



HAL
open science

Xéno-hormones et homéostasie buccale : impact sur les perceptions gustatives et les glandes salivaires

Mireille Folia

► **To cite this version:**

Mireille Folia. Xéno-hormones et homéostasie buccale : impact sur les perceptions gustatives et les glandes salivaires. Médecine humaine et pathologie. Université de Bourgogne, 2012. Français. NNT : 2012DIJOS073 . tel-00905906

HAL Id: tel-00905906

<https://theses.hal.science/tel-00905906v1>

Submitted on 18 Nov 2013

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.

UNIVERSITE DE BOURGOGNE

Ecole Doctorale Environnement-Santé-STIC

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BOURGOGNE

En

SCIENCES DE LA VIE

Mireille FOLIA

Le 5 Décembre 2012

Xéno-hormones et homéostasie buccale : Impact sur les préférences gustatives et les glandes salivaires

Directeur de thèse : Marie-Chantal CANIVENC-LAVIER

Co-directeur de thèse : Yves ARTUR

Jacques AUGER

Ariane BERDAL

Jean-Pierre CRAVEDI

Yves ARTUR

Marie-Chantal CANIVENC-LAVIER

Président du jury

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Remerciements

Ce mémoire conclut trois ans de travail, je tiens en ces quelques lignes à exprimer ma reconnaissance envers tous ceux qui de près ou de loin y ont contribué.

Je tiens à remercier tout d'abord mes directeur et co-directeur de thèse.

Merci en premier lieu à Marie-Chantal Canivenc qui m'a accueillie dans son unité, m'a encadrée et initiée au monde de la recherche scientifique. Merci d'avoir accepté un thésard de plus dans ton emploi du temps déjà surchargé. Merci pour la qualité de tes conseils et pour ton investissement.

Merci à Yves Artur d'avoir accepté d'être dans ce jury. Merci de m'avoir présenté Marie-Chantal et donné vos conseils lors de mes différents comités de thèse et de votre relecture de ma thèse.

Merci à Madame Berdal et à Monsieur Cravedi pour avoir accepté de rapporter mon document de thèse et avoir apporté leur regard sur mon travail.

Merci au Docteur Auger d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse.

Je remercie tous les membres de l'INRA qui m'ont si bien accueillie et plus particulièrement ceux avec qui j'ai travaillé :

Merci à Franck Ménétrier qui m'a beaucoup appris sur les finesses de l'histologie. Merci de ta disponibilité, de ton aide et de ton soutien moral.

Merci à Catherine Desmetz pour ton aide. Tu m'as permis de mieux comprendre le monde obscur de la PCR. Merci pour ta bonne humeur. Merci aussi à Céline Tiffon.

Merci à Raymond Berges de m'avoir accueillie à l'animalerie et pour son aide dans les statistiques et dans les dissections. Merci à son équipe et plus particulièrement à Bruno pour la mise au point du xanthane, Laurence pour son aide lors des dissections et Elise qui s'est si bien occupée de mes petits rats.

Merci à Wided et Sofiane mes compagnons de thèse et plus particulièrement à Sofiane qui m'a donné plusieurs coups de mains dans mes manipulations, tu as été mon compagnon de « galère »...et c'est parfois bon de ne pas se sentir seule...

Merci à Monsieur Romanet d'avoir accepté de faire partie de mon comité de thèse. Merci à Madame Ferry pour ces précieuses idées et conseils donnés lors des comités.

A mes collègues et au personnel du service d'ORL du CHU de Dijon qui ont supporté mes absences et mes très légères sautes d'humeur....

Merci à la région Bourgogne pour sa subvention permettant la réalisation de ce travail.

A ma famille.....

A mes parents, merci d'avoir toujours été
là pour moi, je vous aime

A Bruno, Sandrine et bébé Océane

A la mémoire de mes grands parents

A Einstein mon fidèle compagnon

A mes amis.....

Résumé

L'homéostasie buccale conditionne fortement les perceptions gustatives ; elle repose sur un épithélium buccal sain et le bon fonctionnement des glandes salivaires, qui sont finement régulés par hormones sexuelles. Le but de cette thèse était de savoir si une exposition orale en bisphénol A, un migrant d'emballage alimentaire et de composites dentaires, et une alimentation riche en phyto-œstrogènes (soja) pouvaient modifier l'homéostasie buccale.

Deux expérimentations ont été conduites : une étude dose-effet du BPA (5µg à 12,5 mg/kj/j) chez le rat adulte, et une étude d'interaction d'un régime riche en soja sur les effets du BPA.

Sur la base de tests gustatifs et d'une approche histologique et moléculaire (qPCR-TR), la première étude identifie pour la première fois une action du BPA sur la sècheresse buccale. Nous avons constaté que le BPA était responsable d'une moindre consommation d'eau ($p < 0.01$), d'une préférence augmentée au sel ($p < 0.05$) et diminué au sucre ($p < 0.05$), et d'une altération des sécrétions salivaires. Une réversibilité partielle des effets à l'arrêt du traitement. A contrario un régime riche en phyto-œstrogène augmente la prise d'eau ($p < 10^{-6}$) et diminue la préférence au sel ($p < 0.05$) par rapport à un régime semi-synthétique, et peut s'opposer aux effets du BPA.

Ces études montrent que BPA et phyto-œstrogènes exercent des effets œstrogéniques agonistes ou antagonistes en fonction de la cible biologique considérée, et qu'un régime à base de soja peut gommer la plupart des effets observés.

Mots clés : Perturbateurs endocriniens, Homéostasie buccale, glandes salivaires, EGF, Gustine, Amylase, Mucine, Préférences gustatives, Comportement alimentaire, soif.

Abstract :

Oral homeostasis strongly influences taste perceptions. It depends on a healthy oral epithelium and salivary gland secretions, which are both regulated by sex hormones. The aim of this thesis was to identify the effect of an oral exposure to Bisphenol A, a food packaging and dental sealer component, and of a soy-diet containing phytoestrogens on oral homeostasis. Two experiments were conducted in adult rats: a dose-response study of BPA (5 μ g 12.5 mg / kj / day), and a study about the impact of a soy-diet on the BPA disrupting effects. By using gustation choice tests, and histological and qPCR-TR molecular approach, we identify for the first time an action of BPA on dry mouth. We found that BPA reduced water consumption (p <0.01), increased salt intake (p <0.05) and decreased sugar intake (p <0.05), and also modulated salivary secretions. These effects were partially reversed by stopping oral exposure. In contrast, the soy-diet increased water intake (p <10⁻⁶) and decreased in salt preference (p <0.05) by comparing to the semi-synthetic diet did, and may correct the effects of BPA.

These studies show that BPA and phytoestrogens exert agonist or antagonist estrogenic effects depending on the biological target, and that a soy-based diet can erase most of the observed BPA effects.

Keywords: Endocrine Disruptors, Homeostasis mouth, salivary glands, EGF, gustine, amylase, mucin, taste preferences, food behavior, thirst.

Tableaux

Tableau 1 : concentrations ioniques dans la salive

Tableau 2 : composition organique de la salive

Tableau 3 : hormones ou hormones like isolées dans les glandes salivaires

Tableau 4 : schéma simplifié des récepteurs androgènes (AR), des récepteurs d'œstrogènes (ER- α et ER- β) et des récepteurs de la progestérone (PR) dans les glandes salivaires de l'homme.

Tableau 5 : effets du traitement hormonal substitutif sur les glandes salivaires et la flore bactérienne orale

Tableau 6 : contrôle endocrinien de la salivation

Tableau 7 : étiologies médicamenteuses de l'hyposialie : principales classes

Tableau 8 : localisation des hormones ou neuropeptides dans les cellules gustatives

Tableau 9 : médicaments responsables de troubles du goût

Tableau 10 : les différentes hormones et leurs fonctions principales

Tableau 11 : catégorie de perturbateurs endocriniens

Tableau 12: les différentes catégories de phyto-œstrogènes

Tableau 13 : plantes sources de phyto-œstrogènes

Tableau 14 : quantité d'isoflavones ingérées par différentes populations

Tableau 15: concentration de génistéine dans le sang, l'urine, la salive en fonction de l'alimentation chez les nourrissons

Tableau 16 : effets œstrogénique de la génistéine

Tableau 17 : propriétés physico-chimiques du BPA

Tableau 18: comparaison des taux urinaires de BPA

Tableau 19: comparaison des taux sanguin

Tableau 20 : concentration salivaire de BPA

Tableau 21: histologie : étapes de déshydratation

Tableau 22 : présentation des différentes amorces

Photos

Photo 1 : glandes salivaires du rat

Photo 2 : histologie de glandes parotide, submandibulaire et sublinguale de rat et chez l'homme.

Photo3 : marquage de l'épithélium buccal par ER α (A) et ER β (B)

Photo 4: sacrifice : a) anesthésie puis b) repérage de l'aorte abdominale et c) exsanguination du rat par ponction de l'aorte abdominale

Photo 5 : luxation de la mâchoire inférieure et prélèvement de la muqueuse jugale

Photo 6 : glande sublinguale (GSL) et la glande submandibulaire (GSM)

Photo 7 : station de déshydratation

Photo 8 : Station d'enrobage

Photo 9 : matériels nécessaires pour la découpe des blocs et la lecture des lames

Photo 10 : effets du BPA sur l'épithélium buccal.

Photo 11 : effets de l'exposition au BPA sur les glandes submandibulaires

Photo12 : effets de l'exposition au BPA sur l'histologie des glandes sublinguales

Photo13 : effet de l'exposition au BPA sur l'histologie des glandes parotides

Figures

Figure 1 : rôles de la salive

Figure 2 : anatomie des glandes salivaires majeures chez l'homme

Figure 3 : histologie de l'adénomère

Figure 4 : contrôle neurologique : reflex salivaire conditionné

Figure 5 : variations qualitatives et quantitatives de la composition de salive en protéines avec l'âge, chez l'homme

Figure 6 : la muqueuse buccale : localisation chez l'homme et le rat

Figure 7 : la muqueuse buccale non spécialisée: schéma des différentes couches observées surcoupe histologique

Figure 8 : schéma d'une coupe histologique de l'épithélium buccal

Figure 9 : localisation des papilles gustatives sur la langue et aspects histologiques des différentes papilles gustatives de la langue

Figure 10 : bourgeons du goût d'après Pruves : aspects histologiques d'une papille

Figure 11 : canaux (Na^+ et H^+) et récepteurs des différentes perceptions gustatives

Figure 12 : anatomie du système gustatif chez la souris. Localisation et innervation des papilles gustatives et B) mécanismes déclenchant un potentiel d'action neuronal responsable de la perception du goût

Figure 13 : différents modes d'action des hormones

Figure 14 : biosynthèses des hormones stéroïdiennes

Figure 15: mécanisme général d'action des hormones

Figure 16 : mécanismes cellulaires d'action des hormones via les récepteurs nucléaire

Figure 17 : action génomique et non génomique

Figure 18 : répartition des récepteurs aux œstrogènes

Figure 19 : modes d'action agoniste et antagoniste par interaction directe avec le récepteur hormonal

Figure 20 : les différentes relations dose-effets

Figure 21: principaux phyto-œstrogènes et leurs structures moléculaires

Figure 22 : absorption et métabolisation de la daidzéine

Figure 23 : formule chimique du BPA

Figure 24 : principales étapes de l'étude histologique des glandes salivaires

Figure 25 : protocole expérimental pour l'analyse de l'expression des ARNm dans les glandes salivaires

Figure 26 : puce pour l'Experion™ et résultat type : profil et électrophorégramme (gel virtuel)

Figure 27 : mode d'action d'agent intercalant type SYBR® Green I

Figure 28 : courbe théorique de l'intensité du signal émis en fonction du nombre de cycles lors d'une PCR temps réel

Figure 29 : courbe de fusion : dérivée première de la fluorescence en fonction de la température

Figure 30 : courbe standard

Figure 31 : effets du BPA sur la consommation d'eau et sur la consommation de croquettes

Figure 32 : préférences gustatives pendant la période d'exposition au BPA

Figure 33 : préférences gustatives après la période d'exposition au BPA

Figure 34 : poids des organes et glycémie des rats exposés au BPA

Figure 35 : étude de réversibilité : poids des organes et glycémie

Figure 36 : effet du BPA sur la concentration sérique d'EGF pendant la période d'exposition (a) et après la phase de réversibilité (b)

Figure 37: étude de l'impact du BPA sur l'histologie de l'épithélium buccal

Figure 38: étude de l'effet du BPA sur les structures histologiques de la glande salivaire submandibulaire

Figure 39 : étude de réversibilité sur l'histologie de la glande submandibulaire

Figure 40: étude de l'impact de l'exposition au BPA sur l'histologie de la glande sublinguale

Figure 41: impact de l'exposition au BPA sur les structures histologiques de la glande parotide

Figure 42: étude de réversibilité sur l'histologie de la glande parotide

Figure 43 : glande salivaire submandibulaire : effets de l'exposition au BPA sur les ARNm des récepteurs hormonaux, sur les facteurs de croissance et le récepteur muscarinique et sur les ARNm des protéines gustatives hormono-dépendantes

Figure 44: expression des ARNm après arrêt du traitement BPA sur les glandes submandibulaires

Figure 45: glande salivaire sublinguale : effets de l'exposition au BPA sur les ARNm des récepteurs hormonaux et sur les facteurs de croissance

Figure 46 : composition du régime alimentaire L5 et du régime alimentaire A03

Figure 47 : effet du régime alimentaire sur le poids et la consommation d'eau et de croquettes.

Figure 48 : impact du régime riche en phyto-œstrogène sur la préférence au sucré, salé et gras.

Figure 49 : effet d'une exposition au BPA à la dose de 5mg/kg/j et du régime alimentaire sur le poids et la consommation d'eau et de croquettes

Figure 50 : effets de l'exposition au BPA à la dose de 5mg/kg/j, des phyto-œstrogènes et du mélange sur la préférence au sucré ,au salé et au gras.

Figure 51 : effets de l'exposition au BPA à la dose de 5mg/kg/j, des phyto-œstrogènes et du mélange sur le poids des organes et la glycémie

Abréviations

5-HT : 5-hydroxytryptamine
AC6 : anhydrase carbonique 6 ou gustine
ADNc : acide désoxiribo nucléique complémentaire
AFSSA : agence française de sécurité sanitaire des aliments
Amy1 : Amylase 1
ARNm : acide ribo nucléique messenger
BDNF : facteur neurotrophique dérivé du cerveau
BPA: bisphénol A
CCK : cholécystokinine
CE: canal excreteur
CstC : cystatine C
dNTPs : désoxyribo nucléotides triphosphates
Eau DEPC : eau déionisée additionnée de 0,1% diEthylpyrocarbonate
EGF : epithelial growth factor
EGFR : l'EGF receptor
ER : estrogen receptor
GCT : granulated convoluted tubules
GLP-1 : glucagon-like peptide 1
Gpx1 : glutathion Peroxydase 1
GSL: glande salivaire sublinguale
GSM: glande salivaire submandibulaire
HCO⁻ : ions bicarbonates
Ig : immuno-globuline
K⁺ : potassium
KLK : Kalllicréine
KW : Kruskal Wallis
Muc10 : Mucine 10
Na⁺ : sodium
NGF : nerve growth factor
NPY : neuropeptide Y
NS: non significatif
OCT: optimal cutting temperature
P: parotide
PAS : periodic acid Schiff
PBS: phosphate buffer saline
PCR : polymerase chain reaction
PR : progesterone
PRP : proline rich protein
PTH : parathyroid hormone
RPS9 : ribosomal protein S9

RT : reverse transcription

SDS : sodium dodecyl sulfate

SOD1 : superoxyde dismutase 1

T: témoin

TGF: transforming growth factor

TTF : thymocyte transforming factor

VIP : vasoactif intestinal peptide

Plan

Première Partie : Introduction	21
Deuxième Partie : Contexte scientifique	23
2. Homéostasie buccale	24
A. Salive et glandes salivaires	24
1. La salive	24
1.1. Définition, origine	24
1.2. Le flux salivaire	24
1.2.1. Variations physiologiques :	25
1.2.2. Variations d'origine pathologique	25
1.3. Caractéristiques physico-chimique	25
1.3.1. La viscosité	25
1.3.2. Le pH	25
1.4. Composition	26
1.4.1. Composé inorganique	26
1.4.1.1 Les éléments minéraux :	26
1.4.1.2. Les gaz dissous :	26
1.4.2. Composition organique	27
1.4.2.1. Déchets buccaux	27
1.4.2.2. Protéines extrinsèques aux glandes salivaires	27
1.4.2.3. Protéines intrinsèques aux glandes salivaires	28
a) Les Enzymes salivaires	29
b) Les protéines riches en proline	29
c) Les cystatines	29
d) Les lipocalines	30
e) les mucines	30
f) les peptides cationiques	30
1.4.2.4. Hormones et neuropeptides salivaires	30
a) Le facteur de croissance épidermique (EGF)	30
b) Le facteur de croissance nerveuse (NGF)	31
c) Les transforming growth factors	31
d) Analogues d'hormones digestives	31
1.4.3. Autres constituants	32
1.5. Rôles de la salive	32
1.5.1. Protection de la cavité buccale	33
1.5.1.1. Protection de l'épithélium	33
1.5.1.2. Pouvoir tampon et neutralisation des acides	33
1.5.1.3. Protection de l'émail dentaire	33
1.5.1.4. Action bactéricide	33
1.5.2. Pré-Digestion du bol alimentaire	34

1.5.3.	Maintien de l'équilibre hydrique	34
1.5.4.	Gustation	35
1.5.5.	Fonction hormonale	35
a)	La parotine	35
b)	L'EGF	36
c)	Le NGF	36
d)	Les kallicréines	37
e)	L'IGF	37
f)	La leptine et le NPY	37
2.	Anatomie des glandes salivaires	37
2.1.	Les glandes salivaires majeures	37
2.1.1.	La glande parotide	37
2.1.2.	La glande submandibulaire	38
2.1.3.	La glande sublinguale	39
2.2.	Les glandes salivaires mineures	39
3.	Histologie des glandes salivaires	40
3.1.	Histologie de l'adénomère	40
3.2.	Spécificité des glandes salivaires	40
3.2.1.	La glande parotide	40
3.2.2.	La glande sublinguale	43
3.2.3.	La glande submandibulaire	43
3.2.4.	Les glandes salivaires mineures	43
4.	Mécanisme de la formation de la salive	44
5.	Mécanismes de contrôle de la sécrétion salivaire	45
5.1.	Le contrôle nerveux	45
5.1.1.	Le couplage excitation-sécrétion	45
5.1.2.	La sécrétion salivaire réflexe	46
5.2.	Le contrôle endocrinien	46
5.2.1.	Le dimorphisme sexuel des glandes salivaires	47
5.2.2.	Contrôle œstrogénique	47
5.2.3.	Contrôle androgénique	48
5.2.4.	Les hormones thyroïdiennes	49
5.2.5.	Les corticostéroïdes	46
5.2.6.	Les autres hormones	50
6.	Dysfonctionnement des glandes salivaires et conséquences	50
6.1.	L'hyposialie	50
6.2.	Affections hormonales et salive	50
6.3.	Variation de la salive chez la femme	52
6.4.	Sénescence et salivation	52
6.5.	Conséquences d'un dysfonctionnement salivaire	54
7.	Conséquences de cette revue bibliographique sur la salive et les glandes salivaires	55

