentation de la méthylation. L'analyse de méthylation ciblée par *Mspj1* au niveau du locus du gène *Bdnf* n'a pas montré de variation de méthylation de l'ADN suite aux différents traitements par rapport au contrôle DMSO dans les cultures mâles et femelles (**Figure 16D**).

4 Discussion

4.1 Impacts sur *Kcc2* et *Bdnf*

Dans cette étude, nous avons observé une répression significative de l'expression de *Bdnf* et de *Kcc2* par le BPA à la concentration de 0,1 μM dans les cultures organotypiques mâles et non dans les cultures femelles. Concernant le MEHP, la même tendance, non statistiquement significative, a été observée.

Ces résultats sont partiellement en accord avec les données de la littérature. L'absence d'effet dose-réponse pourrait indiquer que l'effet observé est déjà un effet maximum pour les doses testées les plus faibles. Concernant le BPA, cette hypothèse est en accord avec une étude réalisée dans une lignée cellulaire, où l'effet maximal du BPA a été observé dès 0,1 μM sur l'expression du gène d'intérêt (Kitraki et al. 2015).

Nos résultats ont également mis en évidence un dimorphisme sexuel de l'impact des deux PE sur ces gènes, avec une absence d'effet chez la femelle après exposition au BPA ou au MEHP. Bien que toutes les doses n'aient pas été testées chez la femelle, l'absence d'effet ou même d'une simple tendance aux doses testées suggère qu'il y a bien une spécificité de cet effet chez les mâles dans ce modèle *in vitro*. Des effets sexuellement dimorphiques du BPA ont été rapportés dans plusieurs études *in vitro* et *in vivo* (Yeo et al. 2013; Kundakovic et al. 2015). Cependant, dans l'étude de Yeo sur le gène *Kcc2*, le dimorphisme sexuel correspondait à un effet plus accentué chez les femelles après exposition au BPA *in utero* chez le rat et la souris, à l'inverse des résultats présentés dans ce rapport. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer l'apparente contradiction entre nos résultats et cette étude : d'une part les modèles sont différents et, d'autre part, l'exposition est plus précoce et plus longue dans l'étude de Yeo (*in utero*, deux semaines avant l'accouplement et durant la gestation).

Ces résultats, qui restent à confirmer en répétant cette expérience et en utilisant d'autres approches complémentaires (analyses des niveaux protéiques notamment), suggèrent que ce modèle pourrait donc bien permettre de reproduire certains effets observés *in vivo*, et contribuer à valider ce modèle organotypique pour l'étude plus poussée de la toxicité neurodéveloppementale des PE.

4.2 Impact sur la myélinisation

Les résultats préliminaires sur la myélinisation mettent en évidence **une augmentation de l'expression de *Mog* chez le mâle sous l'effet du MEHP, avec une tendance observée dès la concentration de 1 μ M et un effet significatif à 10 μ M. Chez la femelle, aucun effet n'a été mis en évidence sur les marqueurs de myélinisation.** Cependant, l'analyse doit être complétée en raison du faible nombre d'échantillons et de la variabilité importante.

Ce résultat préliminaire suggère que le MEHP perturbe la différenciation des oligodendrocytes. Cet effet pourrait être direct sur ce type cellulaire, à l'image de l'effet observé dans les cellules PC12, dont la différenciation est également induite par le MEHP (Chen et al. 2011). Il est à noter qu'un évènement induisant précocement un évènement de différenciation pourrait se révéler néfaste pour le développement. Une étude de neuroimagerie, visant à examiner de façon prospective l'organisation de la substance blanche chez des nourrissons ayant déclaré un TSA plus tard dans la vie, suggère en effet que le développement aberrant (trop précoce) de la substance blanche (c'est-à-dire des faisceaux de fibres myélinisées) pourrait précéder la manifestation des symptômes autistiques au cours de la première année de vie (Wolff et al. 2012).

Ces résultats seront à confirmer en répétant ces analyses, mais également en étudiant d'autres marqueurs de myélinisation et en analysant l'expression de ces marqueurs par immunohistochimie, en particulier en réalisant un marquage des oligodendrocytes avec un anticorps anti-MOG. Il serait également intéressant d'évaluer l'impact direct du MEHP sur les oligodendrocytes, en testant l'effet de différentes concentrations sur des cultures d'oligodendrocytes primaires purifiés par tri cellulaire.

4.3 Impact sur l'inflammation

L'inflammation est retrouvée dans de nombreux contextes pathologiques, y compris les TND. Nous avons observé une **augmentation de l'expression du gène *Il1b* après exposition des cultures organotypiques mâles au MEHP à la concentration de 10 μ M**. Afin de tester si cet effet est spécifiquement observé dans les cultures mâles, il serait nécessaire de reproduire l'expérience à cette concentration sur des cultures femelles. Ce résultat préliminaire suggère que le MEHP exercerait un effet pro-inflammatoire dans les cultures organotypiques mâles. Ce résultat est en accord avec plusieurs études de la littérature. Une équipe a par exemple étudié les niveaux d'expression de biomarqueurs neuroimmuns dans l'hypothalamus d'un modèle murin d'asthme allergique après exposition au phtalate tout au long de la juvénilité jusqu'à l'âge adulte (Win-Shwe et al. 2013). Le traitement par le DEHP a entraîné une augmentation de l'expression des gènes *Il1b* et *Tnfa* dans l'hypothalamus des souris traitées au DEHP en présence de l'allergène. Cette étude a donc montré que l'exposition au DEHP pouvait induire une neuroinflammation en modulant les biomarqueurs neuroimmuns dans l'hypothalamus des souris allergiques. Plus récemment, une autre étude a révélé que l'exposition prénatale au DEHP provoquait des altérations du comportement associées à une neurodégénérescence causée par des dommages oxydatifs et une inflammation de l'hippocampe (Barakat et al. 2018).

Contrairement au gène *Il1b*, l'expression de *Tnfa* n'a pas été modifiée, quelle que soit la concentration de MEHP testée. Le BPA n'a eu aucun effet notable sur l'expression de ce gène dans les cultures organotypiques. Les résultats obtenus sur la microglie purifiée n'ont montré aucun effet des concentrations testées à 48h. Ces résultats devront être complétés, en particulier en exposant ces cellules par du MEHP à 10 μ M, afin de tester la possibilité d'une activation directe de ces cellules.

D'autre part, l'analyse des milieux de culture, qui n'a pas fonctionné pour l'IL-1 β , pourrait suggérer une augmentation de la production de TNF- α sous l'effet du MEHP aux différentes concentrations testées après 5 jours (DIV6). Si ce résultat est confirmé, il est possible qu'à ce stade du traitement, la production de TNF- α soit détectable dans le milieu de culture après 72h sans changer le milieu (DIV6 après changement du milieu à DIV 3, **Figure 11**), mais que l'expression du gène *Tnfa* soit en revanche non différente du contrôle car le gène aurait été activé de façon transitoire puis désactivé, ou encore que l'augmentation de la sécrétion résulte de mécanismes régulateurs post-transcriptionnels (MacKenzie et al. 2002).

4.4 Impacts épigénétiques

Des preuves croissantes suggèrent que l'exposition aux phtalates et aux bisphénols peut exercer des effets épigénétiques importants (Weiss, 2012). En 2012, le BPA et les phtalates ont été associés à des changements généralisés de méthylation dans plus de 20 gènes humains (Singh et Li, 2012).