B. Muqueuse buccale	56
----------------------------	-----------

1.	Définitions	56
2.	Localisation	56
3.	Histologie	57
3.1.	Aspect histologique de la muqueuse buccale non spécialisée	58
3.1.1.	Les cellules épithéliales	58
3.1.2.	les cellules non épithéliales	59
3.1.3.	Jonction épithélium-chorion : la membrane basale	60
3.1.4.	Lamina propria ou chorion	60
3.2.	Muqueuse buccale spécialisée	61
3.2.1.	Papilles gustatives	61
3.2.2.	Bourgeons du goût	62
3.2.3.	Les Récepteurs gustatifs	64
3.2.4.	Physiologie gustative	65
4.	Régulation de la muqueuse buccale	66
4.1.	Facteurs de croissances	66
4.2.	Hormones peptidiques :	67
4.2.1.	Glucagon-like peptide 1	67
4.2.2.	Peptide intestinal vasoactif	68
4.2.3.	Cholécystokinine	68
4.2.4.	La leptine	68
4.2.5.	Le neuropeptide Y	68
4.2.6.	Autres hormones.	69
4.3.	Les hormones sexuelles	69
4.3.1.	Dimorphisme sexuel	69
4.3.2.	Effets des œstrogènes	70
4.3.3.	Effets des androgènes	71
4.3.4.	Progestérone	72
5.	Pathologies de l'épithélium	72
5.1.	Pathologies de l'épithélium buccal et dysfonctionnement salivaire	72
5.2.	Troubles du goût	73
5.2.1.	Classification et origine des troubles	73
5.2.1.	Médicaments et troubles du goût	73
5.2.2.	Syndrome de Gougerot Sjögren	74
5.2.3.	Radiothérapie	75
5.3.	Signes buccaux et modifications endocriniennes	75
5.3.1.	Pathologies endocriniennes	76
5.3.1.	Pathologie bucco-dentaire de la femme	76
5.4.	Sénescence des muqueuses buccales et pathologies associées	76
3.	Perturbateurs endocriniens	79
A.	Système endocrinien	79
1.	Généralités	79
2.	Classification	81

2.1.	Les hormones peptidiques	81
2.2.	Les hormones monoaminées	82
2.3.	Les hormones stéroïdiennes	82
3.	Hormones sexuelles	83
3.1.	Classification	83
3.1.1.	La progestérone	83
3.1.2.	Les androgènes	83
3.1.3.	Les œstrogènes	84
3.2.	Mode de fonctionnement	84
3.2.1.	Les récepteurs stéroïdiens	84
3.2.1.1.	Récepteurs de la progestérone.	84
3.2.1.2.	Récepteur aux androgènes	85
3.2.1.3.	Récepteurs aux œstrogènes	86
3.2.2.	Mode d'action génomique : cas des œstrogènes	86
3.2.3.	Effets non génomiques	87
4.	Tissus cibles	87
4.1.	Tissus cibles de la progestérone.	87
4.2.	Tissus cibles des androgènes.	87
4.3.	Tissus cibles de l'œstrogènes.	88
B.	Généralités sur les perturbateurs endocriniens	89
1.	Définitions	89
2.	Les différents perturbateurs endocriniens	89
3.	Mode de fonctionnement	90
3.1.	Interaction directe avec les récepteurs hormonaux	90
3.2.	Modification du taux d'hormones ou de son récepteur	90
4.	Perturbateur endocrinien et dogme en toxicologie	91
C.	Les Phyto-œstrogènes	94
1.	Définitions	94
2.	Sources d'exposition	94
2.1.	Exposition alimentaire	95
2.1.1.	Plantes à propriétés phyto-œstrogénique	95
2.1.2.	Consommation de phyto-œstrogènes	96
2.1.3.	Métabolisme des phyto-œstrogènes	98
2.2.	Voie transcutanée	99
3.	Effets des phyto-œstrogènes	99
3.1.	Génotoxicité	99
3.2.	Effets oestrogénomimétiques	100
3.3.	Effets chez l'embryon en cas de consommation maternelle de phyto-œstrogènes	100
3.4.	Effet chez le nourrisson ou le jeune enfant	101
3.5.	Reprotoxicité	101
3.5.1.	Chez la femelle	101
3.5.2.	Chez le mâle	102

3.6.	Cancers	102
3.7.	Autres effets hormonaux	102
3.8.	Maladies cardio-vasculaires	103
3.9.	Comportement troubles neurologiques	103
3.10.	Glandes salivaires :	104
D.	Le bisphénol A	105
1.	Définition et propriétés physico-chimique	105
2.	Dose journalière admissible	106
3.	Sources et voies d'exposition	106
3.1.	Voies de contaminations du BPA	106
3.1.1.	Contamination par l'environnement	106
3.1.2.	Contamination par l'alimentation	107
3.1.3.	Voie intraveineuse.	108
3.1.4.	Voie transplacentaire.	108
3.2.	Exposition humaine environnementale au bisphénol A	108
4.	Métabolisme	111
5.	Données toxicologiques et métabolisme	112
5.1.	Cytotoxicité et génotoxicité	112
5.2.	Effets consécutifs à une exposition in utéro	113
5.3.	Reprotoxicité	114
5.3.1.	chez la femelle	114
5.3.2.	Chez le mâle	115
5.4.	Cancers	115
5.5.	Autres troubles endocriniens	116
5.6.	Troubles cardio-respiratoires	117
5.7.	Système immunitaire	117
5.8.	Troubles neurologiques et du comportement	118
4.	Problématique et objectifs de la thèse	119
	Deuxième Partie : Etudes	121
	I. Effets d'une exposition orale en Bisphénol A sur les préférences gustatives et l'homéostasie buccale chez le rat mâle adulte : étude effets-dose	122
1.	But de l'étude	122
2.	Matériel et méthodes	122
2.1.	Déroulement de l'expérimentation animale	122
2.1.1.	Produits chimiques	122
2.1.2.	Animaux et modalités d'expositions au BPA:	122
2.1.3.	Test de Préférences gustatives	123
2.2.	Sacrifices et analyse des échantillons prélevés	124
2.2.1.	Rats sacrifiés : pesée et glycémie	124

2.2.2.	Mesure de l'EGF sanguin	125
2.2.3.	Histologie de l'épithélium	125
2.2.4.	Prélèvement et analyse des glandes salivaires	125
2.2.4.1.	Prélèvement des glandes salivaires	125
2.2.4.2.	Etude histologique	126
a)	Conservation des échantillons	127
b)	Découpe des échantillons	128
c)	Coloration des coupes	129
d)	Numérisation des structures salivaires	130
2.2.4.3.	Expression des ARNm par RT-PCR relative en temps réel.	131
a)	Principe	131
b)	Extraction des ARN totaux	133
c)	Analyse quantitative et qualitative des ARN messagers	133
d)	Transcription inverse (RT) des ARN en ADNc.	134
e)	PCR en temps réel	135
f)	Analyse statistique des résultats	139
2.3.	Analyse statistique	140
3.	Résultats	140
3.1.	Effet du BPA sur la prise alimentaire et l'état sanitaire des animaux	140
3.2.	Effet du BPA sur les préférences gustatives :	141
3.2.1.	Pendant la période d'exposition au BPA	141
3.2.2.	Réversibilité des effets à l'arrêt du traitement	143
3.3.	Etat sanitaire des animaux lors des sacrifices	145
3.3.1.	à l'issue de la période d'exposition	145
3.3.2.	à l'issue de la période de Réversibilité	146
3.4.	Dosage de l'EGF	147
3.5.	Effet du BPA sur l'épithélium buccal	147
3.6.	Effet du BPA sur l'histologie des glandes salivaires	148
3.6.1.	Effet du BPA sur les glandes submandibulaires	149
3.6.1.1.	Aspect histologique pendant l'exposition au BPA	149
3.6.1.2.	Etude de réversibilité (fig 38)	150
3.6.2.	Effet du BPA sur les glandes sublinguales	151
3.6.3.	Effets du BPA sur les glandes parotides	152
3.6.3.1.	Aspect histologique pendant l'exposition au BPA	152
3.6.3.2.	Etude de réversibilité	153
3.7.	Expression des mRNA dans les glandes salivaires	154
3.7.1.	Expression des mRNA dans la glande submandibulaire	154
3.7.1.1.	Expression des mRNA pendant la phase d'exposition au BPA	154
3.7.1.2.	Etude de réversibilité	156
3.7.2.	Expression des ARNm dans la glande sublinguale (fig 44)	156
4.	Conclusion	157

II. Etude de mélanges : Impact de la présence de phyto-estrogènes dans le régime sur les effets du BPA	159
1. Intérêt et problématique	159
2. Matériel et méthodes	159
2.1. Produits chimiques:	159
2.2. Rats et procédures expérimentales:	159
2.3. Etude du comportement gustatif	161
2.4. Sacrifices	161
2.5. Etude statistique	161
3. Résultats	161
3.1. Influence du régime alimentaire	161
3.1.1. Prise alimentaire et poids corporel	161
3.1.2. Préférences gustatives (fig48)	163
3.1.2.1. Sucré	163
3.1.2.2. Salé	163
3.1.2.3. Gras	163
3.2. Influence du BPA selon la composition du régime alimentaire	164
3.2.1. Prise alimentaire et poids corporel	164
3.2.2. Préférences gustatives (fig 50)	165
3.2.2.1. Préférence au Sucré	165
3.2.2.2. Préférence au salé	166
3.2.2.3. Préférence au gras	166
3.3. Constatations lors des sacrifices	167
4. Conclusion	168
 Troisième partie : Discussion	 170
1. Préférences gustatives	171
1.1. Préférence pour le gras et tissu adipeux	171
1.2. Préférence au sucré et glycémie	171
1.3. Préférence au salé et consommation d'eau	173
2. Effets du BPA sur les glandes salivaires	175
3. Epithélium buccal et BPA	178
4. Effets et réversibilité	179
5. Effets du mélange BPA/génistéine	180
6. Conséquences dans le domaine médical	181
 Quatrième Partie : Conclusion	 181
 Bibliographie	 185
 Article	 209
 Annexe	 210

Première Partie : Introduction

L'homéostasie buccale découle d'un épithélium buccal sain, d'un organe gustatif fonctionnel et du bon fonctionnement des glandes salivaires. L'homéostasie buccale, si elle n'est pas respectée, peut être à l'origine de bien des problèmes : si l'on manque de salive, la cavité buccale peut héberger des candidoses, des caries, et même présenter des atteintes des gencives. Ces complications vont altérer la qualité de la vie du patient, pouvant aller jusqu'à la dénutrition. Ainsi, la sécheresse buccale touche environ 15 à 20% de la population et des agueusies totales ou partielles sont des constats cliniques fréquents chez les personnes âgées et /ou médicalisées.

La sécheresse buccale peut avoir pour origine, outre le syndrome de Gougeot, la prise de certains médicaments non hormonaux et certaines pathologies (diabète, hypothyroïdie, hypertension). Chez la personne âgée, la chute des hormones sexuelles est aussi un facteur déclenchant, les androgènes et les œstrogènes intervenant sur le flux salivaire, mais aussi dans la régulation de la synthèse des protéines salivaires dont certaines sont impliquées dans le maintien de l'homéostasie buccale tandis que d'autres sont directement impliquées dans les mécanismes de perception gustatives et olfactives. Chez la femme ménopausée, les traitements par des hormones de synthèse peuvent, en l'absence d'autres pathologies, rétablir de manière partielle ou totale le flux salivaire et ramener un certain bien-être. Cependant, des données récentes quant aux conséquences de ce type de traitement sur l'incidence de cancers hormonaux (sein, utérus) ont conduit les instances réglementaires à déconseiller fermement l'usage des hormones de synthèse, amenant le milieu médical à se tourner vers des alternatives plus naturelles, dont la prescription de phyto-œstrogènes.

L'UMR 1324 a récemment identifié les glandes salivaires comme cibles privilégiées des xénohormones alimentaires dès de faibles doses et constate un lien entre une altération de leur développement et les préférences gustatives. De tels composés sont quotidiennement retrouvés dans l'alimentation (phyto-œstrogènes, contaminants d'emballages plastiques alimentaires, résidus de pesticides), mais également dans les composites dentaires (bisphénol A) ou dans l'utilisation de certains dentifrices (dérivés du paraben).

Ceci nous a conduits à réaliser cette thèse pour préciser l'action des xénohormones sur l'homéostasie buccale.

La première partie de ce mémoire rappelle le fonctionnement des glandes salivaires, leurs implications dans le système endocrinien, et la place de la muqueuse buccale et de l'épithélium gustatif dans l'homéostasie buccale. Nous faisons également le point sur les connaissances acquises des xénohormones retenues dans nos études, les phyto-œstrogènes et le bisphénol A (BPA).

La deuxième partie de ce mémoire présente les effets observés sur les glandes salivaires et l'épithélium buccal de rat mâle exposés *via* l'eau de boisson à différentes doses de BPA. Nous avons également porté une attention particulière à l'influence des phyto-œstrogènes présent dans le régime alimentaire.

Nos résultats et les perspectives ouvertes en matière de santé humaine sont discutés dans la troisième partie.

Deuxième partie :
Contexte scientifique

1. Homéostasie buccale

L'homéostasie buccale est sous la dépendance de sécrétions salivaires quantitativement et qualitativement adaptées et d'un épithélium buccal et gustatif sain, il nous a alors paru important de préciser le fonctionnement et la régulation hormonale de ces éléments.

A. Salive et glandes salivaires

1. La salive

1.1. Définition, origine

La salive est un liquide biologique sécrété par les glandes salivaires, à l'intérieur de la bouche. Elle joue un grand rôle dans la bonne santé bucco-dentaire, la préparation du bol alimentaire et la digestion ainsi que dans les fonctions de phonation, mastication et déglutition. Elle est produite par les glandes salivaires majeures (parotide, submandibulaire ou sublinguale) ou mineurs qui tapissent la cavité buccale

1.2. Le flux salivaire

La sécrétion de salive peut varier de 500 à 1 200 ml par jour : 70 % étant d'origine parotidienne, 20 % d'origine submandibulaire (la production des autres glandes étant relativement négligeable)[1]. Cependant, la sécrétion au repos est essentiellement sous dépendance de la glande submandibulaire (65 à 70%). Cette sécrétion de repos serait d'environ 100 ml par jour alors que la sécrétion stimulée (essentiellement sous la dépendance de la glande parotide) serait environ dix fois supérieure.

1.2.1. Variations physiologiques :

- La sécrétion salivaire varie d'un individu à l'autre de façon importante (variation inter-individuelle). Il existe classiquement un dimorphisme sexuel, le flux salivaire étant plus faible chez la femme que chez l'homme.

- Il existe aussi des variations intra-individuelles : la sécrétion varie en fonction du cycle circadien ; elle est minimale la nuit (en raison de l'absence de stimulation des glandes) et maximale en fin d'après-midi [2]. Elle diminue également avec l'âge. Ce phénomène est mis essentiellement en évidence sur la sécrétion au repos [3].

- L'état d'hydratation intervient également : en cas de déshydratation les glandes salivaires sécrètent moins [3] : au même titre que le rein, les glandes salivaires sont un organe de filtration, et toute déshydratation entraînera donc une diminution de sécrétion salivaire.

- Les repas et notamment la présence de substances acides sont responsables d'une augmentation de sécrétion (pouvoir tampon de la salive) [4]. La mastication provoque une augmentation de la sécrétion salivaire et l'absence de dents la diminue [1].

1.2.2. Variations d'origine pathologique

- les drogues : le tabac étant un facteur irritatif de la muqueuse il a été constaté une augmentation de la sécrétion salivaire chez le tabagique [5] L'alcool, quant à lui semble diminuer le flux salivaire. Certains médicaments (comme les antidépresseurs) peuvent être responsables d'une diminution du flux salivaire tant au repos que stimulé.

- Certaines pathologies (comme la maladie de Gougerot), le diabète, ou encore des pathologies associées à une carence en zinc, s'accompagnent d'une sécheresse buccale [6].

1.3. Caractéristiques physico-chimiques

1.3.1. La viscosité

C'est la résistance d'un fluide à l'écoulement. Elle est fonction de la teneur en mucopolysaccharides dont la synthèse varie selon le type de glande. Ces viscosités sont de: 1,5 poise pour les glandes parotides ; 3,4 poises pour les glandes submandibulaires ; 13,4 poises pour les glandes sublinguales [7]. La viscosité (de même que la densité) varie de manière inverse au débit.

1.3.2. Le pH

Le pH de la salive humaine est compris entre 6,5 – 7,4. Il varie en fonction de l'âge ; chez le nouveau-né la salive est plus acide que chez l'adulte et le redevient chez le sujet âgé. Il varie aussi dans le nyctémère (sur un jour) en tendant vers l'acidité au repos et la neutralité lorsque la sécrétion est stimulée.

Le pouvoir tampon de la salive contribue à élever le pH de la plaque dentaire en neutralisant son acidité produite par les bactéries ; il est plus élevé le matin au réveil, puis diminue rapidement dans la matinée. Il s'élève après les repas puis diminue le soir [7]. Le pouvoir tampon diminue également lorsque le volume de la salive est inadéquat, rendant ainsi la neutralisation des acides inefficaces et rendant le pH plus acide. Il s'acidifie également en présence de nombreuses caries. Les modifications du statut hormonal peuvent l'influencer par

exemple au cours de la grossesse il s'acidifie par modification du pouvoir tampon de la salive.

1.4. Composition

La salive est un mélange complexe de sécrétions produites par les glandes salivaires, de résidus alimentaires, de fluide gingival, de cellules épithéliales et de nombreux électrolytes d'origine plasmatique. Elle est constituée à 99,5% d'eau et contient 0,5% de substances dissoutes réparties en constituants organiques et inorganiques [8].

1.4.1. Composé inorganique

Les constituants inorganiques regroupent différents minéraux présents sous forme de sel (tableau 1). Leur teneur varie selon que la salive est une salive de repos ou stimulée et peut être inférieure (comme le Na⁺) ou supérieure (K⁺) à celle du plasma (cf tableau 1). On retrouve également des gaz dissous [9].

Tableau 1 : concentrations ioniques dans la salive (mmol/l sauf pour I et F) [10]

	Salive entière (fluide buccal)				Salive parotide		Salive sous-max	
	Non-stimulée		stimulée		Non-stimulée	stimulée	Non-stimulée	stimulée
	Moyen	Marge	moyen	Marge				
pH	6.0	5.7-6.2	2.3	→8	5.5	7.4	6.4	7.4
Na ⁺	8	6-26	32	13-80	1.3	36	3	45
K ⁺	21	13-40	22	13-38	24	21	14	17
Ca ⁺⁺	1.35	0.5-2.8	1.7	0.2-4.7	1.05	1.6	1.6	2.4
Mg ⁺⁺	0.3	0.1-0.6	0.4	0.2-0.6	0.15	0.12	0.07	0.4
Cl ⁻	24	8-40	25	10-56	22	28	12	25
HCO ₃ ⁻	2.9	0.1-8	20	4-40	1	30	4	18
HPO ₄ ⁻	5.5	2-22	10	2-25	9	4	6	5
I ⁻ (μmol/l)			14	2-30	0.5-2.3	0.2-1.2	1	0.5
F ⁻ (μmol/l)	1.5	0.2-2.8	5	0.8-6.3	1.5	1.0		

1.4.1.1 Les éléments minéraux :

Le sodium, le chlore le potassium et les bicarbonates sont présents dans la salive primitive à la même concentration que dans le plasma puis, au niveau des structures canaliculaires (canaux striés), le sodium et le chlore vont diminuer (réabsorption) alors que le potassium et les

bicarbonates vont augmenter (pompe Na/K). Dawes [9] conduisant à une salive définitive hypotonique au plasma. Certains ions sont présents à l'état de traces comme le cuivre, le manganèse, le zinc, le cobalt, les bromures, les nitrites...

Chez le rat, la composition ionique ressemble à celle de l'homme sauf pour le calcium (14 mmol/L) et le magnésium (9 mmol/L) qui ont des concentrations beaucoup plus élevées chez le rat peut-être à cause de la différence de régime alimentaire [11].

1.4.1.2. Les gaz dissous :

Comme tous les fluides biologiques, la salive contient de l'oxygène, de l'azote et de l'anhydride carbonique. Il existe des variations de la concentration d'oxygène selon l'endroit de la cavité buccale ; ceci explique la prédominance des bactéries anaérobies au niveau de la plaque et des sillons gingivo-dentaires plutôt que sur la langue.

1.4.2. Composition organique

En plus de l'eau et des molécules inorganiques il existe des molécules organiques comprenant des protéines, des facteurs de croissances et des déchets buccaux.

1.4.2.1. Déchets buccaux

La cavité buccale abrite des micro-organismes qui constituent une entité appelée biofilm buccal. Ces bactéries sont à l'état commensal et ne deviennent pathogène que lors d'un déséquilibre de l'écosystème buccal. On trouve aussi des déchets de l'épithélium buccal (cellules épithéliales desquamées) ainsi que des cellules de l'immunité.

1.4.2.2. Protéines extrinsèques aux glandes salivaires (tableau 2)

Leur concentration, environ 20% des protéines totales, décroît lorsque le débit salivaire augmente. Elles sont représentées par des glycoprotéines acides, de l'albumine sérique, des immunoglobulines (Ig) de type IgA, IgG et IgM, des béta lipoprotéines, des alpha et béta globulines et de la lactoferrine.

L'IgA est la principale immunoglobuline de la salive ; son taux est de 5 à 12 fois plus élevé que le taux d'IgA sérique. Pour certains auteurs, le taux salivaire d'IgA diminue chez les sujets ayant un indice de caries élevé. Brandtzaeg en 1965, Torchinsky en 1970 et Benfredj en 1971 [7] mettent en évidence une nette augmentation des IgA dans les formes inflammatoires des parodontites.

Les IgG et IgM apparaissent dans la salive dans des conditions pathologiques comme le syndrome de Gougerot-Sjörger. Leur haute concentration est retrouvée chez les personnes ayant un déficit en IgA et vient certainement du fluide gingival.

Tableau 2 : composition organique de la salive (Concentrations en mg/l sauf où indiqué)
[12]

	Salive totale		Salive parotidienne		Salive sous-maxillaire	
	Moyenne	Ecart	Moyenne	Ecart	Moyenne	Ecart
Protéines	1750		2300		1100	
-Albumine	25		2		11	
- γ -globulines	50		80		60	
-Mucoprotéines	450		800		800	
-Amylase	420		1000		300	
-Lysozyme	140		200			
-Sialoperoxidase		5-6				
-Lactoferrine		1-2		1-2		
-PRP			2000			
-Histatines			100			
-Fibronectine		2-6		2-6		2-6
Hydrates de carbone		270-400	450		300	
Glucose(mmol/l)		0.02-0.17	0.03		0.03	
Lipides	20		20		20	
Cortisol(mmol/l)		2-20				
Acides aminés	40		10		20	
Urée(mmol/l)		2.0-4.2		2.0-4.2		0.7-1.7
Ammonium (mmol/l)		0.6-7.0		0.6-7.0		0.2-7.0

1.4.2.3. Protéines intrinsèques aux glandes salivaires

Ce sont les protéines synthétisées par les glandes salivaires et déversées dans la salive. Le protéome salivaire comprend plus de 700 protéines. Elles sont classées en plusieurs familles. Leur dénomination ne répond pas à des critères bien définis mais repose selon leurs

caractéristiques fonctionnelles (ex : enzymes), leur composition en acides aminés (proline, cystatine) ou autre (tableau 2) [1,7,13]

a) Les Enzymes salivaires

- *L'amylase* : représente 30% des protéines salivaires totales. Elle est sécrétée en majorité par les glandes parotides : les glandes submandibulaires n'assurent que 20% de sa sécrétion et les glandes sublinguales et accessoires n'en produisent que très peu. Sa concentration augmente avec le débit salivaire. Elle intervient dans les premières étapes de digestions du bol alimentaire et participe à la libération des saveurs.

- *Le lysozyme* est présent à hauteur de 10 % des protéines totales. il s'agit d'une très grosse protéine (environ 130kd) capable d'hydrolyser les parois des bactéries. Elle a donc un rôle désinfectant dans la salive

- *L'anhydrase carbonique ou gustine* est sécrétée par les cellules séreuses des glandes submandibulaires et parotidiennes. C'est elle qui assure le pouvoir tampon de la salive.

- *Les peroxydases* interviennent dans le système antioxydant de la salive.

- *Les kallicroïnes* sont des enzymes capables de cliver les liaisons peptidiques des protéines. Les kallicroïnes sont sous dépendance androgénique mais également œstrogénique [14]. Elles participent notamment à la transformation du Pro-EGF en EGF.

- *Les autres enzymes* : on peut également trouver d'autres enzymes qui dégradent les glucides, ou les protéines comme les phosphatases acides, la lipase, les ribonucléases, les élastases, les protéases, les cholinestérase ou les collagénases.

b) Les protéines riches en proline

Les protéines riches en prolines (PRP): sont des protéines caractérisées par une réplétion d'un acide aminé la proline (20 à 45 %), qui leur confère le caractère de revêtement protecteur. Chez les rongeurs, elles sont abondamment produites par les acini séreux de la parotide et de la submandibulaire [15].

c) Les cystatines

Ce sont des protéines qui inhibent les protéases à cystéine, un précurseur de la biosynthèse de la kinine. Chez le rat, elles sont localisées au niveau des GCT de la glande submandibulaire [16]. Elles sont présentes dans le biofilm buccal et auraient un rôle protecteur dans la cavité buccale.

d) Les lipocalines

Les lipocalines sont de très petites protéines (20kd) qui se caractérisent par une structure en feuillets ; elles sont sécrétées par de nombreux organes, dont les glandes salivaires. Ce sont des protéines de transport qui se lient aux petites molécules hydrophobes telles que les hormones et les phéromones, les sels biliaires, mais aussi les arômes et les molécules sapides, les lipides, etc. Les lipocalines sont sécrétées en particulier par les glandes salivaires mineures. Elles sont souvent responsables d'allergies aux rongeurs, chiens ou chats [17,18].

e) les mucines

Ce sont des glycoprotéines composées de protéines (75%) et de glucides (25%). Elles sont sécrétées par les cellules muqueuses des glandes submandibulaires, sublinguales et des glandes accessoires. En raison de leur forte teneur en glucides (> 80%), leurs grandes dimensions (> 1 micron), ainsi que leur forme, la sécrétion classique de mucines à de faibles concentrations forme des gels viscoélastiques hydrophiles qui lubrifient l'épithélium.

f) les peptides cationiques

Cette appellation regroupe un ensemble de protéines impliquées dans la défense de la cavité buccale parmi lesquelles les défensines (antifongiques), les histatines (antibactériennes) et la lactoferrin (large spectre antibiotique), elles sont sécrétées par toutes les glandes majeures [19].

1.4.2.4. Hormones et neuropeptides salivaires

Les glandes salivaires sont également des glandes endocrines capables de synthétiser des facteurs de croissance, principalement le nerve growth factor (NGF) et l'epithelial growth factor (EGF) dont la sécrétion augmente lors des maladies parodontales.

a) Le facteur de croissance épidermique (EGF)

C'est une hormone peptidique aux multiples actions, principalement trophiques [20]. L'EGF est bio-synthétisé sous forme d'un précurseur au niveau des tubules granulaires (GCT) chez les rongeurs avec une taille de 160 kDa et se transforme en peptide actif de 6 kDa dans la salive. Il s'agit d'une protéine soluble, ne pouvant pas traverser la membrane plasmique

hydrophobe. La transmission de l'information à l'intérieur de la cellule se fait par fixation au récepteur spécifique de l'EGF. Cette fixation induit une dimérisation du récepteur. Il y a alors trans-phosphorylation au niveau de certains résidus tyrosines du récepteur (activité tyrosine kinase intrinsèque du récepteur). Son action conduit principalement à une augmentation de l'activité de transcription de la cellule et à une augmentation de la réplication de l'ADN, ce qui se traduit par une stimulation de la croissance cellulaire et de la division (mitose). Le récepteur de l'EGF (EGFR) est un proto-oncogène ; la cellule hôte peut se transformer et devenir une cellule cancéreuse, dans laquelle le récepteur de l'EGF n'aura plus son fonctionnement normal et participera à la multiplication cellulaire. [21].

b) Le facteur de croissance nerveuse (NGF)

Le NGF a été identifié en 1960 dans la glande submandibulaire. C'est un facteur de croissance polypeptidique qui possède un effet puissant sur la croissance et la différenciation du système nerveux sympathique. Le NGF est lui aussi plus élevé chez le rongeur mâle que chez la femelle faisant suspecter une régulation par les androgènes. De même, l'hormone thyroïdienne T4 augmenterait sa sécrétion [21].

c) Les transforming growth factors

On distingue le TGF α et le TGF β . Le TGF α est un polypeptide de 50 acides aminés, qui a la même structure et la même activité biologique que l'EGF, et se lie sur le même récepteur EGFR. Une étude de Mogi *et al* [22] met en évidence l'évolution postnatale du TGF α et de l'EGF et montre que la concentration du TGF α est très importante à la naissance et diminue progressivement avec l'âge, ce qui lui confère un rôle important dans la morphogenèse de la glande. Il est progressivement remplacé par le TGF- β .

d) Analogues d'hormones digestives

Les glandes salivaires sécrètent d'autres petits peptides identiques à ceux sécrétés par d'autres organes périphériques comme le foie, le pancréas, ou les reins, etc. On y trouve :

- Le *Glucagon like* (GLP-1) : il a été identifié dans la salive par Thorens en 1993
- L'*Insuline like et Insuline like growth factors* [23]: les facteurs de croissance analogues à l'insuline (IGF) constituent une famille de protéines mitogènes. L'IGF-I et IGF-II ont été identifiés dans la glande submandibulaire.

- *La rénine* a été identifiée dans les GCT et les cellules canalaire de la glande submandibulaire. *La leptine et le NPY* ont été identifiés dans la glande submandibulaire et dans la glande parotide au niveau des acini et des cellules canalaire.
- *La parotine* est sécrétée par la glande parotide [23].

1.4.3. Autres constituants

Des constituants tels que glucose, urée, acide urique et cholestérol sont également présents dans la salive. La plupart des hormones périphériques sont également présente à des teneurs équivalentes aux taux circulant (cortisol, hormones sexuelles, phéromones)

1.5. Rôles de la salive (figure1)

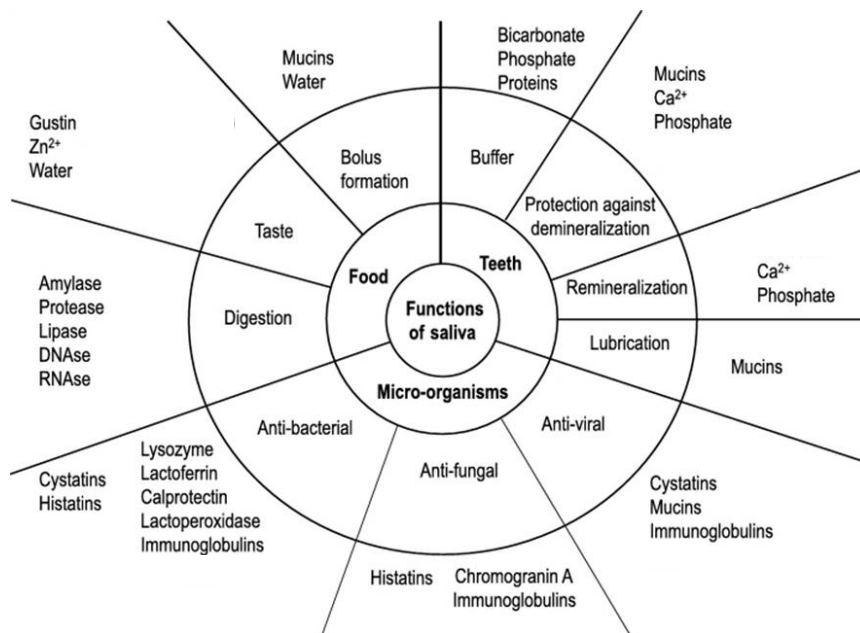


Figure 1 : rôles de la salive (adapté de [24])

1.5.1. Protection de la cavité buccale [1,4,24,25]

1.5.1.1. Protection de l'épithélium

La salive est un fluide ; elle protège donc les muqueuses contre la déshydratation, grâce aux mucines en particulier. En raison de leur forte teneur en glucides (> 80%), leurs grandes dimensions (> 1 micron), ainsi que leur forme, la sécrétion classique de mucines à de faibles concentrations forme des gels viscoélastiques hydrophiles qui lubrifient l'épithélium. Ces gels assurent la protection de l'épithélium sous-jacent contre les dommages mécaniques, et permet un nettoyage mécanique des surfaces dentaires et espaces interdentaires en chassant les particules alimentaires. L'EGF salivaire quant à lui, renforce le potentiel de cicatrisation des tissus muqueux. Le système IGF joue un rôle important dans la croissance et le développement de la langue.

1.5.1.2. Pouvoir tampon et neutralisation des acides

Ce pouvoir dépend de la concentration en bicarbonates qui permettent la neutralisation des acides et permettent aussi la synthèse d'ammoniac [26]. Ces carbonates sont d'origine plasmatique, ou libérés par les canaux striés des glandes salivaires. Il est aussi corrélé au débit salivaire. De plus, il est étroitement relié à l'activité de la gustine. La gustine : est une enzyme qui permet de réaliser l'équation suivante : $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$. Ainsi, elle est impliquée dans la neutralisation des acides au niveau de l'œsophage et a une action protectrice sur les dents. [27].

1.5.1.3. Protection de l'émail dentaire

La salive inhibe également les phénomènes de déminéralisation de l'émail grâce aux ions phosphates et bicarbonates qui contrôlent la neutralité du pH salivaire. Les mucines quant à elles s'opposent à l'entrée directe d'agents nocifs, y compris les bactéries et les virus, dans l'épithélium sous-jacent. Le système IGF joue un rôle important dans la croissance et le développement des dents, de la mâchoire supérieure et inférieure. Il semble également que l'IGF-I pourrait être d'une grande utilité dans le traitement des défauts parodontaux et dans la cicatrisation des tissus [28].

1.5.1.4. Action bactéricide

Certaines substances jouent un rôle bactéricide. Le lysozyme inhibe l'agrégation des *Streptococcus mutans* et la fermentation du glucose. Le lysozyme attaque la paroi des

bactéries GRAM+ en les hydrolysant. Il a donc un rôle antiseptique. La lactoferrine est également bactériostatique sur de nombreux microorganismes en diminuant leur environnement en fer. Les peroxydases inhibent la croissance et la production d'acides de certains microorganismes comme les streptocoques, les lactobacilles et autres bactéries. Ces enzymes libèrent de l'oxygène actif, qui convertit le thiocyanate présent dans la salive en hypothiocyanite, qui oxyde le groupe SH de certaines enzymes vitales au métabolisme bactérien. La pénétration des antigènes bactériens et alimentaires peut être empêchée par les IgA qui agissent par diverses actions :

- Elles sont capables d'agglutiner les streptocoques pour inhiber leur colonisation.
- Associées au lysozyme, elles entraînent la lyse d'Escherichia coli.
- Les complexes antigènes-IgA seraient plus sensibles à la phagocytose (opsonisation).
- Réparation des tissus mous: La salive joue également un rôle dans le processus réparation des tissus mous, grâce à la présence de facteurs d'accélération de la cicatrisation, en particulier du facteur de croissance épithélial (EGF). Son action conduit principalement à une augmentation de l'activité de transcription de la cellule et à une augmentation de la réplication de l'ADN, ce qui se traduit par une stimulation de la croissance cellulaire et de la division (mitose) [5,21].

1.5.2. Pré-Digestion du bol alimentaire [13,29,30]

La salive va faciliter la mastication. Mélangée aux aliments, la salive forme le « bol alimentaire » qui est projeté par la langue à travers le pharynx et glisse plus facilement dans l'œsophage, ceci grâce aux substances mucilagineuses qu'elle contient. Cette lubrification continue des surfaces dentaires et muqueuses facilite également la parole.

Les enzymes contenus dans la salive vont débiter le phénomène de digestion. L' α -amylase va dégrader les grosses molécules d'amidon en molécules assimilables par le tube digestif (dextrines puis maltose). Les lipases sont spécialisées dans la transformation de triglycérides en glycérol et en acides gras (lipolyse) assimilables dans le tube digestif ; enfin les protéases permettent de mieux assimiler les peptides [1].

1.5.3. Maintien de l'équilibre hydrique

Les glandes salivaires font partie du système de contrôle permettant de maintenir l'hydratation de l'organisme à un bon niveau.

La soif est déclenchée par la sensation de sécheresse buccale, provenant d'une diminution de la sécrétion salivaire de repos, entraînant la stimulation de récepteurs sensitifs intra-buccaux. Les changements osmotiques plasmatiques sont aussi détectés au niveau de l'hypothalamus (osmo-récepteurs) libérant l'hormone antidiurétique (diminution de l'excrétion d'eau) et de l'appareil juxta-glomérulaire rénal entraînant, grâce au système rénine-angiotensine, la libération d'aldostérone par les glandes cortico-surrénales diminuant l'excrétion de sel [31]. La rénine sécrétée par les glandes salivaires interviendrait dans la régulation du flux sanguin de la glande (rôle paracrine).

Les kalicrénines quant à elles ont des propriétés vasoactives. La famille de ce groupe d'enzyme inclut la tonine ; une enzyme présente dans les glandes salivaires de rat (spécifiquement dans les GCT et canaux striés de la glande submandibulaire) capable de cliver l'angiotensine I en l'angiotensine II [16].

1.5.4. Gustation

De même, la salive joue un rôle dans la gustation en solubilisant les substances sapides, étape indispensable à leur fixation sur les récepteurs gustatifs situés dans les bourgeons du goût [32]. Ainsi, les lipocalines sécrétées par les glandes salivaires, interviennent dans le transport des phéromones et dans le transport de molécules odorantes ou sapides, en particulier les molécules lipidiques ou lipophiles. Ainsi leur action se fait directement au niveau des papilles gustatives [33]. La gustine est indispensable au bon fonctionnement des bourgeons du goût. Il a également été démontré que le NGF était impliqué dans la perception gustative [34]. Quant à l'EGF il maintient l'intégrité de l'épithélium gustatif [35]. Les cystatines ont un rôle gustatif mal défini, mais elles servent à protéger les tissus buccaux des enzymes et permettent ainsi le bon fonctionnement des bourgeons du goût [16].

1.5.5. Fonction hormonale (tableau 3)[1,23,30]

a) *La parotine* est la première substance extraite des glandes salivaires ; elle agit sur le développement et la nutrition des tissus osseux et cartilagineux. Il s'agit d'une hormone qui freine le processus de gérontification et diminue la concentration en calcium sérique [36]. Puis d'autres substances ont été mises en évidence comme l'EGF (epithelial growth factor), le NGF (nerve growth factor), l'insuline, la rénine et la kalicrénine, plus précisément au niveau des cellules des canaux striés.

b) *l'EGF* : Les actions de l'EGF provenant de la glande SM peuvent aller au-delà de la cavité buccale et atteindre, par la circulation sanguine, des organes distants où il peut interagir avec le récepteur de l'EGF. Une des preuves de cette fonction endocrine de l'EGF submandibulaire est que l'ablation des glandes SM chez le rat réduit l'EGF circulant dans le sang à des quantités négligeables [37]. Ainsi, l'EGF semble agir au niveau de la spermatogénèse, la fertilité et le développement de la glande mammaire chez les femelles. Il semble également qu'en liaison avec l'Insuline like, il intervienne dans la longévité de la vie [38], pour réguler l'homéostasie protéique en favorisant l'expression des gènes antioxydants, stimule l'activité du système ubiquitine protéasome (UPS), et en réprimant l'expression de chaperons de chaleur petites protéines de choc [38].

Tableau 3 : hormones ou hormones like isolées dans les glandes salivaires (adapté [1])

	Rôle dans le métabolisme général et sur la fonction salivaire	Facteurs de régulation de leur concentration salivaire
<i>Hormones stéroïdes</i>	Synthèse du cholestérol dans la glande submandibulaire	
<i>Insuline</i>	Synthèse d'une hormone insuline-like dans la parotide chez l'animal. Les glandes salivaires auraient une implication fonctionnelle dans certains états pathologiques comme le diabète	
<i>Parotine</i>	Métabolisme ostéocalcique, glucidique et lipidique	?
<i>Nerve growth factor</i>	Développement et conservation de l'intégrité fonctionnelle des voies sympathiques	Contrôle sympathique à-adrénergique
<i>Epidermal growth factor</i>	Stimulation des mitoses et régulation de la multiplication cellulaire Facteur déterminant du développement et de la mise en place des structures faciales et buccodentaires	Contrôle hormonal : œstrogènes, androgènes, hormones thyroïdiennes
<i>Kallicréine</i>	Régulation du débit vasculaire dans la glande salivaire (médiateur de la vasodilatation) lors des périodes sécrétoires	Contrôle hormonal : œstrogènes, androgènes,
<i>Rénine</i>	Régulation locale de la pression sanguine	Contrôle sympathique à-adrénergique et parasymphatique cholinergique Contrôle hormonal : androgènes
<i>Prostaglandine</i>	Stimulation du flux salivaire Modulation de la libération d'autres peptides synthétisés par les glandes salivaires comme la rénine	?

c) *Le NGF*, quant à lui, exerce des effets trophiques et de différenciation sur des populations neuronales périphériques et centrales. Il est impliqué dans la réponse à des stress environnementaux. Il a également été démontré que le NGF était impliqué dans la perception gustative [34]. Il a été démontré qu'en son absence, les neurotransmetteurs tels que la substance P, la thyrosine-hydroxylase (enzyme clé de la synthèse d'adrénaline) et la dopamine étaient diminués [21]. Il semblerait que le NGF puisse avoir un passage sanguin *via* une réabsorption transépithéliale [39]. Il a été évoqué le fait que le NGF puisse accéder à la propre régulation sympathique de la glande salivaire par voie rétrograde (en suivant l'innervation sympathique de la glande).

d) *Les kallikréines* sont impliquées dans le clivage de précurseurs hormonaux comme l'EGF ou le NGF [40].

e) *L'IGF* a un rôle paracrine dans le maintien de la structure et de la fonction de la glande submandibulaire [41]. L'IGF contrôle la croissance, la différenciation et le maintien de la fonction différenciée dans de nombreux tissus. L'IGF-II a été montré pour être surexprimé dans les adénomes des glandes salivaires, ce qui suggère que la signalisation aberrante IGF peut être un facteur important dans l'étiologie des cancers oraux [28].

f) *La leptine et le NPY* interviennent dans la régulation de la prise alimentaire et de la satiété.