La perturbation épigénétique spécifique du sexe du gène *Bdnf* pourrait être due aux changements induits par le BPA sur les DNMT, et potentiellement entraîner des effets plus globaux, à l'échelle du génome comme Kundakovic et collaborateurs l'ont déjà montré dans leur étude (Kundakovic et al. 2013). Ici encore, concernant l'impact du BPA, nous avons constaté un dimorphisme sexuel dans l'expression de *Dnmt1*, *Dnmt3a* et *Dnmt3b* avec une absence d'effet chez la femelle. Dans les cultures mâles, la répression des gènes *Dnmt* après exposition au BPA à 0,1 μM a été corrélée avec la diminution d'expression de *Bdnf*, mais aucune modification de méthylation de ce gène n'a été mise en évidence. Dans les données de la littérature, il est classiquement décrit qu'une augmentation de la méthylation de ce gène conduit à la diminution de son expression. Nos résultats doivent être complétés par l'analyse de l'activité des DNMT, qui pourrait ne pas suivre les variations de l'expression génique. En outre, il est possible qu'une diminution globale de leur activité et de la méthylation globale de l'ADN s'accompagne d'hyper-méthylations ciblées, en particulier au locus de *Bdnf*.

Concernant le MEHP, une courbe dose-réponse en U a été observée dans les cultures mâles sur l'expression de *Dnmt1* et *Dnmt3a*, avec une tendance à la diminution pour la concentration de 0,1 μM et à l'augmentation pour la concentration de 10 μM . Nous n'avons pas testé ces concentrations dans les cultures femelles et ne pouvons donc pas conclure quant à un possible dimorphisme sexuel. Des relations dose-réponse avec un tel profil non monotone ont déjà été décrites dans la littérature concernant l'impact de PE sur l'expression des *Dnmt*, mais les mécanismes qui induisent de telles réponses sont encore mal compris, ainsi que les conséquences de ces variations sur le rendement de méthylation (Kundakovic et al. 2013).

En conclusion, ces résultats sont encore très préliminaires et doivent être complétés en répétant ces expériences et en réalisant des études complémentaires (étude de l'activité des DNMT, études de méthylation globale et de méthylation ciblée par traitement au bisulfite couplé au pyroséquençage) pour apporter la preuve que l'exposition *in vitro* au BPA peut induire

une perturbation, spécifique du sexe, des voies de méthylation de l'ADN qui pourraient être à l'origine de changements épigénétiques persistants dans le cerveau. Néanmoins, la perturbation de l'expression des *Dnmt* dans notre étude par le BPA et le MEHP permet d'émettre l'hypothèse que ces mécanismes sont bien modulés *in vitro* après exposition à ces PE.

4.5 Mécanismes d'action possibles

Bien qu'il ait été montré *in vivo* et *in vitro* que le BPA agit comme un œstrogénomimétique, des études ont révélé que le BPA et l'œstradiol ne montrent pas toujours des effets identiques, puisque dans certaines études il a été montré que le BPA antagonise l'activité de l'œstradiol (Welshons et al. 2006). Plus récemment, des liaisons du BPA à d'autres récepteurs nucléaires ou membranaires ont été démontrées. Par exemple, des études ont établi un lien entre exposition au BPA et obésité (Somm et al. 2009; Rubin 2011; Braun et al. 2014). Ces effets pourraient être médiés par le récepteur PPAR γ (Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma). En effet, il a été montré que l'expression de *Pparg* était induite par le BPA (Kwintkiewicz et al. 2009). Plusieurs gènes impliqués dans la différenciation adipocytaire ainsi que *Pparg* lui-même sont sous le contrôle de ce récepteur.

Les cibles principales des phtalates parmi les récepteurs nucléaires sont les récepteurs PPAR α et γ (Desvergne et al. 2009). De plus, les phtalates sont des activateurs de faible affinité des récepteurs des œstrogènes (Ghisari et Bonefeld-Jorgensen 2009) et des anti-androgènes de très faible affinité *in vitro* (Krüger et al. 2008) et *in vivo* (Jarfelt et al. 2005). La perturbation endocrinienne par les phtalates semble donc être majoritairement due à leur activité d'agonistes des récepteurs PPAR (α et γ). L'effet majeur des phtalates pourrait être une inhibition de l'expression de l'aromatase (enzyme clé de la synthèse des œstrogènes) médiée majoritairement par l'intermédiaire des récepteurs PPAR. Cet effet anti-œstrogénique peut être partiellement compensé par l'activation des récepteurs aux œstrogènes et au contraire potentialisé par l'inhibition du récepteur des androgènes. Comme les phtalates ont une activité œstrogénique ou anti-androgénique faible et que le BPA exerce une faible activité œstrogénique, ils pourraient interférer avec les périodes de développement neuronal sensibles aux hormones, comme la différenciation neuronale, la croissance et la formation de synapses (Fox et al. 2012, Colborn, 2004).

Il est intéressant de constater que les cibles des phtalates sont, pour certaines, différentes de celles du BPA. Ce constat renforce l'hypothèse que la perturbation endocrinienne pourrait résulter de l'action d'un cocktail de molécules agissant sur de nombreuses cibles. Les phtalates sont considérés comme agissant essentiellement comme anti-androgènes, tandis que le BPA est étiqueté comme étant un agoniste des récepteurs aux œstrogènes. Leurs impacts sur la différenciation sexuelle du cerveau sont examinés et d'autres questions sont soulevées. Cependant, les deux PE produisent un spectre plus large d'effets sur la santé que ce qui serait extrapolé simplement à partir de leurs propriétés en tant qu'anti-androgènes et œstrogènes. En outre, les effets dose-dépendants non monotones et les effets trans-générationnels sous-tendus par des mécanismes épigénétiques rendent l'évaluation de leur toxicité encore plus complexe. Toutes ces facettes de la perturbation endocrinienne sont des pièces d'un puzzle qui met au défi les neurotoxicologues (Weiss 2012).

Concernant les effets de ces PE dans notre modèle, les mécanismes en jeu restent à décrypter, en particulier les récepteurs nucléaires qui pourraient être modulés et entraîner des modifications épigénétiques et des régulations transcriptionnelles. Par rapport aux études *in vivo*, les modèles *in vitro* tels que les cultures organotypiques utilisées ici présentent l'avantage de rendre les cellules cérébrales facilement accessibles aux agents pharmacologiques et aux molécules interférant avec les voies de toxicité des PE. Comme souligné plus haut, l'étude de la toxicité des PE de façon isolée pourrait constituer un préalable à l'analyse de leurs impacts en combinaison (effets « cocktail »), à l'image des mélanges auxquels sont effectivement exposés les fœtus et les enfants au cours de leur développement.

5 Conclusions et perspectives

A ce jour, la neurotoxicité développementale des PE est sous-évaluée en raison de la complexité et du manque d'efficacité des approches classiques (Smirnova 2014). En analysant l'impact du BPA et du MEHP sur plusieurs processus cellulaires impliqués dans le développement cérébral normal ou altéré, à savoir la myélinisation et la neuroinflammation ainsi que sur les altérations épigénétiques dans des cultures organotypiques, ces travaux s'inscrivent dans la mise au point d'une séquence expérimentale plus large d'évaluation de la neurotoxicité développementale des PE *in vitro*.