2. Anatomie des glandes salivaires [42- 44]

Chez les mammifères, on différencie 2 types de glandes salivaires : les glandes salivaires principales (représentées par les glandes parotides, submandibulaires et sublinguales) et les glandes salivaires accessoires ou mineures (que l'on retrouve sous la langue, sur les joues ou sur le palais). Nous présentons ici les glandes salivaires de l'homme et les particularités des glandes salivaires chez le rongeur, animal le plus utilisé pour les études en laboratoire.

2.1. Les glandes salivaires majeures

2.1.1. La glande parotide (figure 2) [1,44]

C'est la plus volumineuse des glandes salivaires. Elle est entourée d'une capsule de couleur blanc jaunâtre, de consistance molle et pèse de 25 à 30 grammes.

Sa situation est superficielle : au-dessous et en avant du conduit auditif externe, en arrière du ramus et en avant des apophyses mastoïde et styloïde et des muscles qui s'y attachent. Elle est de forme pyramidale et possède un canal excréteur, le canal de Sténon, qui draine la salive qu'elle sécrète.

La glande parotide reçoit son innervation du nerf auriculo-temporal qui innerve l'articulation et se divise en une branche cutanée et une branche glandulaire sécrétoire. C'est ce nerf, ainsi que le rameau antérieur auriculo-parotidien de la branche auriculaire du plexus cervical superficiel, qui assurent l'innervation sensitive de la région parotidienne.

Chez le rat, cette glande est également la plus grosse (0.35g), elle est mal limitée car « noyée » dans le gras cervical. Sa situation est latéro-cervicale à proximité du conduit auditif externe et de la glande lacrymale extra-orbitaire (photo 1)

2.1.2. La glande submandibulaire (figure 2)[7,44,45]

Elle a la forme d'une amande et pèse de 5 à 10 grammes. Sa surface légèrement lobulée est recouverte d'une capsule propre qui adhère peu aux parois de la loge, permettant le clivage de la glande facilement.

Elle se situe dans la partie latérale de la région sus-hyoïdienne et occupe la dépression limitée d'une part, par la face interne de la mandibule et par les muscles sus-hyoïdiens, d'autre part par la face latérale de la base de la langue et celle du pharynx. Son canal excréteur, le canal de Wharton long de 5 à 6 centimètres, s'ouvre dans la cavité orale au sommet de la caroncule linguale au niveau de la base du frein de la langue. L'innervation de la glande submandibulaire provient de nerfs issus du ganglion sous-maxillaire, du nerf lingual et de la corde du tympan.

Chez le rat (photo1), la glande est située dans la région paramédiane du cou. Elle est bien individualisable. Elle est accolée à la glande sublinguale, mais facilement identifiable par sa couleur jaune-rosé. Cette glande pèse environ 300mg.

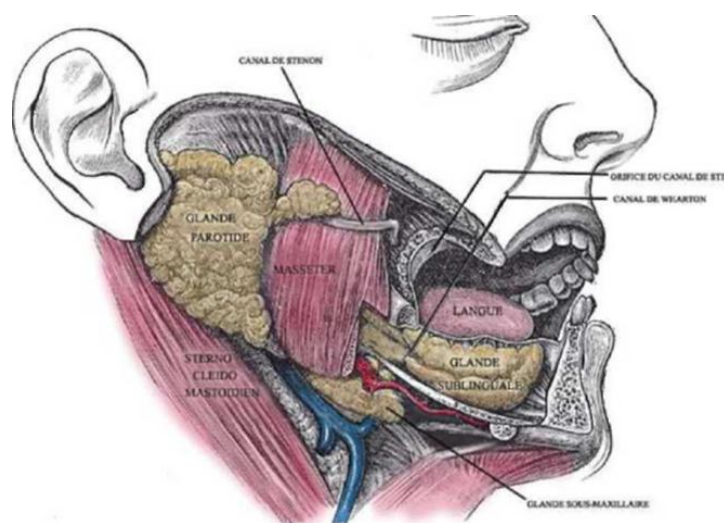


Figure 2 : anatomie des glandes salivaires majeures (D'après Henry Gray) chez l'homme

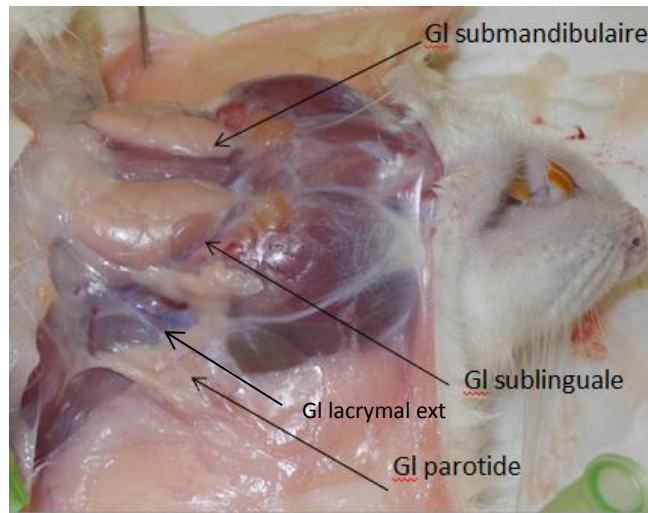


Photo 1 : glandes salivaires du rat (folia INRA)

2.1.3. La glande sublinguale (figure 2) [1,7]

C'est la plus petite des glandes salivaires majeures. Elle mesure 2 à 3 centimètres de long pour 6 à 8 mm d'épaisseur. Elle pèse environ 3 grammes et a la forme d'une amande aplatie. Cet amas d'une vingtaine de lobules glandulaires est situé entre la mandibule et la base d'implantation de la langue, c'est-à-dire de part et d'autre du frein lingual. La glande sublinguale présente un grand nombre de canaux excréteurs parmi lesquels on distingue le canal de Rivinus qui longe le canal de Wharton. Il s'abouche juste en dehors de celui-ci au niveau de la papille sublinguale, en dehors de la caroncule linguale, mais peut aussi se jeter dans ce dernier.

L'innervation est issue du ganglion sublingual et de la corde du tympan par l'intermédiaire du nerf sublingual.

Chez le rat c'est également la plus petite glande (50 mg). Elle est, comme la glande submandibulaire, en position cervicale paramédiane, supérieure à la glande submandibulaire et facilement identifiable par sa couleur brun chamois.

2.2. Les glandes salivaires mineures [7,46]

Elles sont disséminées sur toute la surface de la muqueuse buccale, excepté au niveau des gencives, du vermillon des lèvres et de la région antérieure du palais. Ce sont en général de petits amas d'unités sécrétoires non encapsulés s'ouvrant dans la cavité buccale *via* de courts canalicules.

- *Les glandes labiales* occupent la face interne des lèvres et sont d'un accès aisé pour les biopsies. Les glandes jugales se situent dans la muqueuse des joues. Celles qui sont groupées au voisinage de l'ostium du canal de Sténon sont appelées « glandes molaires ». Les glandes palatines ou vélaire sont regroupées en paquets dans les parties postéro-latérales du palais osseux et dans les muqueuses vélaire et uvulaire. Leurs canaux excréteurs, plus longs et irréguliers, ont des orifices larges et facilement visibles.

- *Les glandes du trigone rétro-molaire* se trouvent en arrière des molaires maxillaires et en avant du pilier antérieur du voile du palais.

- *Les glandes linguales* sont divisées en plusieurs sous-groupes :

- Les glandes antérieures ou glandes de Blandin-Nliun se situent à la face ventrale de la langue, le long du frein lingual.
- *Les glandes postérieures ou glandes de Von Ebner* sont annexées aux papilles foliées et caliciformes et logées dans les fibres musculaires. Leurs canaux excréteurs se situent entre les papilles linguales.
- *Les glandes de Weber* occupent la partie postérieure des bords latéraux de la langue et la région amygdalienne.

Le rat présente également des glandes salivaires accessoires disséminées dans la cavité buccale et n'ayant pas de canal excréteur.

3. Histologie des glandes salivaires [7,47]

3.1. Histologie de l'adénomère (figure 3)

Les glandes salivaires sont entourées d'une capsule conjonctive fibreuse et contiennent des lobules. Les vaisseaux sanguins et les nerfs pénètrent dans la glande par le hile et se ramifient dans les lobules. L'unité sécrétrice du parenchyme lobulaire est l'adénomère (Figure 4). Il est constitué de cellules sécrétrices formant des agglomérats creux dénommés acini dont la cavité (le lumen) se prolonge par un canal intercalaire. Les canaux intercalaires font suite aux acini sécréteurs ; ils possèdent un petit diamètre et sont revêtus d'un épithélium pavimenteux cubique simple et recueillent la salive. Ils se réunissent dans un canal excréto-sécréteur le canal intralobaires, ayant une paroi formée par des cellules cylindriques hautes dont le pôle basal apparaît strié en raison des nombreux replis de la membrane plasmique associés à des mitochondries. Ces cellules sont le siège de fonctions métaboliques (réabsorption de sodium et de chlore ; sécrétion de bicarbonate de potassium et aussi sécrétion de glycoprotéines).

Chaque canal strié déverse les sécrétions du lobule dont il est issu dans le canal inter-lobulaire qui circule dans les cloisons inter-lobulaires. Le canal interlobulaire constitue le canal excréteur de la glande salivaire et débouche dans la cavité buccale. L'épithélium d'abord bi-stratifié, devient ensuite pluristratifié.



Figure 3 : histologie de l'adénomère [1, 48]

Entourant chaque acinus, les cellules myoépithéliales sont similaires en tous points aux cellules musculaires lisses. Contractiles, elles joueraient un rôle dans l'expulsion des produits de sécrétion.

On distingue plusieurs types d'acini suivant la composition de leur produit de sécrétion et leur morphologie :

Acinus muqueux : Il s'agit le plus souvent d'une tubulo-acinus en raison de sa forme allongée. Il est composé de cellules pyramidales disposées autour d'une lumière large. Le cytoplasme occupe la plus grande partie de la cellule et sa majeure partie est occupée par des vacuoles de mucus, PAS +, contenant des mucines neutres ou acides (coloration rose) .Les organites cellulaires sont refoulés au pôle basal, qui présente un noyau aplati et dense.

Acinus séreux : il est de petite taille et composé de cellules sphériques possédant un noyau arrondi situé dans le tiers inférieur. Le pôle apical est occupé par des grains de zymogène (substance protéique dont la transformation dans l'organisme donne des enzymes)

qui se déversent directement, dans une lumière de faible calibre. Le pôle basal est lui fortement basophile (coloré en bleu) en raison de sa richesse en réticulum granulaire.

Ces cellules sont unies les unes aux autres par des zones de jonctions complexes de type « GAP ». Les acini séreux sont généralement entourés par des cellules myoépithéliales, dont le cytoplasme contient des myofilaments de 4 à 8 millimètres de diamètre.

Acinus séro-muqueux ou mixte : il contient des cellules muco-sécrétantes dans la partie proche du canal excréteur et des cellules séreuses, plus distales, disposées en demi-sphère autour des précédentes. En coupe, ces dernières forment une structure hémicirculaire, ou croissant de Gianuzzi.

3.2. Spécificité des glandes salivaires (photo2)

3.2.1. La glande parotide

Il s'agit d'une glande acineuse composée et ramifiée, dont les unités sécrétrices sont constituées presque exclusivement de cellules séreuses. Les grains de sécrétion PAS + témoignent de la présence de polysaccharides ; ils sont de plus très riches en protéines et possèdent une activité amylasique (sécrétion d'amylase) élevée. Les cellules des canaux striés présentent, quant à elles, les caractères morphologiques de cellules assurant le transport des ions. La capsule comporte de nombreux plasmocytes et lymphocytes. Les plasmocytes sécrètent les immunoglobulines A (IgA) qui peuvent résister à toute digestion enzymatique. Dans la salive elles constituent un moyen immunologique de défense de la cavité buccale vis-à-vis de toute agression pathogène. Les cellules sécrétrices représentent environ 90% du volume de la glande, les canaux striés environ 5%, et le volume restant est formé par les canaux excréteurs extra-lobulaires, le tissu conjonctif, les vaisseaux, les nerfs.

Chez le rongeur, on retrouve une similitude histologique avec également une sécrétion d'amylase et de protéines.

3.2.2. La glande sublinguale

Il s'agit également d'une glande tubulo-acineuse composée et ramifiée. Les cellules séreuses se regroupent en croissants de Gianuzzi et sécrètent du lysozyme (peptidase). Les cellules muqueuses représentent 60% du volume de la glande, les cellules séreuses 30%, les canaux striés 3%, et le volume restant est formé par les vaisseaux, les nerfs et les autres canaux excréteurs. La structure de cette glande chez le rat est identique.

3.2.3. La glande submandibulaire

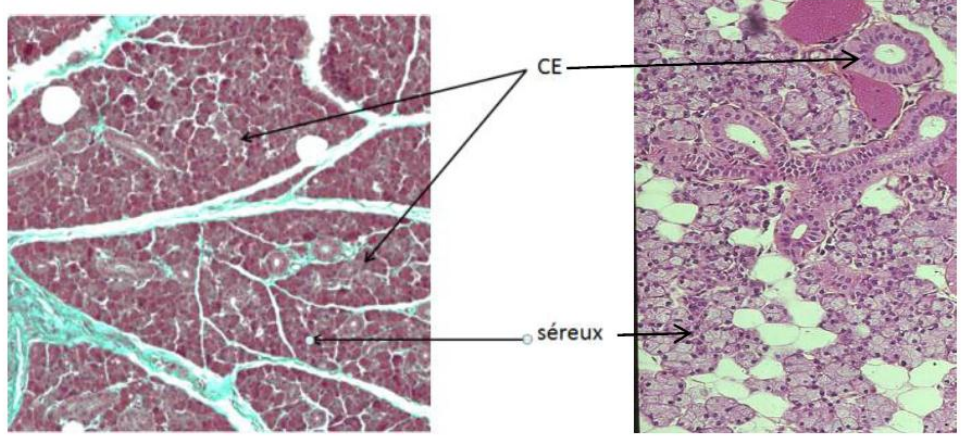
Il s'agit d'une glande tubulo-acineuse dont les unités sécrétrices sont constituées de cellules muqueuses et de cellules séreuses. Les cellules séreuses sont les plus nombreuses et se distinguent des cellules muqueuses par leur noyau arrondi et leur cytoplasme basophile. Leurs membranes plasmiques basales et latérales dessinent de profonds replis qui permettent de multiplier par 60 la surface d'échange : ceci facilite le transport des électrolytes et de l'eau. Les grains de sécrétion de ces cellules sont également PAS + car ils contiennent des hydrates de carbone : cependant l'activité amylasique de ces cellules demeure faible. Les cellules séreuses des croissants de Gianuzzi sécrètent une enzyme, le lysozyme, qui a pour activité principale d'hydrolyser les parois de certaines bactéries. C'est dans les cellules canalaire des canaux striés que sont synthétisés chez l'homme le NGF, l'EGF, l'insuline like, les kallicroïnes et la rénine. Les cellules séreuses constituent 85% du volume de la glande, les cellules muqueuses 5%, les canaux striés 5%, et le volume restant est formé par les vaisseaux, les nerfs et les autres canaux excréteurs.

Chez le rat, l'histologie de la glande submandibulaire est sensiblement différente : elle contient deux types de compartiments sécrétoires possédant deux modes de sécrétions différents. On distingue les acini et les tubules contournés granulaires (GCT). Les acini constituent la partie prédominante. Le GCT est un type de canal sécrétoire spécialisé ; il se situe entre le canal intercalaire et le canal strié et caractérise les glandes submandibulaires des rongeurs [49]. Les GCT présentent un intérêt particulier car ils concentrent plusieurs protéines biologiquement actives comme le NGF, l'EGF, la rénine et des kallikreïnes [50,51].

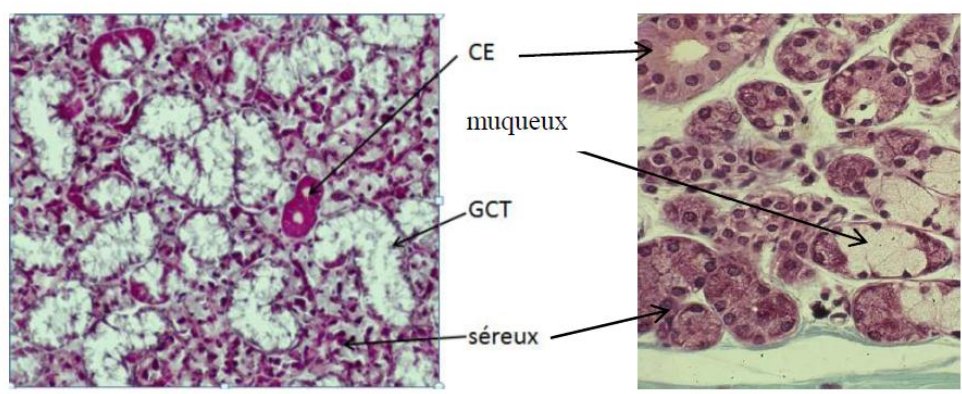
3.2.4. Les glandes salivaires mineures

Les glandes labiales, jugales et palatines sont qualifiées de glandes salivaires muqueuses, comme les glandes linguales de Blandin-Nuhn et de Weber. Seules les glandes linguales de Von Ebner sont purement séreuses.

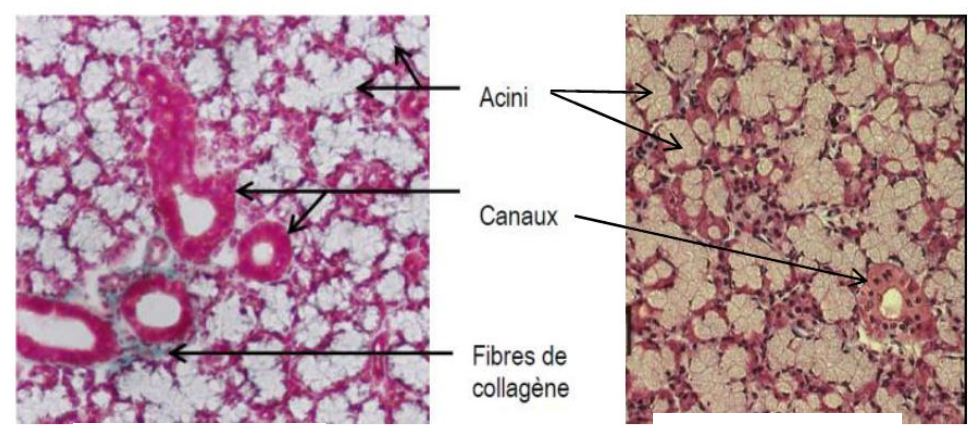
P
A
R
O
T
I
D
E



G
S
M



G
S
L



Rat

Homme

Photo 2 : histologie de glandes parotide, submandibulaire et sublinguale de rat et chez l'homme.