Ce projet pourrait contribuer à développer une méthodologie d'évaluation de la toxicité neurodéveloppementale des PE adaptée au criblage de multiples conditions d'exposition et à identifier de nouveaux mécanismes susceptibles de mener à un effet indésirable. De façon importante, l'identification de signatures épigénétiques, qui précèdent parfois de beaucoup l'apparition d'effets délétères, pourrait permettre d'augmenter la sensibilité des méthodes d'évaluation et d'identifier des biomarqueurs traduisant l'exposition aux PE. Cependant, ces méthodes *in vitro* doivent être envisagées comme une étape préliminaire ayant pour objectif de repérer des PE potentiellement toxiques. La neurotoxicité développementale devra, par la suite, être évaluée par des études *in vivo* qui pourraient être orientées par ces résultats dans le choix des conditions d'exposition et des voies de toxicité analysées. Ce projet pourrait ainsi contribuer à améliorer l'évaluation du risque lié aux PE.

6 Références

- Albert O, Desdoits-Lethimonier C, Lesné L, Legrand A, Guillé F, Bensalah K, et al. Paracetamol, aspirin and indomethacin display endocrine disrupting properties in the adult human testis in vitro. *Human Reproduction*. juill 2013;28(7):1890-8.
- Allis CD, Jenuwein T. The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nat Rev Genet*. août 2016;17(8):487-500.
- Bale TL. Epigenetic and transgenerational reprogramming of brain development. *Nature Reviews Neuroscience*. 29 avr 2015;16:332.
- Barakat R, Lin P-C, Park CJ, Best-Popescu C, Bakery HH, Abosalum ME, et al. Prenatal Exposure to DEHP Induces Neuronal Degeneration and Neurobehavioral Abnormalities in Adult Male Mice. 2018;32.
- Baumann N, Pham-Dinh D. Biology of Oligodendrocyte and Myelin in the Mammalian Central Nervous System. *Physiological Reviews*. avr 2001;81(2):871-927.
- Belarbi K, Rosi S. Modulation of adult-born neurons in the inflamed hippocampus. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2013;7.
- Bergman Å, United Nations Environment Programme, World Health Organization. State of the science of endocrine disrupting chemicals - 2012 an assessment of the state of the science of endocrine disruptors [Internet]. Geneva: WHO : UNEP; 2013 [cité 19 juin 2020]. Disponible sur: <http://www.who.int/ceh/publications/endocrine/en/index.html>
- Bergman JEH, Loane M, Vrijheid M, Pierini A, Nijman RJM, Addor M-C, et al. Epidemiology of hypospadias in Europe: a registry-based study. *World J Urol*. déc 2015;33(12):2159-67.
- Bird IM, Abbott DH. The hunt for a selective 17,20 lyase inhibitor; learning lessons from nature. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. oct 2016;163:136-46.
- Boulle F, van den Hove DLA, Jakob SB, Rutten BP, Hamon M, van Os J, et al. Epigenetic regulation of the BDNF gene: implications for psychiatric disorders. *Molecular Psychiatry*. juin 2012;17(6):584-96.
- Boyle CA, Boulet S, Schieve LA, Cohen RA, Blumberg SJ, Yeargin-Allsopp M, et al. Trends in the Prevalence of Developmental Disabilities in US Children, 1997–2008. *Pediatrics*. 1 juin 2011;127(6):1034.
- Braun JM. Early-life exposure to EDCs: role in childhood obesity and neurodevelopment. *Nature Reviews Endocrinology*. mars 2017;13(3):161-73.
- Braun JM, Kalkbrenner AE, Calafat AM, Yolton K, Ye X, Dietrich KN, et al. Impact of Early-Life Bisphenol A Exposure on Behavior and Executive Function in Children. *PEDIATRICS*. 1 nov 2011;128(5):873-82.

- Braun JM, Lanphear BP, Calafat AM, Deria S, Khoury J, Howe CJ, et al. Early-Life Bisphenol A Exposure and Child Body Mass Index: A Prospective Cohort Study. *Environmental Health Perspectives* [Internet]. 29 juill 2014 [cité 21 mai 2018]; Disponible sur: <http://ehp.niehs.nih.gov/1408258>
- Braun JM, Sathyanarayana S, Hauser R. Phthalate exposure and children's health: Current Opinion in Pediatrics. *avr* 2013;25(2):247-54.
- Caliman FA, Gavrilescu M. Pharmaceuticals, Personal Care Products and Endocrine Disrupting Agents in the Environment - A Review. *Clean Soil Air Water*. *avr* 2009;37(4-5):277-303.
- Casas M, Forns J, Martínez D, Avella-García C, Valvi D, Ballesteros-Gómez A, et al. Exposure to bisphenol A during pregnancy and child neuropsychological development in the INMA-Sabadell cohort. *Environmental Research*. *oct* 2015;142:671-9.
- Cavalli G, Heard E. Advances in epigenetics link genetics to the environment and disease. *Nature*. *juill* 2019;571(7766):489-99.
- Chen Q, Yan W, Duan E. Epigenetic inheritance of acquired traits through sperm RNAs and sperm RNA modifications. *Nat Rev Genet*. *déc* 2016;17(12):733-43.
- Chen T, Yang W, Li Y, Chen X, Xu S. Mono-(2-ethylhexyl) phthalate impairs neurodevelopment: Inhibition of proliferation and promotion of differentiation in PC12 cells. *Toxicology Letters*. *25 févr* 2011;201(1):34-41.
- Commission OSPAR. OSPAR Background Document on Phthalates. 2006 p. 81. Report No.: 270.
- Darde T. Identification et classification de composés reprotoxiques par des approches de toxicogénomique prédictive. [Rennes]: RENNES 1; 2017.
- Dean JM, Riddle A, Maire J, Hansen KD, Preston M, Barnes AP, et al. An organotypic slice culture model of chronic white matter injury with maturation arrest of oligodendrocyte progenitors. *Molecular Neurodegeneration*. *2011*;6(1):46.
- Desvergne B, Feige JN, Casals-Casas C. PPAR-mediated activity of phthalates: A link to the obesity epidemic? *Molecular and Cellular Endocrinology*. *25 mai* 2009;304(1-2):43-8.
- Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon J-P, Giudice LC, Hauser R, Prins GS, Soto AM, et al. Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocrine Reviews*. *juin* 2009;30(4):293-342.
- Eckersley-Maslin MA, Alda-Catalinas C, Reik W. Dynamics of the epigenetic landscape during the maternal-to-zygotic transition. *Nat Rev Mol Cell Biol*. *juill* 2018;19(7):436-50.
- Engel SM, Miodovnik A, Canfield RL, Zhu C, Silva MJ, Calafat AM, et al. Prenatal Phthalate Exposure Is Associated with Childhood Behavior and Executive Functioning. *Environmental Health Perspectives*. *28 janv* 2010;118(4):565-71.
- Ernfors P, KUCERA J, LEE' K-F, LORING' J, JAENISCH' R. Studies on the physiological role of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 in knockout mice. *1995*;9.