(F Menetrier INRA)

4. Mécanisme de la formation de la salive [1]

En 1954, Thayseu [1] émet l'hypothèse d'une formation de la salive en deux étapes expliquant la variation de concentration des principaux électrolytes salivaires par rapport à leur taux plasmatique.

La première phase se déroule au niveau de l'acinus où le fluide plasmatique filtre à travers les cellules acineuses, sans modification ionique notable, et aboutit à la formation d'une salive isotonique au plasma appelée salive primaire.

La deuxième phase s'effectue dans le canal strié où la salive primaire est modifiée par une sécrétion et une réabsorption d'électrolytes aboutissant à la formation de la salive finale, hypotonique au plasma. Ceci est réalisé par la mise en jeu d'une pompe $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$, située au pôle basal des cellules des canaux striés, qui réabsorbe le sodium (Na^+) et excrète le potassium (K^+).

Parallèlement, il existe une sécrétion d'ions bicarbonate (HCO_3^-) qui assurent la régulation du pH à l'origine du pouvoir tampon de la salive. Ainsi, le pH légèrement acide de la salive primaire va augmenter au cours de sa progression dans les canaux striés. Les canaux striés sont également le siège d'une production endocrine importante : NGF, EGF, TTF (facteur de transformation des thymocytes) et parotine (mainteneur du taux de calcium sérique).

Quant aux sécrétions protéiniques, elles proviennent essentiellement des cellules acineuses.

5. Mécanismes de contrôle de la sécrétion salivaire [13]

La régulation de l'activité des glandes salivaires est double. Un contrôle nerveux, par le système autonome neuro-végétatif, se fait grâce aux circuits utilisant des fibres parasympathiques et orthosympathiques, et une régulation hormonale existe aussi à l'aide d'hormones telles que les hormones androgènes, thyroïdiennes ou corticosurénaliennes.

5.1. Le contrôle nerveux

5.1.1. Le couplage excitation-sécrétion [1]

La sécrétion salivaire est déclenchée par la fixation des neurotransmetteurs sur leurs récepteurs membranaires. Le neurotransmetteur du système parasympathique, l'acétylcholine, se fixe sur des récepteurs muscariniques. Celui du système orthosympathique, la noradrénaline, se fixe lui sur des récepteurs adrénergiques alpha et béta.

Si toutes les cellules acineuses salivaires semblent posséder des récepteurs cholinergiques sur leur membrane basolatérale, il existe une variabilité importante concernant la présence des deux types de récepteurs adrénergiques. Ainsi, selon les glandes, la stimulation orthosympathique déclenche une salivation variable. Cependant, d'une façon générale, il est admis que l'activation du système parasympathique déclenche une sécrétion abondante d'une

salive fluide, tandis que celle du système orthosympathique déclenche une sécrétion moins abondante d'une salive visqueuse, riche en protéines.

5.1.2. La sécrétion salivaire réflexe (fig 4)[1,52]

La mise en jeu de la sécrétion salivaire réflexe peut résulter d'excitations directes lors de la mastication en stimulant des mécanorécepteurs desmodontaux d'une part et des récepteurs gustatifs d'autre part.

Les influx afférents issus des mécanorécepteurs desmodontaux empruntent le trajet des nerfs maxillaire (V₂) et mandibulaire (V₃) pour rejoindre le complexe sensitif trigéminal. De là, les influx se projettent sur les noyaux salivaires bulbaires.

Les influx afférents issus des récepteurs gustatifs empruntent quant à eux le trajet de trois nerfs crâniens (VII bis, IX et X) avant d'atteindre le noyau du faisceau solitaire qui se projette également sur les noyaux salivaires (figure 4).

La stimulation des récepteurs olfactifs, voire visuels et auditifs (réflexes conditionnés) est également capable de déclencher une salivation réflexe.

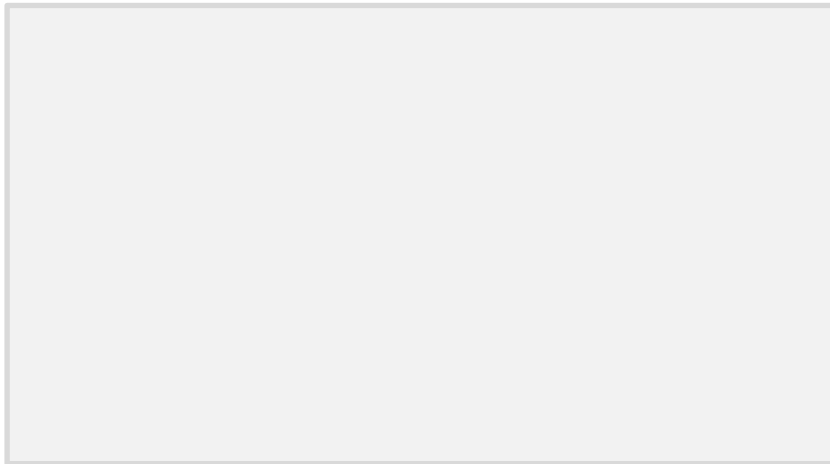


Figure 4 : contrôle neurologique de la sécrétion salivaire : reflex salivaire conditionné (48)

5.2. Le contrôle endocrinien [1,7]

Bien que l'activité sécrétoire des glandes salivaires soit en majorité sous la dépendance du système nerveux autonome, différentes études ont mis en évidence une influence hormonale (tableau 4).

Tableau 4 : Schéma simplifié des récepteurs androgènes (AR), des récepteurs d'œstrogènes (ER- α et ER- β) et des récepteurs de la progestérone (PR) dans les glandes salivaires de l'homme.

	<i>AR</i>	<i>ERα</i>	<i>ERβ</i>	<i>ER Non spécifié</i>	<i>PR</i>
Acini	+ 1,2	- 3,4	+ 4,5		+ / - 7
GCT	+ 2	- 3,4	+ 4,5	+ 6,7	+ 7
Canaux striés	+ 1,2	- 3,4	+ 4,5	+ 7	+ 7
Canaux excréteurs	+ 2	- 3,4	+ 4,5		+ 7

Le «+» indique la présence, le «-» indique l'absence, et le «+ / -» indique un résultat douteux.) 1 Morrell *et al* , 1987[53] ; 2 Laine *et al* , 1993 [54]; 3 Vadlamudi *et al* , 2005[55] ; 4 Ohshiro *et al* , 2006[56] ; 5 Williams *et al* , 2007[57] ; 6 Weinreb *et al* , 2009[58] ; 7 Ozono *et al* , 1992[59]

5.2.1. Le dimorphisme sexuel des glandes salivaires

Les glandes salivaires se développent différemment chez l'homme et la femme : chez l'homme, nous observons que les cellules des canaux striés sont plus abondantes. Chez le rat, le nombre de GCT est plus important chez le mâle que chez la femelle : on parle de dimorphisme sexuel. Il existe également des modifications de la composition salivaire par exemple la concentration en sodium de la salive au repos augmente jusqu'à quatorze ans chez l'homme puis plafonne, tandis que chez la femme cette concentration reste inchangée durant toute la vie. Chez le rongeur mâle l'EGF est 14 fois plus élevé que chez la femelle [20]. Il existe également une augmentation de l'activité enzymatique protéolytique chez le rat mâle.

5.2.2. Contrôle œstrogénique

Il a été démontré qu'il existait dans les glandes salivaires des récepteurs ER β mais pas de récepteur ER α [60].

Il a été démontré que les œstrogènes augmentent la sécrétion d'IGA dans la glande parotide [61].

Il a été montré que le traitement hormonal substitutif modifiait la sécrétion salivaire et sa composition en augmentant notamment la sécrétion salivaire (tableau 5).

De plus, l'œstradiol stimule dans les glandes submandibulaires l'expression de Mucine Mus 5B, chez l'espèce humaine [62]. Il induit aussi la sécrétion de certains polypeptides actifs (NGF, EGF, rénine et kallikréine) en proportions égales dans les glandes sublinguales et submandibulaires [63]. Ainsi, l'œstradiol est capable d'activer le récepteur de l'EGF à partir de la stimulation d'ER α membranaire, conduisant à la libération d'EGF [21].

Tableau 5 : effets du traitement hormonal substitutif sur les glandes salivaires et la flore bactérienne orale

Effets d'un traitement hormonal substitutif	Auteurs
Augmentation de la salivation	ship <i>et al</i> , 199[64] ; Hietala <i>et al</i> , 1993[65] ; Laine et Leimola-Virtanen, 1996[66] ; Eliasson <i>et al</i> , 2003[67] ; Yalçin <i>et al</i> , 2005[68]
Amélioration de la capacité tampon de la salive	Evio <i>et al</i> , 2006[69] Hietala <i>et al</i> , 1993[65] ; Laine et Leimola-Virtanen, 1996[66]
Augmentation de l'excrétion de peroxydase salivaire	Leimola-Virtanen <i>et al</i> , 1997b[70]
Diminution de la concentration du calcium salivaire	Sewon <i>et al</i> , 2000[71]
Moins de lactobacilles	Hietala <i>et al</i> , 1993[65] ; Leimola-Virtanen <i>et al</i> , 1997b[70]

5.2.3. Contrôle androgénique

Des études ont montré que la dihydrotestostérone (DHT) a un effet sur la composition totale en protéines salivaires [72]. L' α -amylase est sécrétée essentiellement dans la parotide (70%) mais aussi par les GCT des glandes submandibulaires des souris, et est sous l'influence des androgènes et les hormones thyroïdiennes. Il n'existe aucun dimorphisme sexuel sur l'activité de cette enzyme [50]. De même, la testostérone stimule la sécrétion de lipase [73]. Les kallikréines sont elles aussi sous l'influence des androgène [16]. De plus des études ont montré qu'une kallikréine, la tonine, est absente chez les femelles souris, ce qui suggère une œstrogène-dépendance de son expression [50]. La sécrétion de cystatine ou de proline varie en fonction de l'âge, impliquant une probable dépendance vis-à-vis des hormones stéroïdiennes (figure 5)[74]. Ainsi l'isoprotérol, un androgène de synthèse, semble stimuler la sécrétion de cystatine de type II et celle des PRP [16].

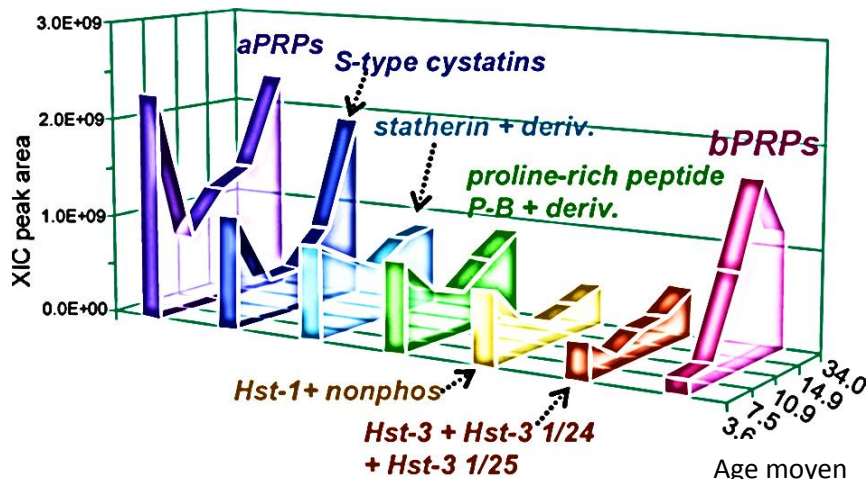


Figure 5 : variations qualitatives et quantitatives de la composition de salive en protéines avec l'âge, chez l'homme [74]

5.2.4. Les hormones thyroïdiennes

Il a été montré que la thyroïdectomie empêche le développement du poids de la glande sous maxillaire au court du développement et provoque des altérations morphologiques de la glande (notamment au niveau des TGC) [21]. En cas de thyroïdectomie ou d'hypofonction de la thyroïde, il existe une baisse de la quantité de salive sécrétée et une baisse du taux hormonal d'EGF au sein de cette salive. Par contre, l'EGF salivaire va être augmenté par les hormones thyroïdiennes [21].

5.2.5. Les corticostéroïdes

La surrénalectomie diminue la taille des canaux excréteurs de la glande submandibulaire. Il a également été montré que le cortisol était capable de rétablir la taille des TGC altérés par la castration [21].

Il semble ainsi que les hormones thyroïdiennes et surrénaliennes peuvent agir de la même façon sur les TGC, les androgènes agissant comme facteur additionnel ce qui expliquerait le développement plus important de ces cellules chez le mâle [21].

5.2.6. Les autres hormones (tableau 6) [1]

- *Le système rénine-angiotensine-aldostérone.* Il favorise l'excrétion salivaire du potassium et la rétention du sodium.
- *Rôle de l'hypophyse:* en cas d'hypophysectomie la production de salive diminue et la transformation du fluide au niveau des canaux striés est modifiée.
- *Les hormones de croissance :* elles agissent sur le débit et la composition salivaire en régulant la concentration du calcium.
- *La 5-hydroxytryptamine (5-HT) ou sérotonine* les chercheurs ont conclu que la sérotonine induit la libération de l'amylase en agissant sur les récepteurs sérotoninergiques spécifiques et que les niveaux d'hormones thyroïdiennes modifiait l'effet de la sérotonine [75].

Toutes ces hormones font donc plus que contrôler la sécrétion salivaire, puisqu'elles modifient la composition de ce fluide. Toute modification du statut hormonal va donc conduire à une modification de la composition et de l'action de la salive

Tableau 6 : contrôle endocrinien de la salivation (adapté de [1])

	Influence sur la sécrétion salivaire
Stéroïdes sexuels	Modifications anatomiques : dimorphisme sexuel chez le rat Augmentation de l'activité enzymatique protéolytique chez le rat mâle régulation des fonctions endocrines et exocrines des glandes salivaires
Hormones thyroïdiennes	Modifications morphologiques de la glande (structures sécrétrices) Régulation des activités protéolytiques de type enzymatique (rénine, kallibréine)
Insuline	Modifications morphométriques de la glande Rôle important sur l'activité de synthèse et de libération des protéines glandulaires

6. Dysfonctionnement des glandes salivaires et conséquences

6.1.L'hyposialie

L'hyposialie ou la diminution de la sécrétion salivaire est une affection fréquente dont le principal symptôme est la sécheresse de la bouche (xérostomie). Elle est définie par une sécrétion salivaire inférieure à 0,3ml/min au repos. Cette affection est à l'origine de toutes

sortes de problèmes oropharyngés, et comporte notamment un risque accru de caries et de candidose, de problèmes de déglutition ou de mastication, et de problèmes avec les prothèses dentaires. Tous ces ennuis supplémentaires peuvent avoir un impact négatif sur la qualité de vie. La xérostomie est plus fréquente chez les personnes âgées (incidence de 10 à 40%).

- *Les hyposialies médicamenteuses* (tableau 7) sont de loin les plus fréquentes [76] : la prise de tranquillisants, de neuroleptiques et de somnifères sont tous pourvoyeurs de bouche sèche et de troubles de la sensibilité linguale. Cette hyposialie est en principe transitoire mais il est en général impossible et parfois dangereux de supprimer ces médicaments.

- *La radiothérapie cervico-faciale* : durant la période d'irradiation une stomatite érythémateuse s'installe toujours. La xérostomie est constante au décours de l'irradiation. Si la radiothérapie est réalisée en modulation d'intensité, 6 à 8 mois plus tard une amélioration doit se manifester. Il reste néanmoins souvent une hyposialie avec excrétion d'une salive épaisse, blanche mousseuse caractéristique.

Tableau 7 : étiologies médicamenteuses de l'hyposialie : principales classes (JIM.fr)

- *Les affections auto-immunes* : il s'agit d'un groupe d'affections assez fréquentes dont l'étiologie est mal connue : il existe un trouble de l'immunité cellulaire humorale avec fabrication d'auto-anticorps. Une xérostomie évolutive apparaît diversement associée à d'autres manifestations similaires, notamment lacrymales et articulaires (polyarthrite rhumatoïde) et réalise alors le classique syndrome de Gougerot-Sjögren. Le tableau clinique

de ce syndrome de Gougerot-Sjögèren est en général celui d'une femme en période de ménopause avec sécheresse buccale, sécheresse oculaire et douleurs articulaires. La sécheresse buccale est rapidement invalidante. Sur le plan clinique après un bilan biologique standard, les tests de Waaler-Rose s'avèrent souvent positifs ainsi que la recherche d'auto-anticorps après un certain temps d'évolution notamment les anticorps anti-canaux salivaires, les anticorps anti-muscle lisse, les anticorps antithyroïdiens ou les anticorps anti-DNA.

6.2. Affections hormonales et salive

- *Diabète* : Les personnes souffrant de diabète présentent une xérostomie plus fréquente que les personnes saines [77]. Mata *et al* (2004) [78] ont montré que les patients souffrant de diabète ont une activité sécrétoire salivaire réduite, et une concentration en Ca^{+} élevée, contrairement à la concentration en Mg^{2+} , Zn^{2+} et K^{+} qui sont réduites par rapport aux sujets sains.

- *Obésité* : chez des enfants en surpoids et obèses, il existe une altération de la composition de la salive avec une diminution de la concentration en phosphates, une augmentation de l'acide sialique, une augmentation de la teneur en protéines salivaires et une diminution de l'activité peroxydasique, sans aucune variation du débit salivaire [79]. Il semble aussi que les obèses aient des glandes salivaires plus petites et secrètent moins de NGF [80].

- *Hypothyroïdie* : La thyroxine semble avoir un effet sur le débit et la composition salivaire. En effet, l'hyperthyroïdisme augmente le débit salivaire, la concentration du potassium et diminue la concentration totale en protéines et en calcium [21].

6.3. Variation de la salive chez la femme

Il n'a pas été constaté de modification du flux salivaire pendant le cycle menstruel. L'utilisation d'une contraception était responsable d'une augmentation du pouvoir tampon de la salive [81]. Chez la femme enceinte, une sialorrhée est fréquemment observée en début de grossesse au cours du premier trimestre. Ensuite, au cours des deuxième et troisième trimestres, on peut observer des signes de sécheresse buccale en rapport avec les changements hormonaux mais surtout avec des carences vitaminiques [82]. Il existe par contre une moindre sécrétion de salive chez la femme ménopausée. Une revue de la littérature réalisée par Meurman *et al* [83] montre que s'il existe des arguments pour penser que les traitements

substitutifs sont efficace pour restituer un flot salivaire plus important cette hypothèse n'est actuellement pas confirmée. Les variations salivaires sont donc probablement plus d'ordre qualitatif que quantitatif. Il semble donc que les hormones sexuelles interviennent dans la quantité et dans la qualité de la sécrétion salivaire.

6.4. **Sénescence et salivation** [3,84, 85,86]

La salivation subit l'influence du vieillissement qui se traduit par des modifications histologiques des glandes salivaires et des variations qualitatives et quantitatives de la salive. Les modifications histologiques liées au vieillissement s'observent au niveau des tissus de soutien et du parenchyme glandulaire.

Au niveau du tissu conjonctif de soutien, deux phénomènes concomitants apparaissent, une fibrose et une accumulation de graisse [3]. La fibrose se traduit par une augmentation de la quantité et de la densité des composants du squelette fibreux. Les fibres de collagène sont fragmentées et disposées de façon anarchique. Les fibres élastiques sont plus nombreuses, plus épaisses et fragmentées. Chez l'homme, le phénomène de fibrose est surtout visible au niveau des glandes submandibulaires labiales et des glandes muqueuses de la langue. Par ailleurs, un processus de remplacement des acini par du tissu adipeux s'observe progressivement avec l'âge. Cette manifestation du vieillissement, surtout décrite au niveau des glandes parotides, peut également concerner les glandes submandibulaires.

Au niveau des acini, le vieillissement induit une atrophie avec perte des granules sécrétoires, rétrécissement cellulaire et donc augmentation de la lumière canalaire [84]. Les canaux intralobulaires deviennent hyperplasiques et dilatés. À ces principales modifications s'ajoutent une infiltration lymphocytaire non inflammatoire au niveau du parenchyme et des canaux, ainsi que l'apparition de cellules particulières, les oncocytes, marqueurs du vieillissement chez l'animal [3].