- Evans SF, Kobrosly RW, Barrett ES, Thurston SW, Calafat AM, Weiss B, et al. Prenatal bisphenol A exposure and maternally reported behavior in boys and girls. *NeuroToxicology*. déc 2014;45:91-9.
- Factor-Litvak P, Insel B, Calafat AM, Liu X, Perera F, Rauh VA, et al. Persistent Associations between Maternal Prenatal Exposure to Phthalates on Child IQ at Age 7 Years. *Carpenter DO, éditeur. PLoS ONE*. 10 déc 2014;9(12):e114003.
- Faulk C, Kim JH, Anderson OS, Nahar MS, Jones TR, Sartor MA, et al. Detection of differential DNA methylation in repetitive DNA of mice and humans perinatally exposed to bisphenol A. *Epigenetics*. 2 juill 2016;11(7):489-500.
- Feige JN, Gelman L, Rossi D, Zoete V, Métivier R, Tudor C, et al. The Endocrine Disruptor Monoethyl-hexyl-phthalate Is a Selective Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ Modulator That Promotes Adipogenesis. *Journal of Biological Chemistry*. 29 juin 2007;282(26):19152-66.
- Ferry L, Fournier A, Tsusaka T, Adelmant G, Shimazu T, Matano S, et al. Methylation of DNA Ligase 1 by G9a/GLP Recruits UHRF1 to Replicating DNA and Regulates DNA Methylation. *Molecular Cell*. août 2017;67(4):550-565.e5.
- Festuccia N, Gonzalez I, Owens N, Navarro P. Mitotic bookmarking in development and stem cells. *Development*. 15 oct 2017;144(20):3633-45.
- Feverly D, Peeters B, Lenders S, Spanoghe P. Adjustments of the Pesticide Risk Index Used in Environmental Policy in Flanders. *Corsi I, éditeur. PLoS ONE*. 5 juin 2015;10(6):e0129669.
- Flint S, Markle T, Thompson S, Wallace E. Bisphenol A exposure, effects, and policy: A wildlife perspective. *Journal of Environmental Management*. août 2012;104:19-34.
- Ganguly K, Schinder AF, Wong ST, Poo M. GABA Itself Promotes the Developmental Switch of Neuronal GABAergic Responses from Excitation to Inhibition. *Cell*. mai 2001;105(4):521-32.
- Gascon M, Valvi D, Fornis J, Casas M, Martínez D, Júlvez J, et al. Prenatal exposure to phthalates and neuropsychological development during childhood. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. août 2015;218(6):550-8.
- Ghisari M, Bonefeld-Jorgensen EC. Effects of plasticizers and their mixtures on estrogen receptor and thyroid hormone functions. *Toxicology Letters*. août 2009;189(1):67-77.
- Ghousari AM, Ibanez C, El-Etr M, Leclerc P, Eychenne B, O'Malley BW, et al. Progesterone and its metabolites increase myelin basic protein expression in organotypic slice cultures of rat cerebellum: Progesterone and CNS myelination. *Journal of Neurochemistry*. 28 juill 2003;86(4):848-59.
- Gore AC, Crews D, Doan LL, Merrill ML, Patisaul H, Zota A. INTRODUCTION TO ENDOCRINE DISRUPTING CHEMICALS (EDCs). 2014;76.
- Grandjean P, Landrigan PJ. Neurobehavioural effects of developmental toxicity. *The Lancet Neurology*. mars 2014;13(3):330-8.

- Greenberg ME, Xu B, Lu B, Hempstead BL. New Insights in the Biology of BDNF Synthesis and Release: Implications in CNS Function. *Journal of Neuroscience*. 14 oct 2009;29(41):12764-7.
- Hannas BR, Lambright CS, Furr J, Howdeshell KL, Wilson VS, Gray LE. Dose-Response Assessment of Fetal Testosterone Production and Gene Expression Levels in Rat Testes Following InUtero Exposure to Diethylhexyl Phthalate, Diisobutyl Phthalate, Diisooheptyl Phthalate, and Diisononyl Phthalate. *Toxicological Sciences*. sept 2011;123(1):206-16.
- Hörmanseder E, Simeone A, Allen GE, Bradshaw CR, Figlmüller M, Gurdon J, et al. H3K4 Methylation-Dependent Memory of Somatic Cell Identity Inhibits Reprogramming and Development of Nuclear Transfer Embryos. *Cell Stem Cell*. juill 2017;21(1):135-143.e6.
- Huang H-B, Chen H-Y, Su P-H, Huang P-C, Sun C-W, Wang C-J, et al. Fetal and Childhood Exposure to Phthalate Diesters and Cognitive Function in Children Up to 12 Years of Age: Taiwanese Maternal and Infant Cohort Study. Gonzalez-Bulnes A, éditeur. *PLOS ONE*. 29 juin 2015;10(6):e0131910.
- Humpel C. Organotypic brain slice cultures: A review. *Neuroscience*. oct 2015;305:86-98.
- INERIS A. Rapport d'étude : Le Bisphénol A. 2010 p. 23. Report No.: INERIS-DRC-10-109972-01125C.
- Inoue A, Jiang L, Lu F, Suzuki T, Zhang Y. Maternal H3K27me3 controls DNA methylation-independent imprinting. *Nature*. juill 2017;547(7664):419-24.
- 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. *Reproductive Toxicology*. avr 2005;19(4):505-15.
- Jones PA, Takai D. The Role of DNA Methylation in Mammalian Epigenetics. *Sciences*. 10 août 2011;293:1068-70.
- Kanherkar RR, Bhatia-Dey N, Csoka AB. Epigenetics across the human lifespan. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* [Internet]. 9 sept 2014 [cité 21 mai 2018];2. Disponible sur: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcell.2014.00049/abstract>
- Kavlock RJ, Daston GR, DeRosa C, Gray LE, Kaattari S, Lucier G, et al. Research Needs for the Risk Assessment of Health and Environmental Effects of Endocrine Disruptors: A Report of the U.S. EPA-sponsored Workshop. *Environmental Health Perspectives*. 1996;104:26.
- Kim, B. N. et al. Phthalates Exposure and Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder in School-Age Children. In: *Biological Psychiatry*. 2009. p. 903-86.
- Kitraki E, Nalvarte I, Alavian-Ghavanini A, Rüegg J. Developmental exposure to bisphenol A alters expression and DNA methylation of Fkbp5, an important regulator of the stress response. *Molecular and Cellular Endocrinology*. déc 2015;417:191-9.
- Knuesel et al. I. Maternal immune activation and abnormal brain development across CNS