Les modifications structurales des glandes salivaires liées au vieillissement devraient se répercuter sur la composition et le débit salivaire. Cependant, les résultats des études actuelles sont contradictoires. En effet, s'ils mettent en évidence une diminution du débit salivaire de repos chez le sujet âgé, principalement au niveau des glandes submandibulaires et labiales, aucune modification du débit, suite à une stimulation, n'est en revanche observée. Dans certains cas, le débit salivaire pourrait même être supérieur à celui d'un sujet jeune. La baisse du débit au repos serait probablement liée à une diminution de la stimulation des récepteurs de

la cavité buccale, en particulier des mécanorécepteurs desmodontaux et tendineux dont l'activité est directement liée au degré d'édentassions. La diminution du nombre des acini au cours du vieillissement n'aurait donc aucune répercussion notable sur le potentiel de sécrétion des glandes salivaires.

Si les conclusions s'orientent vers une relative stabilité du débit salivaire au cours de la vie, le vieillissement semble avoir des conséquences plus importantes sur la composition de la salive. Concernant les électrolytes, seule la concentration en ions sodium et en ions chlore diminuerait avec l'âge. En revanche, la concentration en protéines salivaires serait davantage modifiée, en particulier pour les mucines [85]. En effet, des études ont montré, chez le rat, que la synthèse des protéines diminue progressivement avec l'âge dans les glandes parotides et submandibulaires [84]. De même, des perturbations de la sécrétion protéinique salivaire ont été mises en évidence par des stimulations adrénérgiques sur les glandes submandibulaires et parotides de sujets âgés. Les résultats obtenus peuvent s'expliquer par une modification membranaire ou par une diminution du taux de protéines intervenant dans le codage au cours du vieillissement.

Aussi, les altérations des glandes salivaires, fréquentes chez le sujet âgé, apparaîtraient en raison de maladies systémiques (diabète, maladie d'Alzheimer et de Parkinson), de désordres immunologiques (syndrome de Gougerot-Sjögren), d'effets secondaires des traitements médicamenteux ou de la radiothérapie ; en effet, plus l'âge avance et plus la probabilité de développer une ou plusieurs pathologies chroniques augmente. Ainsi, la sécheresse buccale n'est pas directement liée au vieillissement, mais plus aux maladies affectant fréquemment les personnes âgées et/ou à leurs traitements.

6.5. Conséquences d'un dysfonctionnement salivaire

Les personnes atteintes d'un hypofonctionnement salivaire peuvent se plaindre :

- d'une sensation de bouche sèche [86-88] : Les patients se plaignent d'avoir une bouche «pâteuse», ce qui les oblige à ingérer fréquemment de petites quantités de liquide dans la journée (ils portent en permanence une petite bouteille d'eau sur eux). Leur sommeil peut également être perturbé par cette sensation désagréable et aussi par une polyurie en raison d'une consommation importante de fluides.
- d'une gêne à la phonation [87-89] : La salive favorise l'élocution en lubrifiant les surfaces dentaires et muqueuses. Les patients rencontrent alors des difficultés à parler pendant

de longues périodes (les longues conversations téléphoniques sont, pour eux, très pénibles). Aussi, la prononciation de certaines syllabes leur pose souvent des problèmes.

- d'une gêne à la mastication [88,89]: La salive ne joue plus son rôle de lubrification et d'hydratation de la nourriture ; les aliments collent aux surfaces dentaires et muqueuses. Le patient présente donc des troubles de la mastication, et ce, d'autant plus que l'alimentation est sèche.

- d'une gêne à la déglutition [86,89-91]: Sans salive, les aliments forment des morceaux difficiles à avaler et les patients sentent le besoin d'ajouter une gorgée d'eau au bol alimentaire pour son passage dans l'œsophage. Cette dysphagie contribue à une mauvaise ou sous nutrition des patients qui peut compromettre leur santé ; certains n'ont d'ailleurs pas le choix et ont recours à une alimentation semi-liquide, voire liquide. Les difficultés à avaler obligent donc ces patients à manger lentement et ne leur permettent pas d'ingérer tous les aliments, ce qui, pour certains, les empêche de sortir en collectivité et renforce leur isolement social.

- de troubles du goût : dysgueusie, voire agueusie [92,93]: La salive ne remplit plus son rôle de solvant nécessaire à la perception du goût ; celui-ci dépend effectivement de la dissolution des molécules et de leur transport vers les récepteurs gustatifs. Les patients peuvent quelquefois se plaindre d'avoir un goût métallique dans la bouche ou même « poivré».

- de difficultés du port des prothèses amovibles [94,95]: Le liquide d'interface représenté par la salive joue en effet un rôle important dans la rétention, la tolérance et l'intégration des prothèses. Les facteurs primordiaux semblent être l'épaisseur du film salivaire et sa viscosité. Le manque de salive associé au changement de sa nature diminue donc la rétention des prothèses amovibles et la tolérance tissulaire.

7. Conséquences de cette revue bibliographique sur la salive et les glandes salivaires

Nous avons donc mis en évidence que la salive est nécessaire au bon déroulement de l'homéostasie buccale. Nous avons mis en évidence qu'elle avait un rôle exocrine avec l'émission de salive mais aussi endocrine avec des actions à distance sur d'autres organes et paracrine (sur la sphère buccale) et que sa sécrétion était sous contrôle hormonal et notamment sous contrôle des hormones sexuelles.

B. Muqueuse buccale

1. Définitions

L'épithélium buccal fait partie des épithéliums de revêtement au même titre que l'épithélium cutané, digestif, ou vaginal. Ils sont dirigés vers l'extérieur et ont une fonction protectrice, contrairement aux épithéliums glandulaires qui sécrètent des substances vers le sang (endocrine) ou en dehors de l'organisme (exocrine).

2. Localisation (fig6)

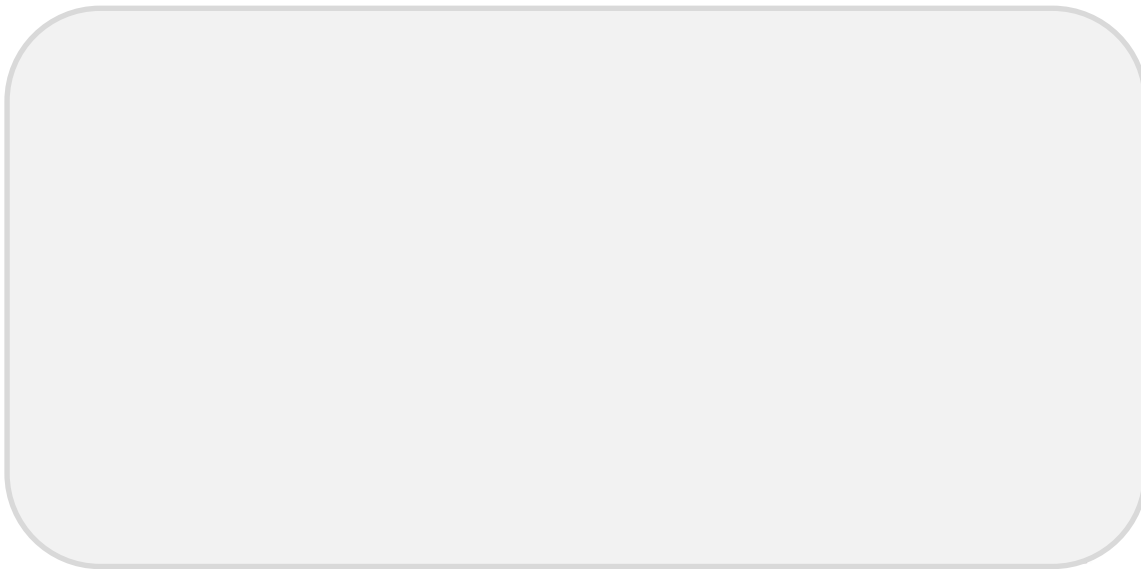


Figure 6 : la muqueuse buccale : localisation chez l'homme et le rat

La muqueuse buccale revêt la paroi interne des lèvres et la cavité buccale (figure 6). Elle est en continuité avec la peau au niveau du vermillon, versant externe des lèvres. Elle se poursuit en arrière avec la muqueuse digestive (pharynx) et respiratoire (larynx).

Fait particulier, elle est perforée par les dents au niveau des gencives et contracte ainsi une jonction étanche avec la dent.

En fonction de ses relations avec les structures osseuses ou musculaires sous-jacentes, on y individualise plusieurs territoires [96] :

- les lèvres, riches en muscles striés (en particulier l'orbiculaire), ont un versant exobuccal cutané et un versant interne muqueux riche en glandes salivaires accessoires (siège électif de la biopsie de ces dernières).
- la muqueuse jugale est séparée du muscle buccinateur par un tissu conjonctif et adipeux abondant avec de nombreuses glandes salivaires accessoires.

– La langue, organe très différencié, intervient non seulement dans la fonction du goût mais aussi dans la parole et la mastication. La muqueuse y repose sur une musculature constituée de faisceaux inter-croisés en tous sens. Sur son dos, elle présente de nombreuses papilles.

3. Histologie

La muqueuse buccale de l'homme et du rat sont similaires. La muqueuse buccale est revêtue d'un épithélium malpighien (couche de cellules cylindriques pluristratifiées) non ou peu kératinisé (la kératine étant une chaîne d'acides aminés dans les cellules des épithéliums de la peau et des muqueuses dont le but est de protéger l'épithélium des agressions extérieures).

De plus, elle tire son originalité d'une humidification permanente par la salive que sécrètent les nombreuses glandes salivaires accessoires qui lui sont annexées et du « turnover » très rapide [97] des cellules de son épithélium (25 jours au lieu de 50 à 75 jours pour l'épiderme, 3 jours pour les cellules intestinales et 4 jours pour les cellules vaginales). La muqueuse buccale est constituée d'un épithélium malpighien et d'un tissu conjonctif dénommé lamina propria ou chorion. La base de l'épithélium présente des irrégularités avec crêtes épithéliales entourant des papilles conjonctives. Entre l'épithélium et le tissu conjonctif, se situe la membrane basale, mesurant 1 à 2 μm d'épaisseur. Il n'existe pas, comme dans l'intestin, de limite nette entre muqueuse et sous-muqueuse.

Il est classique de décrire trois types de muqueuse buccale en fonction de sa topographie [98-100] :

- *la muqueuse bordante*, revêtant le versant muqueux des lèvres, des joues, du plancher buccal de la face ventrale de la langue et du palais mou, est flexible. Non kératinisée en surface, elle ne présente que des crêtes épithéliales basales peu accusées. Son chorion, très vascularisé, est connecté aux muscles sous-jacents par une sous-muqueuse de texture lâche;
- *la muqueuse masticatrice* qui tapisse gencives et palais dur, aide à la compression mécanique des aliments. Kératinisée en surface, solidement amarrée aux structures osseuses sous-jacentes (palais et os alvéolaire), elle présente des crêtes épithéliales longues s'invaginant profondément dans le tissu conjonctif. Ce dernier est riche en fibres de collagènes;
- *la muqueuse spécialisée*, cantonnée au dos de la langue, est kératinisée comme les muqueuses masticatrices. De plus, elle est pourvue de papilles intervenant dans la fonction gustative.

3.1. Aspect histologique de la muqueuse buccale non spécialisée

La muqueuse buccale comprend un épithélium stratifié, une membrane basale, la lamina propria ou chorion, la sous muqueuse et les muscles ou l'os mandibulaire ou maxillaire en fonction de la localisation de la muqueuse (figure 7).

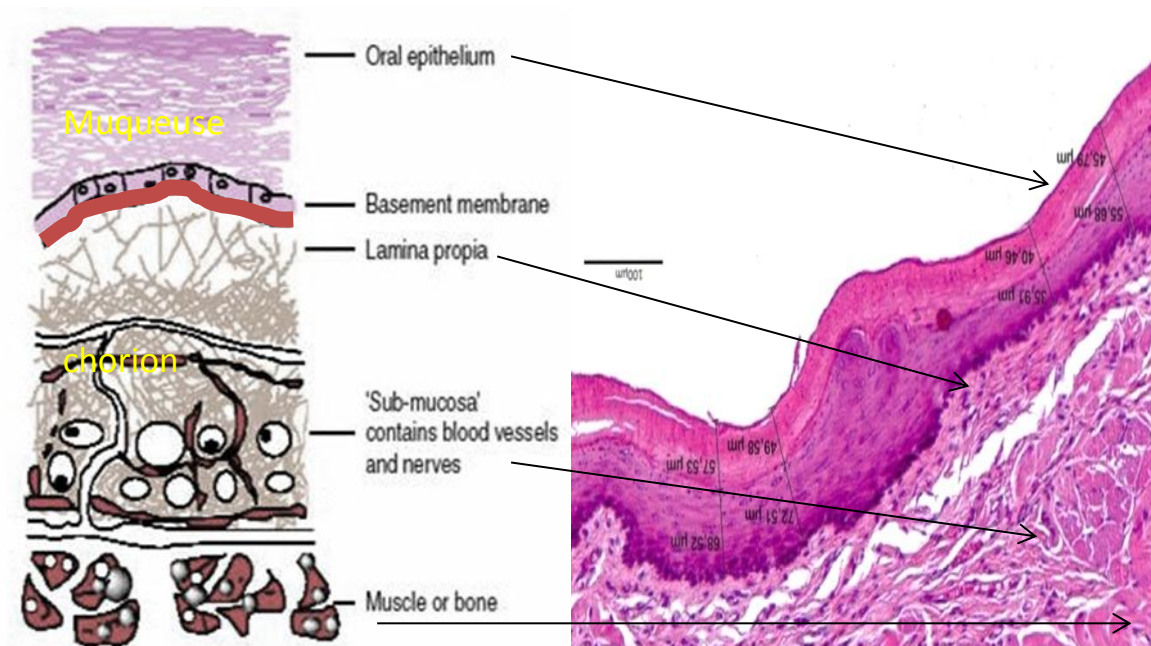


Figure 7 : la muqueuse buccale non spécialisée: schéma des différentes couches observées surcoupe histologique

L'épithélium buccal est un épithélium pavimenteux stratifié principalement constitué de cellules germinales, capables de se diviser et de produire constamment de nouvelles cellules (cellules épithéliales) ; des cellules en maturation qui se différencient progressivement vers la surface épithéliale ; mais aussi de cellules non épithéliales (cellules de Langerhans, mélanocytes ou cellules de Merkel).

3.1.1. Les cellules épithéliales [96,101]

L'aspect histologique varie selon que se produit en surface une kératinisation ou non.

Dans les zones kératinisées se superposent les couches suivantes (figure 8) :

- *le stratum germinatum* (couche basale ou germinative) repose sur la membrane basale. Les cellules, cubiques ou cylindriques, ont un gros noyau très chromophile. Elles sont disposées en une ou deux assises. Elles sont le siège de nombreuses mitoses ;

- *le stratum spinosum* (ou couche squameuse) est composé de cellules polygonales ou arrondies accrochées les unes aux autres par des ponts linéaires correspondant aux desmosomes ;
- *le stratum granulosum* (ou couche granuleuse) est formé de cellules aplaties renfermant dans leur cytoplasme de fines granulations de kératohyaline, colorées en violet par l'hématoxyline ;
- *le stratum corneum* (ou couche kératinisée) est constitué de fines squames acidophiles de kératine. Au sein de cette couche persistent souvent quelques noyaux résiduels pycnotiques, ou des espaces clairs représentant l'emplacement de noyaux dégénérés. Cet aspect caractérise la parakératose.

Dans les zones non kératinisées, la couche granuleuse est absente. Les cellules conservent jusqu'en surface un noyau rond et leur cytoplasme renferme un glycogène abondant, PAS + (acide périodique Schiff positif), disparaissant après digestion par l'amylase.

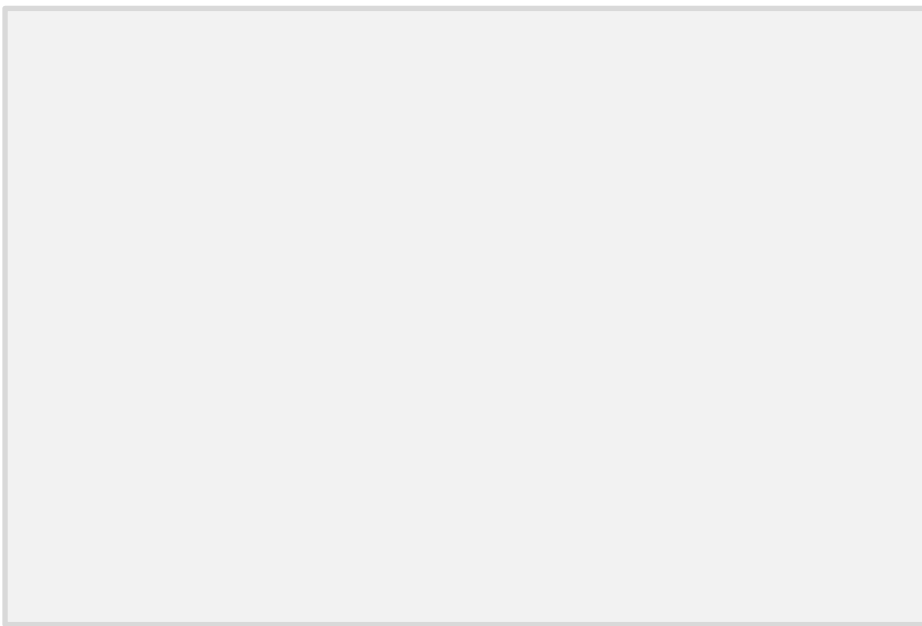


Figure 8 : schéma d'une coupe histologique de l'épithélium buccal

3.1.2. les cellules non épithéliales (fig 8).

- *Les mélanocytes* [102] naissent de la crête neurale ectodermique, ils migrent dans l'épithélium buccal comme dans la peau pendant l'embryogénèse (11e semaine). Dans leur cytoplasme s'édifient, sous l'influence d'une enzyme mélanogénétique synthétisée par les ribosomes, les prémélanosomes (grains ronds) puis les mélanosomes (ronds et striés longitudinalement) renfermant la mélanine. La mélanine protège l'ADN de l'oxydation.

- *Les cellules de Langerhans* [103] sont de proches parentes des macrophages, elles naissent dans la moelle osseuse et migrent dans l'épithélium en même temps que les mélanocytes pendant la vie embryonnaire. Le rôle immunologique de ces cellules est fondamental. Elles reconnaissent le matériel antigénique qui pénètre dans l'épithélium et présentent cet antigène aux lymphocytes T permettant ainsi l'immunité cellulaire.

- *Les cellules de Merkel* [104] sont sans doute dérivées de la crête neurale, elles sont situées dans l'assise basale de l'épithélium. On les observe dans la gencive et le palais. Elles renferment dans leur cytoplasme des granules contenant de nombreux neurotransmetteurs (substance P, vaso-active intestinal peptide (VIP), somatostatine, calcitonin-gene related peptide (CGRP), gastrin-releasing peptide (GRP), neuropeptide Y, peptide histidine-isoleucine (PHI), neurotensine, neurokinines A et B, bradykinine, acétylcholine, catécholamines, endorphines et enképhalines). Les cellules de Merkel joueraient un rôle sensoriel en libérant les transmetteurs aux fibres nerveuses adjacentes.

3.1.3. **Jonction épithélium-chorion : la membrane basale (figure 8)** [96]

Cette zone, où les papilles conjonctives alternent avec les crêtes épithéliales, est une zone fondamentale dans les échanges épithélio-conjonctifs. Tous les échanges entre conjonctif et épithélium se font par l'intermédiaire de cette membrane basale. Celle-ci sert d'attache aux kératinocytes et contrôle leur différenciation et leur renouvellement. Elle intervient également comme un filtre sélectif. Elle peut se modifier dans diverses circonstances pathologiques et devenir plus fragile (diabète, pemphigoïde bulleuse). Sa rupture est un facteur important dans l'invasion des cancers.

3.1.4. **Lamina propria ou chorion (figure 8)** [96]

C'est le tissu conjonctif qui sert de support à l'épithélium. On le divise en deux zones : superficielle (papilles associées aux crêtes épithéliales) et profonde, avec arrangement des fibres collagènes en réseau. Ce chorion renferme des fibroblastes, des vaisseaux sanguins, des nerfs, des fibres enchâssées dans une substance fondamentale amorphe et des cellules participant aux défenses immunitaires (lymphocytes, plasmocytes, monocytes, macrophages).