- disorders. *Nature Reviews Neurology*. 14 nov 2014;(10):643-60.
- Kobayashi T, Surani MA. On the origin of the human germline. *Development*. 15 août 2018;145(16):dev150433.
- Kobrosly RW, Evans S, Miodovnik A, Barrett ES, Thurston SW, Calafat AM, et al. Prenatal Phthalate Exposures and Neurobehavioral Development Scores in Boys and Girls at 6-10 Years of Age. *Environmental Health Perspectives* [Internet]. 21 févr 2014 [cité 18 mai 2018]; Disponible sur: <http://ehp.niehs.nih.gov/1307063/>
- Kraft AD, Aschner M, Cory-Slechta DA, Bilbo SD, Caudle WM, Makris SL. Unmasking silent neurotoxicity following developmental exposure to environmental toxicants. *Neurotoxicology and Teratology*. mai 2016;55:38-44.
- Kraft AD, Harry GJ. Features of Microglia and Neuroinflammation Relevant to Environmental Exposure and Neurotoxicity. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 20 juill 2011;8(7):2980-3018.
- Krüger T, Long M, Bonefeld-Jørgensen EC. Plastic components affect the activation of the aryl hydrocarbon and the androgen receptor. *Toxicology*. avr 2008;246(2-3):112-23.
- Kundakovic M, Gudsnuk K, Franks B, Madrid J, Miller RL, Perera FP, et al. Sex-specific epigenetic disruption and behavioral changes following low-dose in utero bisphenol A exposure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 11 juin 2013;110(24):9956-61.
- Kundakovic M, Gudsnuk K, Herbstman JB, Tang D, Perera FP, Champagne FA. DNA methylation of BDNF as a biomarker of early-life adversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2 juin 2015;112(22):6807-13.
- Kundakovic M, Jaric I. The Epigenetic Link between Prenatal Adverse Environments and Neurodevelopmental Disorders. *Genes*. 18 mars 2017;8(3):104.
- Kwintkiewicz J, Nishi Y, Yanase T, Giudice LC. Peroxisome Proliferator Activated Receptor- γ Mediates Bisphenol A Inhibition of FSH-Stimulated IGF-1, Aromatase, and Estradiol in Human Granulosa Cells. *Environmental Health Perspectives*. 22 oct 2009;118(3):400-6.
- Lee Y-M, Kim K-S, Jacobs DR, Lee D-H. Persistent organic pollutants in adipose tissue should be considered in obesity research: Obesity and persistent organic pollutants. *Obesity Reviews*. févr 2017;18(2):129-39.
- Lehraiki A, Racine C, Krust A, Habert R, Levacher C. Phthalates Impair Germ Cell Number in the Mouse Fetal Testis by an Androgen- and Estrogen-Independent Mechanism. *Toxicological Sciences*. oct 2009;111(2):372-82.
- Li X, Xiao B, Chen X-S. DNA Methylation: a New Player in Multiple Sclerosis. *Molecular Neurobiology*. août 2017;54(6):4049-59.
- Liddelow SA, Guttenplan KA, Clarke LE, Bennett FC, Bohlen CJ, Schirmer L, et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*. janv 2017;541(7638):481-7.

- Lin H, Yuan K, Li L, Liu S, Li S, Hu G, et al. In Utero Exposure to Diethylhexyl Phthalate Affects Rat Brain Development: A Behavioral and Genomic Approach. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 28 oct 2015;12(11):13696-710.
- Liu X, Gao Q, Li P, Zhao Q, Zhang J, Li J, et al. UHRF1 targets DNMT1 for DNA methylation through cooperative binding of hemi-methylated DNA and methylated H3K9. *Nat Commun*. juin 2013;4(1):1563.
- MacKenzie S, Fernandez-Troy N, Espel E. Post-transcriptional regulation of TNF- α during in vitro differentiation of human monocytes/macrophages in primary culture. *Journal of Leukocyte Biology*. 2002;71:7.
- Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. 2002;7.
- Martinowich K, Manji H, Lu B. New insights into BDNF function in depression and anxiety. *Nature Neuroscience*. 28 août 2007;(10):1089-93.
- Mazaud-Guittot S, Nicolaz CN, Desdoits-Lethimonier C, Coiffec I, Maamar MB, Balaguer P, et al. Paracetamol, Aspirin, and Indomethacin Induce Endocrine Disturbances in the Human Fetal Testis Capable of Interfering With Testicular Descent. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1 nov 2013;98(11):E1757-67.
- Mesnage R, Defarge N, Spiroux de Vendômois J, Séralini GE. Potential toxic effects of glyphosate and its commercial formulations below regulatory limits. *Food and Chemical Toxicology*. oct 2015;84:133-53.
- Miodovnik A, Engel SM, Zhu C, Ye X, Soorya LV, Silva MJ, et al. Endocrine disruptors and childhood social impairment. *NeuroToxicology*. mars 2011;32(2):261-7.
- Miska EA, Ferguson-Smith AC. Transgenerational inheritance: Models and mechanisms of non-DNA sequence-based inheritance. *Science*. 7 oct 2016;354(6308):59-63.
- Moggs JG. The Role of Chromatin in Molecular Mechanisms of Toxicity. *Toxicological Sciences*. 31 mars 2004;80(2):218-24.
- Monfort N, Ventura R, Balcells G, Segura J. Determination of five di-(2-ethylhexyl)phthalate metabolites in urine by UPLC-MS/MS, markers of blood transfusion misuse in sports. *Journal of Chromatography B*. nov 2012;908:113-21.
- Müller MM, Fierz B, Bittova L, Liszczak G, Muir TW. A two-state activation mechanism controls the histone methyltransferase Suv39h1. *Nat Chem Biol*. mars 2016;12(3):188-93.
- Nassouri AS, Archambeaud F, Desaillood R. Endocrine disruptors: echoes of congress of Endocrinology in 2012. *Ann Endocrinol*. oct 2012;(73):36-44.
- Neniskyte U, Gross CT. Errant gardeners: glial-cell-dependent synaptic pruning and neurodevelopmental disorders. *Nature Reviews Neuroscience*. 21 sept 2017;18(11):658-70.

- Nesan D, Sewell LC, Kurrasch DM. Opening the black box of endocrine disruption of brain development: Lessons from the characterization of Bisphenol A. *Hormones and Behavior*. mai 2018;101:50-8.
- Nicoglou A, Merlin F. Epigenetics: A way to bridge the gap between biological fields. *Studies in History and Philosophy of Science Part C: Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences*. déc 2017;66:73-82.
- Noraberg J, Poulsen F, Blaabjerg M, Kristensen B, Bonde C, Montero M, et al. Organotypic Hippocampal Slice Cultures for Studies of Brain Damage, Neuroprotection and Neurorepair. *Current Drug Target -CNS & Neurological Disorders*. 1 août 2005;4(4):435-52.
- Ohja K, Gozal E, Fahnestock M, Cai L, Cai J, Freedman JH, et al. Neuroimmunologic and Neurotrophic Interactions in Autism Spectrum Disorders: Relationship to Neuroinflammation. *NeuroMolecular Medicine*. juin 2018;20(2):161-73.
- OMS. BISPHENOL A (BPA) - Current state of knowledge and future actions by WHO and FAO. *INFOSAN Information Note No 5/2009*. 27 nov 2009;
- Peckham H, Giuffrida L, Wood R, Gonsalvez D, Ferner A, Kilpatrick TJ, et al. Fyn is an Intermediate Kinase that BDNF Utilizes to Promote Oligodendrocyte Myelination. *Glia*. 2016;(64):255-69.
- Peijnenburg WJGM, Struijs J. Occurrence of phthalate esters in the environment of the Netherlands. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. févr 2006;63(2):204-15.
- Penman M, Banton M, Erler S, Moore N, Semmler K. Olefins and chemical regulation in Europe: REACH. *Chemico-Biological Interactions*. nov 2015;241:59-65.
- Perera F, Herbstman J. Prenatal environmental exposures, epigenetics, and disease. *Reproductive Toxicology*. avr 2011;31(3):363-73.
- Pozzi D, Menna E, Canzi A, Desiato G, Mantovani C, Matteoli M. The Communication Between the Immune and Nervous Systems: The Role of IL-1 β in Synaptopathies. *Frontiers in Molecular Neuroscience* [Internet]. 5 avr 2018 [cité 24 mai 2018];11. Disponible sur: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnmol.2018.00111/full>
- van Ravenzwaay B, Kolle SN, Ramirez T, Kamp HG. Vinclozolin: A case study on the identification of endocrine active substances in the past and a future perspective. *Toxicology Letters*. déc 2013;223(3):271-9.
- Reik W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature*. 24 mai 2007;447(7143):425-32.
- Reinberg D, Vales LD. Chromatin domains rich in inheritance. *Science*. 6 juill 2018;361(6397):33-4.
- da Rocha ST, Heard E. Novel players in X inactivation: insights into Xist-mediated gene silencing and chromosome conformation. *Nat Struct Mol Biol*. mars 2017;24(3):197-204.

- Rochester JR, Bolden AL. Bisphenol S and F: A Systematic Review and Comparison of the Hormonal Activity of Bisphenol A Substitutes. *Environmental Health Perspectives* [Internet]. 16 mars 2015 [cité 21 mai 2018]; Disponible sur: <http://ehp.niehs.nih.gov/1408989>
- Rubin BS. Bisphenol A: An endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. oct 2011;127(1-2):27-34.
- Schettler T. Human exposure to phthalates via consumer products. *International Journal of Andrology*. févr 2006;29(1):134-9.
- Schuettengruber B, Bourbon H-M, Di Croce L, Cavalli G. Genome Regulation by Polycomb and Trithorax: 70 Years and Counting. *Cell*. sept 2017;171(1):34-57.
- Sharma U, Rando OJ. Metabolic Inputs into the Epigenome. *Cell Metabolism*. mars 2017;25(3):544-58.
- Sheikh IA, Yasir M, Abu-Elmagd M, Dar TA, Abuzenadah AM, Damanhour GA, et al. Human sex hormone-binding globulin as a potential target of alternate plasticizers: an in silico study. *BMC Struct Biol*. sept 2016;16(S1):15.
- Shevell M. Present conceptualization of early childhood neurodevelopmental disabilities. *J Child Neurol*. 2010;(25):120-6.
- Singh S, Li SS-L. Epigenetic Effects of Environmental Chemicals Bisphenol A and Phthalates. *International Journal of Molecular Sciences*. 15 août 2012;13(8):10143-53.
- Smirnova L. Developmental neurotoxicity – Challenges in the 21st Century and In Vitro Opportunities. *ALTEX* [Internet]. 2014 [cité 17 mai 2018]; Disponible sur: <http://www.altex.org/index.php/altex/article/view/314>
- Smith CA, Holahan MR. Reduced Hippocampal Dendritic Spine Density and BDNF Expression following Acute Postnatal Exposure to Di(2-Ethylhexyl) Phthalate in Male Long Evans Rats. McCormick C, éditeur. *PLoS ONE*. 8 oct 2014;9(10):e109522.
- Somm E, Schwitzgebel VM, Toulotte A, Cederroth CR, Combescure C, Nef S, et al. Perinatal Exposure to Bisphenol A Alters Early Adipogenesis in the Rat. *Environmental Health Perspectives*. oct 2009;117(10):1549-55.
- Srivastava D, DeWitt N. In Vivo Cellular Reprogramming: The Next Generation. *Cell*. sept 2016;166(6):1386-96.
- Sun H, Xu L-C, Chen J-F, Song L, Wang X-R. Effect of bisphenol A, tetrachlorobisphenol A and pentachlorophenol on the transcriptional activities of androgen receptor-mediated reporter gene. *Food and Chemical Toxicology*. nov 2006;44(11):1916-21.
- Tischler J, Gruhn WH, Reid J, Allgeyer E, Buettner F, Marr C, et al. Metabolic regulation of pluripotency and germ cell fate through α -ketoglutarate. *EMBO J* [Internet]. janv 2019 [cité 18 juin 2020];38(1). Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.15252/embj.201899518>
- Vabre P, Gatimel N, Moreau J, Gayrard V, Picard-Hagen N, Parinaud J, et al. Environmental

- pollutants, a possible etiology for premature ovarian insufficiency: a narrative review of animal and human data. *Environ Health*. déc 2017;16(1):37.
- Vandenberg LN, Blumberg B, Antoniou MN, Benbrook CM, Carroll L, Colborn T, et al. Is it time to reassess current safety standards for glyphosate-based herbicides? *J Epidemiol Community Health*. juin 2017;71(6):613-8.
- Vineis P, Chatziioannou A, Cunliffe VT, Flanagan JM, Hanson M, Kirsch-Volders M, et al. Epigenetic memory in response to environmental stressors. *The FASEB Journal*. 9 mars 2017;
- Volpe JJ, Kinney HC, Jensen FE, Rosenberg PA. The developing oligodendrocyte: key cellular target in brain injury in the premature infant. *International Journal of Developmental Neuroscience*. juin 2011;29(4):423-40.
- Waddington CH. The Epigenotype. *Int J Epidemiol*. févr 2012;41(1):10-3.
- Wan G, Fields BD, Spracklin G, Shukla A, Phillips CM, Kennedy S. Spatiotemporal regulation of liquid-like condensates in epigenetic inheritance. *Nature*. mai 2018;557(7707):679-83.
- Waring RH, Harris RM. Endocrine disrupters: A human risk? *Molecular and Cellular Endocrinology*. déc 2005;244(1-2):2-9.
- Weiss B. The intersection of neurotoxicology and endocrine disruption. *NeuroToxicology*. déc 2012;33(6):1410-9.
- Welshons WV, Nagel SC, vom Saal FS. Large Effects from Small Exposures. III. Endocrine Mechanisms Mediating Effects of Bisphenol A at Levels of Human Exposure. *Endocrinology*. juin 2006;147(6):s56-69.
- Whyatt RM, Liu X, Rauh VA, Calafat AM, Just AC, Hoepner L, et al. Maternal Prenatal Urinary Phthalate Metabolite Concentrations and Child Mental, Psychomotor, and Behavioral Development at 3 Years of Age. *Environmental Health Perspectives*. 6 sept 2011;120(2):290-5.
- Win-Shwe T-T, Yanagisawa R, Koike E, Nitta H, Takano H. Expression levels of neuroimmune biomarkers in hypothalamus of allergic mice after phthalate exposure: Phthalates and neuroimmune biomarkers. *Journal of Applied Toxicology*. oct 2013;33(10):1070-8.
- Wolff JJ, Gu H, Gerig G, Elison JT, Styner M, Gouttard S, et al. Differences in White Matter Fiber Tract Development Present From 6 to 24 Months in Infants With Autism. *American Journal of Psychiatry*. juin 2012;169(6):589-600.
- World Health Organization. Possible developmental early effects of endocrine disrupters on child health. In 2012 [cité 18 mai 2018]. Disponible sur: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/75342/9789241503761_eng.pdf;jsessionid=97289DBF0386438CB35D78BB089C4666?sequence=1
- Yeo M, Berglund K, Hanna M, Guo JU, Kittur J, Torres MD, et al. Bisphenol A delays the perinatal chloride shift in cortical neurons by epigenetic effects on the *Kcc2* promoter. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 12 mars 2013;110(11):4315-20.