3.2. Muqueuse buccale spécialisée [105]

Les récepteurs (ou bourgeons) du goût sont principalement situés sur la langue. Il existe aussi des récepteurs secondaires situés au niveau du palais mou, du pharynx, de l'épiglotte et du tiers supérieur de l'œsophage.

3.2.1. Papilles gustatives (figure 9)

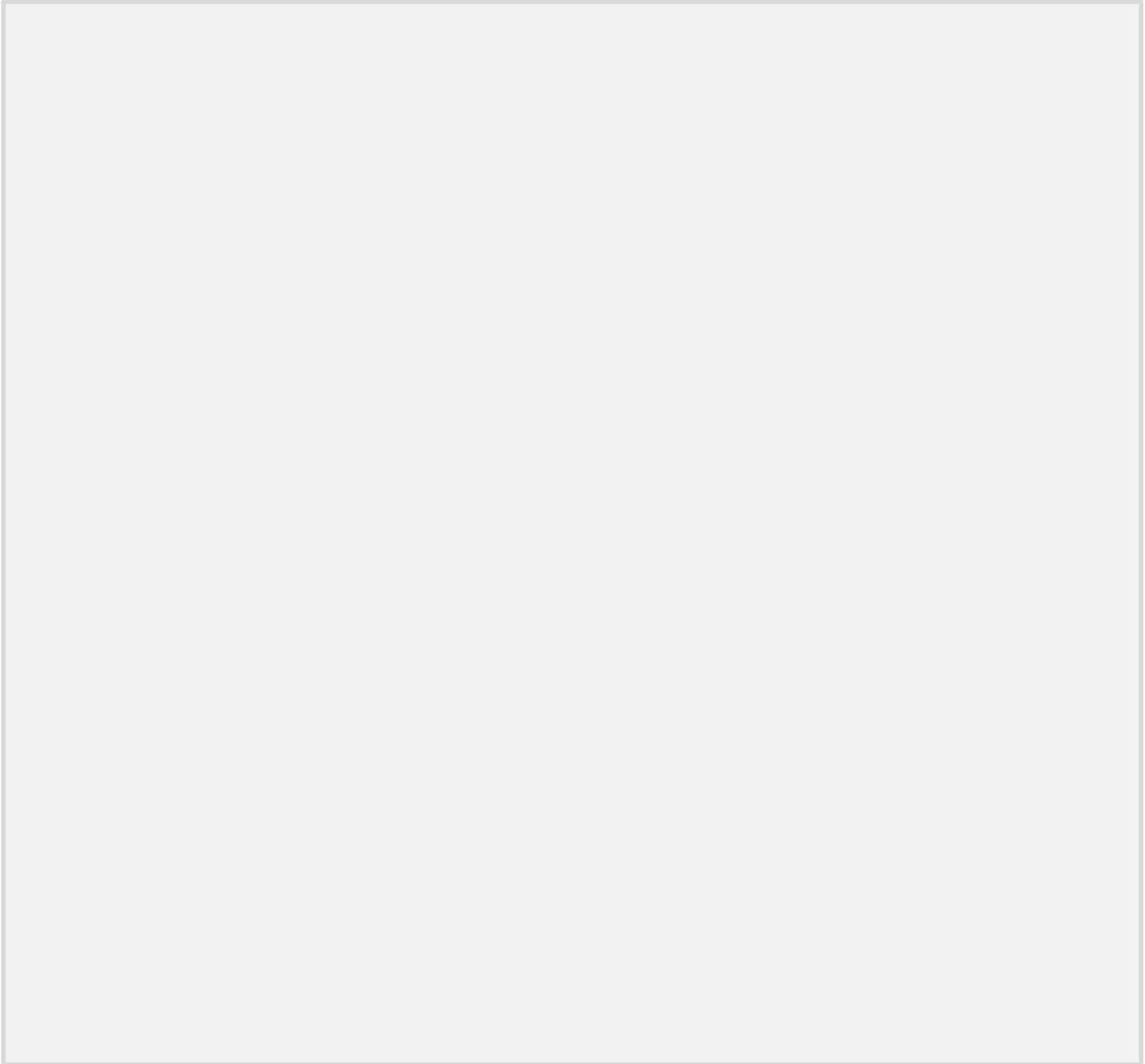


Figure 9 : localisation des papilles gustatives sur la langue et aspects histologiques des différentes papilles gustatives de la langue (a papille fongiforme b : papilles foliées, c papille caliciforme)
(<http://www.sciencesway.com/vb/showthread.php?p=93293>)

Au niveau de la langue, les bourgeons du goût sont situés dans les papilles gustatives elles-mêmes dissimulées dans la muqueuse buccale non spécialisée. Il existe 4 types de papilles dont 3 sont des papilles gustatives:

- *les papilles filiformes* sont les plus nombreuses, elles sont dépourvues de bourgeons du goût et sont formées de la simple surélévation de l'épithélium lingual par un axe conjonctivo-vasculaire.
- *les papilles fongiformes* sont des papilles gustatives siégeant sur le bord de la langue à sa partie antérieure. Les papilles fongiformes sont plus volumineuses, moins nombreuses et peuvent contenir des bourgeons du goût situés au niveau de leur partie superficielle. Chez l'homme chaque papille fongiforme contient environ 5 bourgeons alors que chez le rongeur il n'y a qu'un bourgeon par papille.
- *les papilles foliées* sont plus latérales et ont une forme de feuille.
- au niveau du V lingual on trouve *les papilles caliciformes*. Les papilles caliciformes sont exclusivement localisées au niveau du V lingual, limitées par un sillon circulaire nommé vallum entourant une surélévation centrale, les bourgeons du goût étant situés au niveau des faces latérales de la papille dans le sillon. chez l'homme ; elles sont environ 12. Chez le rat il n'en existe qu'une seule.

3.2.2. Bourgeons du goût (figure 10)

Les bourgeons du goût sont des groupes cellulaires microscopiques en forme d'oignon enfouis dans les cellules de la couche épidermique de la papille, mais ils n'émergent pas à la surface. Les bourgeons du goût contiennent des cellules réceptrices qui envoient les signaux correspondant aux caractéristiques gustatives au système nerveux central. Chez l'adulte, il y a environ 10 000 bourgeons du goût. Chaque bourgeon du goût est formé de trente à quatre-vingts cellules non nerveuses. Les cellules gustatives sont en nombre constant, et le renouvellement des cellules est continu (environ 10 jours chez le rat). Elles proviennent de la division des cellules basales dans le bourgeon du goût et de l'épithélium adjacent. La durée de vie moyenne d'une cellule du goût est d'environ 9-10 jours [106-107]. Les mécanismes exacts qui régulent le renouvellement cellulaire continu ne sont pas clairs, bien qu'il ait été établi que le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF) est un facteur crucial pour le développement initial des papilles gustatives [108]. Ces cellules sont sensibles à la saveur du contenu de la bouche par l'intermédiaire d'étroits et courts pores gustatifs.

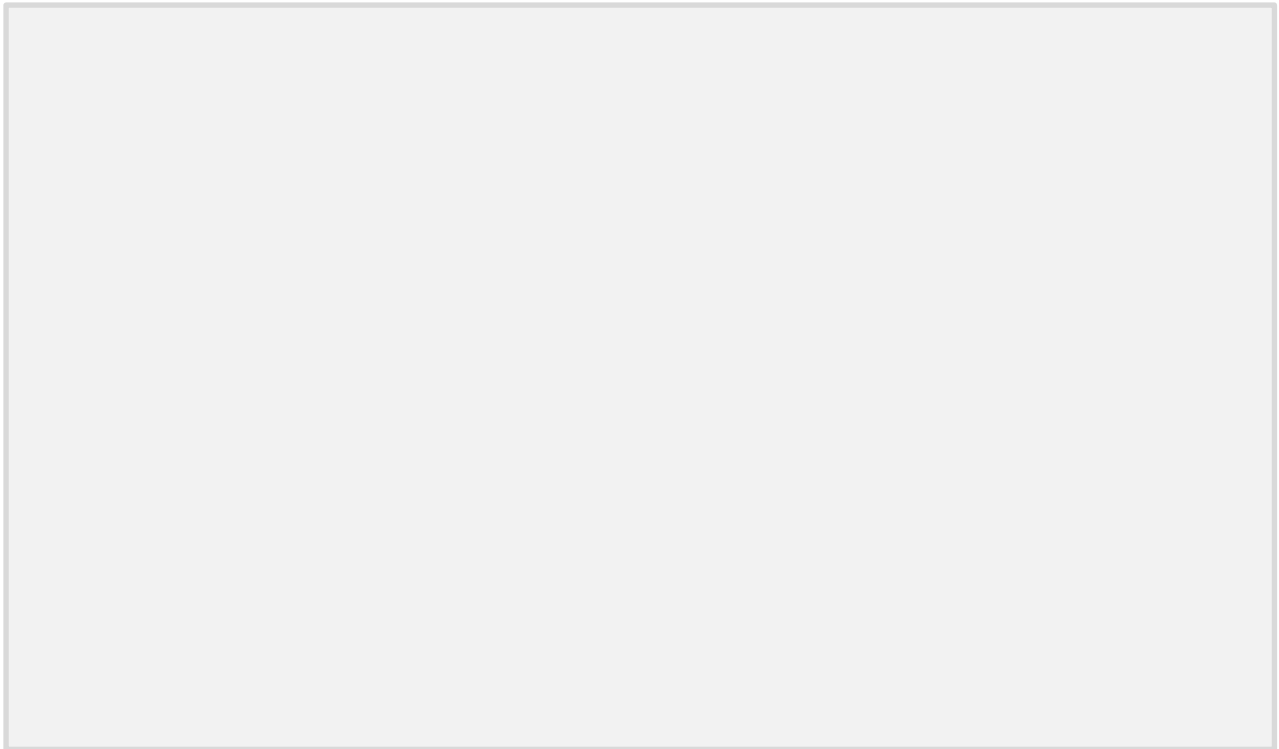


Figure 10 : bourgeons du goût d'après Pruves [105,118] : aspects histologiques d'une papille contenant des bourgeons (a) et schéma d'un bourgeon du goût (b) (1 type 1 ; 2 type 3, 3, type 2, 4 type 4, 5 premier neurone)

Les bourgeons du goût chez les mammifères sont constitués de quatre types de cellules gustatives noté type I, type II, type III et type IV [109] (figure 10) :

- Les cellules de type I sont situées à la partie externe du bourgeon et représentent 60 à 80 % du nombre total de cellules. Nombre de chercheurs pensent que ce ne sont pas des cellules sensorielles, mais qu'elles agissent comme un support pour les autres cellules.
- Les cellules de type II sont plus centrales et représentent 15 à 30 % du nombre total de cellules. Elles sont considérées comme les cellules primaires récepteurs sensoriels et expriment généralement les éléments de transduction chimiosensoriels, tels que la gustducine couplée aux récepteurs T1R et T2R des récepteurs gustatifs [110-112].
- Les cellules de type III (7 à 14%) également centrale sont afférentes et ont un contact synaptique avec les cellules nerveuses et sont généralement considérées comme des cellules neuronales de sortie.
- Les cellules de type IV sont basales. Il s'agit de cellules progénitrices qui se divisent rapidement. Les cellules se différencient en type I, type II ou cellules de type III [109].

3.2.3. Les Récepteurs gustatifs

Depuis les travaux de Brillat-Savarin sur la physiologie du goût en 1826, on classe les perceptions gustatives selon un nombre restreint de catégories : le sucré, le salé, l'acide, l'amer et, depuis plus récemment, l'umami ou glutamate, on décrit également le gras. Les goûts « acide » et « salé » sont modulés par les canaux ioniques et les goûts « sucrés », « umami », et « amer » sont transduits par des G-récepteurs couplés aux protéines (figure 11).

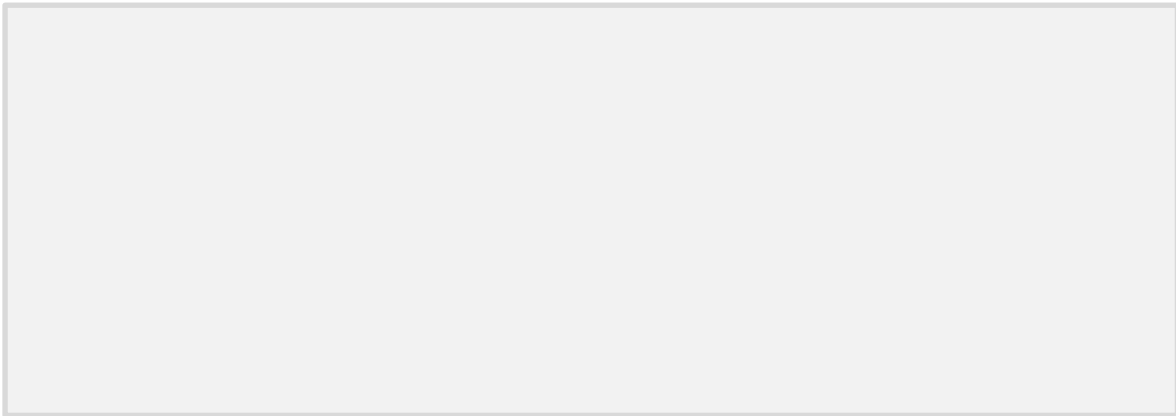


Figure 11 : canaux (Na⁺ et H⁺) et récepteurs des différentes perceptions gustatives [113]

- *Gras* : la protéine CD36, également appelée « fattyacid transporter » (FAT), est une protéine membranaire, qui possède une poche extracellulaire pouvant fixer avec une forte affinité jusqu'à 3 AGLC (acide gras à longue chaîne) [114]. Elle a été identifiée au niveau de la papille caliciforme chez le rat [115] et chez la souris. Le CD36 a un positionnement idéal pour exercer une fonction de lipidorécepteur, puisqu'il est spécifiquement trouvé au niveau de la partie apicale de certaines cellules neurosensorielles des bourgeons du goût [116].

- *Sucre, umami, amer* : La reconnaissance des goûts « sucré », « amer » et « umami » semble liée aux récepteurs T1Rs, une famille de récepteurs couplés à des protéines G, codés par 3 gènes : T1R1, T1R2 et T1R3[105]. Le goût sucré est plus spécifiquement lié au T1R3 et T1R2. Le T1R3 est capable de répondre aux stimulations sucrée seules mais seulement à forte dose ou pour les sucres artificiels. Le goût « umami » nécessite les T1R1 et T1R3. Le goût amer est lui, sous la dépendance des récepteurs T2Rs (il en existe une trentaine ; les cellules gustatives sont sensibles à la plupart d'entre eux). Ces récepteurs sont également présents au niveau de la paroi gastro-intestinale où ils pourraient intervenir sur le réflexe vomitif.

Lorsque les saveurs se lient à leurs récepteurs (fig12B), les récepteurs T1Rs déclenchent une cascade de transduction où intervient une protéine G, cette transduction du signal provoque

l'activation d'une isoforme de phospholipase C ($PLC_{\beta 2}$) d'où une augmentation de la concentration d'inositol phosphate (IP_3) et l'ouverture de canaux calciques ($TRPM_5$) entraînant du fait de l'augmentation du calcium intracellulaire la dépolarisation de la cellule gustative. Pour la liaison T2Rs, les cellules gustatives contenant ce récepteur contiennent comme protéine G de la gustine.

- *Sel, acide* : Les recherches sur les récepteurs au NaCl sont encore à leurs balbutiements. Parce que l'amiloride est un puissant inhibiteur du canal sodique épithélial (ENaC), ENaC a été proposé comme une composante du récepteur au goût salé[117]. Lorsque la concentration en sodium augmente (que nous mangeons salé) les ions Na^+ diffusent à l'intérieur de la cellule et provoquent un courant qui dépolarise la cellule ce qui va provoquer la libération de neurotransmetteurs dans les fibres nerveuses transportant l'information jusqu'au cerveau (fig 12B). Concernant les ions H^+ ils se comportent soit comme le sodium, soit en bloquant les canaux potassium des cellules gustatives.

3.2.4. Physiologie gustative (fig12A)

Les différents goûts perçus ont une action directe sur la stimulation des ions de la membrane des cellules neuroépithéliales de la papille et le résultat est la génération d'un potentiel d'action électrique sur les neurones et le cheminement de l'information jusqu'au cortex cérébral.

Les seuils de perception diffèrent selon la topographie, pour chacune des saveurs primaires. Contrairement à ce qui est souvent dit, chaque bourgeon est capable de percevoir plusieurs modalités gustatives à des degrés divers. La transduction du signal aboutit à l'entrée de calcium dans la cellule par le biais d'une dépolarisation de la membrane cytoplasmique. Le signal est alors transmis par une fibre nerveuse *via* la corde du tympan pour les deux tiers antérieurs de la langue, le nerf glossopharyngien pour le V lingual et le nerf pneumogastrique pour le pharynx et l'épiglotte. Puis, il arrive au noyau du faisceau solitaire dans le tronc cérébral, et est transmis au noyau ventro-postéro-médian du thalamus puis au cortex au niveau de l'opercule frontal et l'insula.

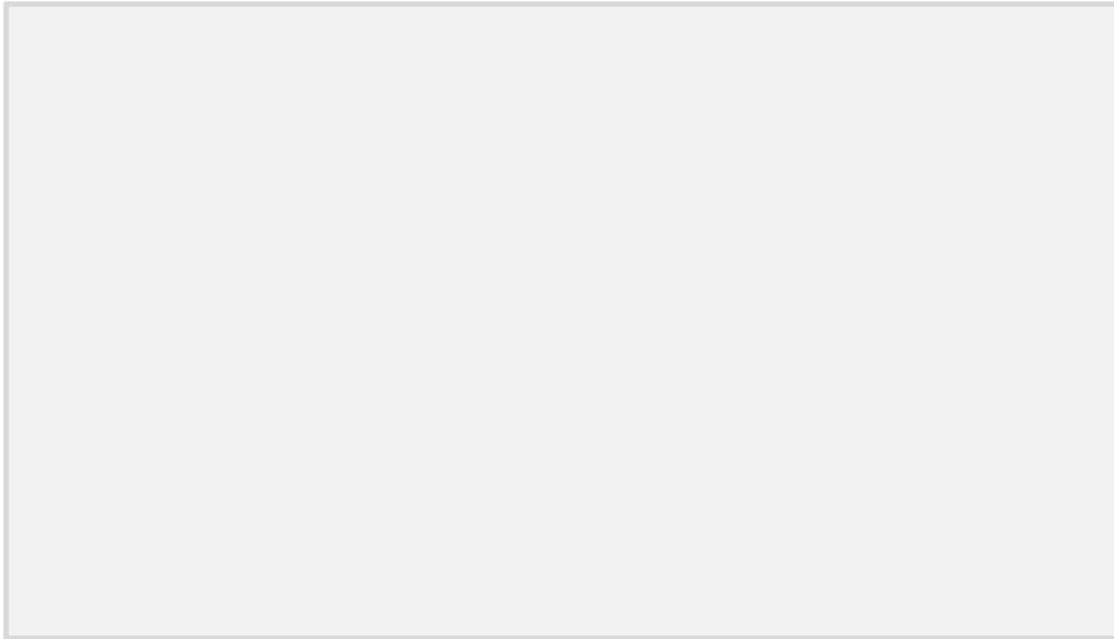


Figure 12: A) Anatomie du système gustatif chez la souris. Localisation et innervation des papilles gustatives [116] et B) mécanismes déclenchant un potentiel d'action neuronal responsable de la perception du goût [118]

4. Régulation de la muqueuse buccale

La prolifération de l'épithélium ainsi que sa différenciation, sa maturation et sa kératinisation sont sous l'influence de différents facteurs comme des facteurs mécaniques (frottements, traumatismes) mais aussi hormonal.

4.1. Facteurs de croissances

Les hormones ou neuropeptides par leurs actions au niveau des bourgeons gustatifs vont moduler la perception du goût, en permettant un bon fonctionnement des bourgeons du goût, en modifiant la capacité des récepteurs à déclencher un potentiel d'action, notamment pour le sucré et l'amer .