Yokota H, IWANO H, ENDO M, KOBAYASHI T, INOUE H, IKUSHIRO S, et al. Glucuronidation of the environmental oestrogen bisphenol A by an isoform of UDP-glucuronosyltransferase, UGT2B1, in the rat liver. 1999;5.

Yu C, Gan H, Serra-Cardona A, Zhang L, Gan S, Sharma S, et al. A mechanism for preventing asymmetric histone segregation onto replicating DNA strands. *Science*. 28 sept 2018;361(6409):1386-9.

Sites Internet

(1) Les troubles neurodéveloppementaux. In Anpeip. *Anpeip* [en ligne]. Anpeip, 2020 [consulté le 10 juillet 2020]. Disponible sur : <http://www.anpeip.org/men-dys-et-hp/1055-art-les-troubles-neuro-developpementaux>

(2) Retard de croissance intra-utérin : Mieux naître pour mieux vivre grâce aux progrès de la recherche. Dossier de presse, 22 mai 2014. In FONDATION PREMUP. *Fondation Premup* [en ligne]. Fondation Premup, 2014 [consulté le 18 mai 2018]. Disponible sur : <https://www.premup.org/media/>

(3) CHARLES, M.-A. & JUNIEN, C. Les origines développementales de la santé (DOHAD) et l'épigénétique : une révolution pour la prévention des maladies chroniques chez l'adulte. In IReSP. *IReSP* [en ligne]. IReSP, septembre 2012 [consulté le 18 mai 2018]. Disponible sur : http://www.iresp.net/iresp/files/2013/04/120925150459_qspn-18-dohad.pdf

(4) SAJIDI, M. Rapport 2013 : Situation de l'autisme en France. In VAINCRE L'AUTISME. *Vaincre l'autisme* [en ligne]. Vaincre l'autisme, 2011 [consulté le 30 avril 2020]. Disponible sur : <http://www.vaincrelautisme.org/content/rapport-2013-situation-de-l-autisme-en-france>

(5) Isabelle Hanne, Coralie Schaub, BIG et Estelle Pattée : Perturbateurs endocriniens : urgence sanitaire dans nos placards. In Libération. *Libération* [en ligne]. Libération, 27 février 2017 [consulté le 10 juillet 2020]. Disponible sur : https://www.liberation.fr/planete/2017/02/27/perturbateurs-endocriniens-urgence-sanitaire-dans-nos-placards_1551518

(6) Etude du potentiel cancérigène du glyphosate : L'Anses annonce la sélection des équipes scientifiques retenues pour conduire les études toxicologiques complémentaires. In ANSES. Anses [en ligne]. Anses, 2020 [consulté le 6 juin 2020]. Disponible sur : <https://www.anses.fr/fr/content/etude-du-potentiel-cancérogène-du-glyphosate-l'anses-annonce-la-sélection-des-équipes-0>

(7) MSC unanimously agrees that Bisphenol A is an endocrine disruptor (ECHA/PR/17/12). In EUROPEAN CHEMICAL AGENCY. *ECHA* [en ligne]. ECHA, 2017 [consulté le 18 mai 2018]. Disponible sur : <https://echa.europa.eu/fr/-/msc-unanimously-agrees-that-bisphenol-a-is-an-endocrine-disruptor>

(8) Questions sociales et santé : Utilisation du bisphénol A dans les matériaux en matière plastique entrant en contact avec des denrées alimentaires-Texte E 12498 déposé au Sénat le 3/11/2017. In SENAT. *Sénat* [en ligne]. Sénat, 2017 [consulté le 18 mai 2018]. Disponible sur : <http://www.senat.fr/ue/pac/EUR000003633.html>

(9) Quantikine® Colorimetric Sandwich ELISA Assay Principle. In R&D SYSTEMS. *R&D Systems* [en ligne]. R&D Systems [consulté le 17 mai 2018]. Disponible sur : <https://www.rndsystems.com/products/quantikine-colorimetric-sandwich-elisa-assay-principle>

7 Annexes

7.1 Annexe 1 : Principaux supports de l'information épignétique

7.1.1 Composants de l'hétérochromatine

L'hétérochromatine péricentrique contient un grand nombre de protéines, mais sa caractéristique la plus distinctive est la présence de domaines d'ADN répétitifs de la taille d'une mégabase recouverts d'une marque de triméthylation d'histone H3K9 spécifique, qui est déposée par les enzymes SUV39 et SETDB1. Cette marque est liée au domaine chromo de SUV39H1, qui stimule l'activité catalytique de l'enzyme (Müller et al. 2016). Par conséquent, les composants de l'hétérochromatine peuvent à la fois écrire et lire la marque H3K9me3 et compacter leur chromatine cible. Les facteurs d'hétérochromatine collaborent également avec l'ARNi dans les plantes, les levures et certains animaux pour transmettre l'héritité épigénétique.

7.1.2 Protéines polycomb

Les premières études génétiques ont classé Polycomb (PcG) et Trithorax en deux groupes antagonistes qui maintiennent la mémoire des modèles spatiaux d'expression des gènes homéotiques tout au long du développement. Ces complexes jouent également un rôle clé dans le maintien d'états d'expression programmés sur le plan du développement ou de l'environnement, tels que l'inactivation des chromosomes X ou la vernalisation induite par le froid dans les plantes. Les protéines PcG se trouvent dans deux classes principales de complexes - PRC2 et PRC1 - qui sont responsables du dépôt des marques H3K27me3 et H2AK119Ub. Les protéines PcG peuvent être recrutées dans des régions spécifiques du génome par des protéines de liaison à l'ADN ou des ARN non codants. Les complexes PRC2 contiennent un « writer », l'enzyme histone méthyltransférase EZH2 (ou son paralogue moins efficace EZH1), et un « reader », la sous-unité EED. Semblables à HP1, les sous-unités CBX des complexes PRC1

contiennent un chromodomaine qui reconnaît spécifiquement H3K27me3 (Schuettengruber et al. 2017).

7.1.3 ARN non codants

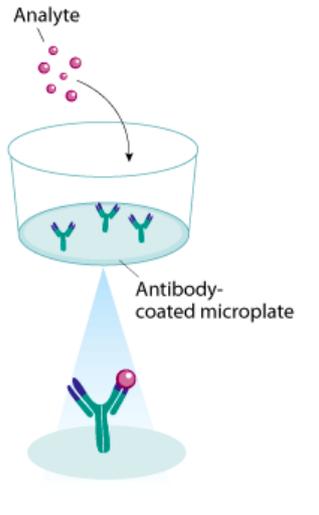
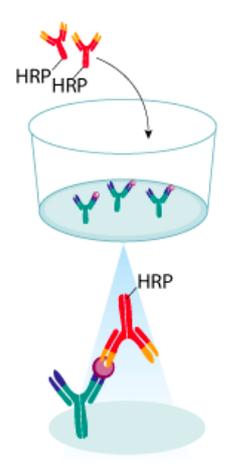
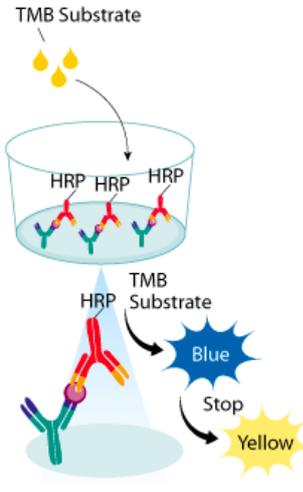
Les ARN non codants (ARNnc) appartiennent à plusieurs classes, et ni leur production ni leurs fonctions ne peuvent être généralisées. De nombreux ARNc, tels que les microARN, régulent les processus post-transcriptionnels, tandis que d'autres sont impliqués dans la régulation transcriptionnelle. Les ARN courts non codants, tels que les ARN courts interférents (siARN) et les ARN interagissant avec PIWI (piARN), sont plus courts que 30 nucléotides, tandis que les ARN longs non codants (ARNnc) varient en taille (jusqu'à plus de 100 kilobases). Le mieux caractérisé de ceux-ci est probablement le transcrit spécifique X-inactif (da Rocha et Heard 2017). De nombreux ARNc courts agissent à l'intérieur ou à l'extérieur de la chromatine, et certains, par exemple les siARN et les fragments d'ARNt, peuvent diffuser extracellulairement (Sharma et Rando 2017), tandis que de nombreux ARNnc nucléaires sont associés à la chromatine. Les ARN activateurs peuvent activer les gènes, mais la plupart des ARNc courts et longs sont répressifs, agissent via la chromatine (H3K9me3, Polycomb) ou la méthylation de l'ADN (da Rocha et Heard 2017), et peuvent induire une mémoire épigénétique en construisant des boucles avec l'hétérochromatine ou la machinerie des ARN interférents. Ils sont également impliqués dans la régulation de l'architecture de la chromatine d'ordre supérieur.

7.1.4 Méthylation de l'ADN

Les mécanismes qui permettent à la méthylation de l'ADN d'être copiée pendant la réplication de l'ADN représentent l'un des systèmes épigénétiques les mieux compris et impliquent des protéines spécifiques qui reconnaissent les sites CpG de l'ADN hémi-méthylé et redéposent ainsi la méthylation de l'ADN sur l'ADN nouvellement répliqué. La méthylation de l'ADN est maintenue par l'ADN méthyltransférase DNMT1 et son partenaire UHRF1 (également connu sous le nom de NP95), qui se lie spécifiquement à l'ADN hémiméthylé et stimule DNMT1 via son activité d'ubiquitine ligase. Par conséquent, un seul complexe contient à la fois le « writer » et le « reader » de la marque épigénétique CpG méthylé, et les deux

fractions sont essentielles pour le maintien de la méthylation de l'ADN (Kundakovic et Jaric 2017).

7.2 Annexe 2 : Principe du dosage enzymatique en sandwich ELISA

Etape 1	Etape 2	Etape 3
 <p>Analyte</p> <p>Antibody-coated microplate</p>	 <p>HRP</p> <p>HRP</p> <p>HRP</p>	 <p>TMB Substrate</p> <p>HRP</p> <p>HRP</p> <p>HRP</p> <p>TMB Substrate</p> <p>HRP</p> <p>Blue</p> <p>Stop</p> <p>Yellow</p>
<p>Une microplaque pré-enduite d'anticorps de capture est fournie. Des échantillons ou des standards sont ajoutés et tout analyte présent est lié par l'anticorps immobilisé. Les matériaux non liés sont emportés.</p>	<p>Un second anticorps marqué par HRP (anticorps de détection) est ajouté et se lie à l'analyte capturé. L'anticorps de détection non lié est éliminé par lavage.</p>	<p>Une solution de substrat de tétraméthylbenzidine (TMB) est ajoutée aux puits et une couleur bleue se développe proportionnellement à la quantité d'analyte présente dans l'échantillon. Le développement de la couleur est stoppé, transformant la couleur dans les puits en jaune. L'absorbance de la couleur est mesurée à 450 nm.</p>
<p>Légende :</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>Analyte</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Capture Antibody</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>HRP HRP-conjugated Detection Antibody</p> </div> </div>		

Titre : Évaluation de la toxicité des perturbateurs endocriniens dans le cerveau en développement : impacts cellulaires et épigénétiques.

Résumé : Les perturbateurs endocriniens (PE) sont suspectés de contribuer à l'apparition de troubles neurodéveloppementaux. Afin d'améliorer la compréhension des mécanismes de toxicité des PE dans le cerveau immature et d'en identifier des biomarqueurs, des cultures organotypiques de sections cérébrales de souriceaux des deux sexes ont été traitées pendant 5 jours par deux PE répandus, le bisphénol A (BPA) et le mono(2-ethylhexyl)phthalate (MEHP). Nous montrons que l'expression de *Bdnf* et de *Kcc2*, analysée par RT-PCR quantitative, n'est réprimée par le BPA (0,1 µM) que dans les cultures issues de souriceaux mâles. Ce dimorphisme sexuel, déjà décrit *in vivo*, soutient la validité du modèle. Par ailleurs, le MEHP (10 µM) module l'expression d'une cytokine pro-inflammatoire et d'un marqueur de myélinisation. L'expression des *Dnmt* (DNA méthyltransférases) est également perturbée, mais sans modification de la méthylation du locus *Bdnf*. En tant que signatures moléculaires des expositions précoces, les altérations épigénétiques pourraient aider à comprendre les effets retardés des PE. A plus long terme, ce projet pourrait permettre d'établir une méthode adaptée au criblage *in vitro* de conditions d'exposition variées, en préalable à des études de toxicité *in vivo* ciblées, contribuant ainsi à améliorer l'évaluation du risque lié aux PE.

Mots Clés : Perturbateurs endocriniens, bisphénol A, phtalates, troubles neurodéveloppementaux, épigénétiques, biomarqueurs, cultures organotypiques, cerveau.

Title : Assessment of the toxicity of endocrine disruptors during the neurodevelopment : cellular and epigenetic impacts.

Abstract : Endocrine disruptors (EDs) are suspected to be involved in the development of neurodevelopmental disorders. To improve our understanding of their toxicity mechanisms in the immature brain and to identify biomarkers, organotypic cultures of brain sections from both sexes were treated for 5 days with two widespread EDs, bisphenol A (BPA) and mono (2-ethylhexyl) phthalate (MEHP). We show that *Bdnf* and *Kcc2* expressions, analyzed by quantitative RT-PCR, are repressed by BPA (0.1 µM) in cultures derived from male mice only. This sexual dimorphism, already described *in vivo*, supports the validity of our model. In addition, MEHP (10 µM) modulates the expression of a pro-inflammatory cytokine and a myelination marker. The expression of *Dnmt* (DNA methyltransferases) is also disturbed, without any modification of methylation at the *Bdnf* locus. As molecular signatures of early exposures, epigenetic alterations may help understanding the delayed effects of EDs. Ultimately, this project could provide a suitable method for *in vitro* screening of various exposure conditions that would be a prerequisite for targeted *in vivo* toxicity studies, thus contributing to improved risk assessment related to EDs.

Keywords : Endocrine disruptors, bisphenol A, phthalates, neurodevelopmental disorders, epigenetics, biomarkers, organotypic cultures, brain.