- *L'EGF et TGF α* se sont avérés être mitogènes pour l'épithélium, ainsi que pour de nombreux autres types de cellules (cerveau, foie sein ...) [119-121]. Toutefois, l'EGF et le TGF α servent aussi de médiateurs pour la différenciation épithéliale et la maturation [122]. Les principales actions de l'EGF et du TGF α sur l'épithélium stratifié sont une augmentation de la stimulation de la prolifération épithéliale et la kératinisation [119]. Ainsi l'EGF et le TGF sécrété par les glandes salivaires auraient un effet paracrine sur la trophicité de la muqueuse [123].

Concernant les bourgeons du goût, l'EGF dans la salive est responsable de leur entretien et de leur morphologie normale [124].

Une étude montre qu'il existe une diminution des papilles fongiformes chez les rats chez qui on a enlevé les glandes submandibulaires [125]. Cette diminution pourrait être le résultat d'un déficit en EGF touchant soit la prolifération soit la différenciation des précurseurs des cellules gustatives des bourgeons. En effet, après perfusion d'EGF, il a été constaté une inversion de l'effet observé après submandibulectomie. De plus il a alors été constaté une augmentation de la taille des papilles fongiformes. Dans cette étude EGF, TGF α et EGFR ont tous été localisés par immunofluorescence à l'intérieur du bourgeon du goût. L'EGF a été identifié à proximité du pore gustatif, EGFR a été identifié dans les cellules épithéliales de la papille mais également dans toutes les cellules du bourgeon, ils étaient plus nombreux à proximité du pore gustatif. Quant au TGF, il était présent dans toutes les cellules du bourgeon gustatif. Son expression à l'intérieur des bourgeons n'était pas modifiée par l'ablation de la glande salivaire suggérant une autre source de production. Cette étude ainsi que celle de Noguchi (1991) conclue que l'effet de l'EGF au niveau des bourgeons du goût est plus d'origine endocrine que paracrine.

- *Le TGF β* diminue la prolifération et provoque de la fibrose en sous muqueux en diminuant la proportion de tissu adipeux.

4.2. Hormones peptidiques :

4.2.1. **Glucagon-like peptide 1 (GLP-1)** [124])

Le GLP-1 est synthétisé dans les cellules endocrines L de l'intestin et régule de nombreux processus physiologiques, y compris la sécrétion d'insuline, la vidange gastrique, la survie des neurones (et l'intérêt en cas de neuropathie diabétique), et la contractilité cardiaque [126, 127]. Si sa présence a été mise en évidence dans la salive, son lieu de sécrétion glandulaire n'est pas établi dans la littérature. GLP-1 est exprimé dans deux populations distinctes de cellules gustatives: un sous-ensemble de cellules de type II qui co-expriment T1R3 et un sous-ensemble de cellules de type III [128, 129]. Les souris dépourvues du récepteur au GLP-1 ont considérablement réduit la sensibilité gustative à la fois au saccharose et aux édulcorants [128,130]. Cela indique que le GLP-1 produit dans les cellules gustatives joue un rôle important dans la sensibilité du goût sucré et umami.

4.2.2. Peptide intestinal vasoactif (VIP)

Découvert dans la paroi du duodénum, il est connu pour être un vasodilatateur, relaxant musculaire, et un stimulateur de l'activité sécrétoire (impliqué dans la sécrétion de prolactine il pourrait participer au dimorphisme sexuel de la sécrétion [131]. Plus récemment, la présence de VIP a été identifiée dans les cellules gustatives chez le rat, le hamster, la carpe, et chez l'homme [132-134]. Shen *et al* [135], ont montré que la majorité des cellules gustatives VIP-immunoréactives étaient co-localisées avec l' α -gustducin (qui est impliqué dans la modulation à la fois du sucré et de l'amer), ou avec les T1R2 (sucre) Ainsi, si le rôle du VIP n'est pas parfaitement connu, il semble probable qu'il soit impliqué dans la transduction des stimuli amers et sucrés [135].

4.2.3. Cholécystokinine (CCK)

La cholécystokinine (CCK), est un peptide libéré après la prise alimentaire et qui favorise le processus de satiété *via* l'activation du nerf vague [136], il a également été montré qu'elle variait durant le cycle œstral et sa probable régulation par les œstrogènes. La CCK a été identifiée dans les cellules endocrines de l'intestin grêle, ainsi que dans les neurones périphériques et centraux. Elle joue un rôle dans la régulation de la motilité gastrique et la sécrétion d'enzymes pancréatiques. L'expression de la CCK a été rapportée dans les cellules gustatives chez le rat, le hamster, la grenouille, et l'homme [132-134]. Il semble que la CCK joue un rôle dans la communication au sein de la papille gustative et module ainsi la perception du goût [135]. Elle est régulée par les hormones stéroïdiennes et est notamment induite par les œstrogènes.

4.2.4. La leptine

La leptine agit comme un puissant facteur d'inhibition contre l'obésité en régulant la dépense énergétique, l'apport alimentaire et l'adiposité. Il a été montré que qu'un sous-ensemble de cellules réceptrices du goût présentent le récepteur Ob-R site d'action de la leptine. Elle aurait essentiellement un rôle dans la détection des substances sucrées [137]. Elle aussi est sous dépendance des œstrogènes.

4.2.5. Le neuropeptide Y (NPY)

Dans le goût Le NPY est largement distribué dans le cerveau des mammifères et est l'un des facteurs les plus puissants orexigènes [138]. NPY pourrait jouer un rôle important dans le

traitement de l'information et régulation autocrine / paracrine des cellules gustatives [139].
 Tout comme le GLP-1 il existe un dimorphisme sexuel sur sa régulation hypothalamique

La localisation des peptides sur les cellules du goût sont présenté dans le tableau 8

Tableau 8 : localisation des hormones ou neuropeptides dans les cellules gustatives
 (d'après Martin) [124])

	Type I	Type II	Type III	Type IV
GLP-1		X (rat, souris, singe)	X (rat, souris, singe)	
VIP		X (rat)		
CCK		X (rat)		
La leptine-R		X (souris)		
NPY		X (rat)		

4.2.6. Autres hormones.

Il semble également que l'insuline, les hormones thyroïdiennes et l'ACTH augmentent l'activité et le nombre de cellules épithéliales [140] mais ces effets n'ont été que peu étudiés.

4.3. Les hormones sexuelles

4.3.1. Dimorphisme sexuel

Le dimorphisme sexuel est peu étudié sur l'épithélium buccal. Cependant, le dimorphisme sexuel observé dans les taux de guérison par voie cutanée a été lié à des effets de modulation des hormones sexuelles sur le processus de guérison, en particulier sur l'inflammation [141-143]. Dans l'ensemble, hommes semblent guérir moins vite que les femmes [144-146]. Inversement, il semble que les tissus muqueux des hommes guérissent plus rapidement que ceux les femmes [145]. Cela a été associé à une inflammation des tissus plus importante chez les femmes que chez les hommes. Chez le rat, il a été démontré que les mâles avaient plus de bourgeons du goût [147], que les femelles. Il existe également un dimorphisme sexuel au niveau des préférences gustatives laissant suspecter une influence des hormones sexuelles. Il existe un dimorphisme sexuel au sucré, avec à l'âge adulte, une moindre préférence au sucré

chez la femme [148] et une préférence augmentée au sel par rapport à l'homme [149]. De plus, les rats femelles ont un seuil de discrimination inférieur de l'acide linoléique (environ 2,75 μM LA) à celui des rats mâles (environ 11 μM LA) même si aucune différence de préférence gustative n'est mise en évidence.

4.3.2. Effets des œstrogènes

. Il a été démontré que les œstrogènes modifiaient l'état de l'épithélium avec une augmentation de la maturation et de la kératinisation [150]. Si dans la peau l'effet des œstrogènes fait essentiellement intervenir $\text{ER}\alpha$, dans la muqueuse buccale comme au niveau des glandes salivaires on retrouve essentiellement des récepteurs des œstrogènes de type β mais peu de type α (photo3) [60].

. Le rôle des hormones sexuelles sur l'épithélium buccal est peu étudié. Les hormones sexuelles, en particulier les œstrogènes jouent un rôle dans l'inflammation des muqueuses [151] comme cela a été démontré à la fois dans la gingivite [152] et dans les parodontites [153], ce qui suggère qu'ils sont mécaniquement liés à la cicatrisation des plaies de la muqueuse. Par rapport au tissu cutané, le tissu muqueux guérit beaucoup plus vite avec moins d'inflammation [154,155,156]. Cela donne à penser que le niveau de l'inflammation nécessaire pour une guérison optimale est plus faible dans le tissu muqueux.

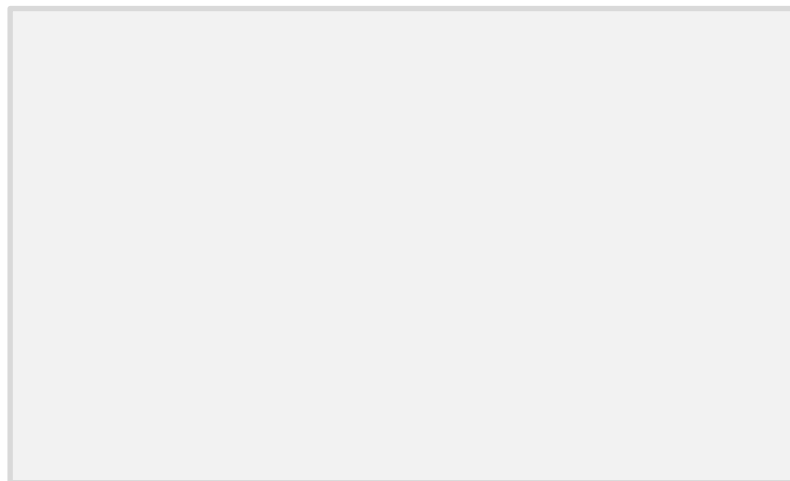


Photo 3 : marquage de l'épithélium buccal par $\text{ER}\alpha$ (A) et $\text{ER}\beta$ (B)

L'œstrogène favorise la préférence au salé en abaissant le seuil de détection du sel [157]. Ainsi, chez le mâle une exposition chronique aux œstrogènes à l'âge adulte entraîne une augmentation de la préférence au salé traduisant une féminisation du comportement alimentaire [158, 159].

Il existe également une variation de la préférence au sucré et au salé en fonction du cycle menstruel [160]. De plus les femelles ménopausées ou ovariectomisées ont tendance à préférer le sucre alors que la femme en cours de grossesse en consommerait moins [161].

De plus, Toyoshima [162] a démontré qu'il existait dans les papilles caliciformes du rat les localisations et les modes d'expression des enzymes clés de la stéroïdogénèse, le cytochrome P450 side-chain-clivage (P450scc), et P450 aromatasase, en utilisant des analyses immunoblot et immunohistochimie. Il semble que l'œstrogène ait une action directe via ces cibles. Cette étude montre aussi que les œstrogènes pourraient intervenir dans un sous-ensemble de cellules de type II. Bien que la pleine signification de la fonction de l'œstrogène dans les bourgeons du goût ne soit pas encore bien comprise, l'œstrogène semble être un régulateur important dans la transduction du goût [162]. Lors du vieillissement, il a été constaté un déficit dans la cicatrisation des plaies des muqueuses chez les femmes âgées [145] par rapport aux femmes jeunes impliquant des changements post-ménopause avec la chute des taux d'œstrogènes et de progestérone.

De plus, nous avons vu que les œstrogènes étaient responsables d'une augmentation d'EGF. Ce dernier par action paracrine va favoriser la prolifération cellulaire la maturation de l'épithélium et le bon fonctionnement des bourgeons du goût .

4.3.3. Effets des androgènes

Peu d'études se sont intéressées à l'action des androgènes sur la muqueuse buccale. Hornstein [163] constatait que la carence en testostérone après castration chez le rat ne modifiait pas la synthèse d'ADN de l'épithélium.

Il a été montré que la testostérone a généralement des propriétés immunosuppressives et anti-inflammatoire [164-166]. Elle réduit les niveaux d'IL-6, mitogène pour les kératinocytes et apparaît nécessaire pour que la ré-épithélialisation puisse se produire en temps opportun [142]. Engeland [167] constate chez l'Homme que les faibles taux de testostérone se rapportent à une période de guérison plus rapide chez les jeunes hommes.

La testostérone modifie le goût en modifiant la composition salivaire : nous avons vu précédemment que l'amylase, la lipase, les kalicréines les cystatines et les PRPs étaient sous la dépendance de la testostérone. Lors du vieillissement on constate une baisse des taux de testostérone et de guérison de l'épithélium buccal [145].

4.3.4. Progestérone

Concernant la progestérone, cette dernière peut favoriser l'inflammation [153,168,169], en intervenant sur l'IL6. Elle contrôle aussi la perception du goût en favorisant l'aversion pour le goût amer.

5. Pathologies de l'épithélium

5.1. Pathologies de l'épithélium buccal et dysfonctionnement salivaire

En cas d'hyposialie, les muqueuses orales [29, 87, 89] sont rouges, vernissées, recouvertes d'un enduit mucoïde, blanchâtre et collent au miroir. La langue est lisse car dépapillée et prend un aspect fissuré. Quant aux lèvres, elles apparaissent sèches, fendillées et la perlèche angulaire est constante. Cet état des muqueuses va favoriser la colonisation bactérienne et être responsables de pathologies décrites ci-dessous.

- *Les candidoses* [92, 170] sont le résultat de la colonisation, en masse, de la bouche par un champignon dont la présence y est naturelle : *Candida Albicans*, surtout au niveau de la langue et du palais. Divers aspects sont observés : glossite érythémateuse dépapillante, muguet, perlèche et érosions muqueuses, kératose, langue noire villositaire... Ces candidoses récidivantes sont favorisées par la diminution du pH de la salive et des IgA.

- *Les caries* [171, 172]. Il s'agit de caries rampantes dues à une déficience du pouvoir tampon de la salive. La concentration et la multiplication de bactéries cariogènes, l'augmentation de leur activité acidogène ainsi que la réduction de la vitesse d'élimination des sucres à la surface des dents et l'absence du nettoyage mécanique par le flux salivaire expliquent l'apparition de ces caries extrêmement destructives. Ces caries sont le plus souvent asymptomatiques.

- *Parodontopathie* [172]. Une quantité insuffisante de salive peut conduire à l'usure des gencives. Des formes de gingivites chroniques sont principalement observées, et plus rarement des parodontites ulcéro-nécrotiques avec résorption osseuse et perte des dents. L'absence de mastication fragilise également les tissus de soutien en limitant l'activité musculaire.

5.2. Troubles du goût [173]

5.2.1. Classification et origine des troubles

Les troubles gustatifs peuvent être catégorisés de différentes façons : d'abord l'agueusie (absence totale du goût), l'hypogueusie (diminution du goût) et la dysgueusie (altération du goût). Cette altération du goût peut être de nature aliagueusique (au moment des repas), ou phantoguesique (se produire à n'importe quel moment de la journée). Les différentes subdivisions d'altération du goût sont : la cacoguesie (goût exécrable), la torqueguesie (goût chimique: très salé, amer, métallique, brûlé), la paraguesie ou l'hétéroguesie (goût non usuel plus ou moins plaisant) et mixte.

La perte du goût peut amener des problèmes comme l'inappétence avec comme conséquence la perte de poids, et des carences nutritionnelles, carences qui peuvent à leur tour provoquer une perte du goût. Dans des cas plus sévères d'altération du goût, il est possible de noter une augmentation du stress, de l'anorexie ainsi que de la dépression.

Les mécanismes pathogéniques potentiellement associés aux désordres du goût sont une atrophie locale des papilles gustatives, une rupture ou une blessure de cause physique ou chimique; un dommage causé aux projections des neurones; un déséquilibre du cycle de régénération cellulaire ou une modification des récepteurs en raison d'un changement chronique dans l'environnement local comme la salivation [174, 175].

Comme nous l'avons vu, la salive est l'agent solubilisant des saveurs leur permettant de faire un meilleur contact avec les papilles gustatives. Elle apporte également les protéines, hormones et peptides permettant le bon fonctionnement des bourgeons du goût . Toute altération de la salive, en quantité ou qualité conduira à modifier le goût. La xérostomie peut être due à différentes causes, iatrogéniques par l'intermédiaire des médicaments ou de radiothérapie [176, 177], ou immunitaires (comme la maladie de Gougerot) [178].

5.2.2. Médicaments et troubles du goût [179, 180]

La diminution du flux salivaire (ou xérostomie) est un problème rencontré avec la prise de médicament à action anticholinergique ou adrénolytique. Elle est aussi associée à une diminution du goût [181, 182].

Divers mécanismes physiopathologiques sont à l'origine des distorsions gustatives induites par les médicaments. En altérant l'homéostasie corporelle, les médicaments entraînent une cascade d'événements tant d'ordre biochimique que d'ordre chémosensoriel. Ces changements biologiques peuvent donc modifier les perceptions sensorielles puisqu'il y a bris

de l'équilibre requis pour le fonctionnement normal des papilles gustatives. Les hypothèses avancées sont multiples et complexes : déficience en zinc (par chélation), altération du métabolisme du zinc (au niveau moléculaire), altération des interactions du zinc comme cofacteur de la gustine (protéine des papilles gustatives qui maintient l'homéostasie et l'intégrité des chémorécepteurs gustatifs), excrétion du médicament dans la salive, inhibition de la régénération des cellules gustatives, interférence avec le second messager, interférence avec le cytochrome P-450 réductase, modification des flux ioniques des canaux calciques ou sodiques, inhibition de l'AMPc, lésions de la double membrane cellulaire lipidique, etc. Les médicaments influant sur les troubles du goût, par modification salivaire ou atteinte neuronale ou épithéliale sont rapportés dans le tableau 9.

Tableau 9 : médicaments responsables de troubles du goût

DYSGUEUSIES IATROGENES		
HYPOGUEUSIE	AGUESIE	DYSGUEUSIE
Allopurinol Carbimazole Clofibrate Diazoxide Griséofulvine Pénicillamine	Allopurinol Amphotéricine B Baclofène Enalapril Nifédipine Oxyfrédrine Chlrhydrate Penicillamine Phénytoïne Propranolol Propylthiouracile	Bamifylline Captopril Carbamazépine Dilatiazem Dipyramidole Disulfiram Ethambutol Fluraépam Lévodopa Lithium Metformine Métrodinazole Nifédipine Salazosulfapyridine

5.2.3. Syndrome de Gougerot Sjögren

Le syndrome de Gougerot-Sjögren est une maladie auto-immune des glandes exocrines qui affecterait environ 0,2 % de la population, avec une prévalence féminine forte. Il peut s'agir d'un syndrome primaire (c'est-à-dire isolé) ou secondaire (associé à une autre maladie auto-immune). Cliniquement il s'agit d'un syndrome sec (sécheresse ophtalmique et salivaire) souvent associé à une augmentation de taille des glandes salivaires. La salive est donc diminuée en quantité (jusqu'à l'asialie) et en qualité avec une augmentation du sodium, et une

diminution de la concentration totale en protéines, en amylase, en lysozyme et en IgA [183]. Le diagnostic est réalisé sur les glandes salivaires accessoires avec infiltration lymphocytaire. L'épithélium buccal de patients atteints du syndrome de Sjögren se caractérise par la diminution du nombre de papilles caliciformes et les changements ultrastructuraux dans la morphologie des bourgeons du goût, ce qui indique que les composants salivaires peuvent avoir un rôle important dans le bon fonctionnement des bourgeons du goût [177].

5.2.4. Radiothérapie

La radiothérapie cervico-faciale est responsable de troubles du goût par 2 mécanismes.

. Elle peut aussi altérer le fonctionnement des bourgeons du goût par l'hyposialie. En effet, les réactions aiguës de la muqueuse sont le résultat de la destruction et de la mort des cellules dans la couche basale (stratum basale) sous l'effet des rayons ionisants. La radiothérapie des glandes salivaires résultent en premier lieu de la destruction des glandes séreuses des glandes, alors que les parties muqueuses et l'épithélium des tubuli excréteurs sont nettement moins affectés [184]. La salive est alors nettement plus visqueuse et se caractérise par une valeur de pH basse; elle contient des concentrations plus élevées de sodium, de chlorure, de calcium, de magnésium et de protéines, alors que de l'autre côté, elle contient moins de bicarbonates et d'immunoglobulines IgA [185]. La xérostomie peut persister pendant plusieurs mois, voire des années; dans une certaine mesure, elle peut être réversible; le degré de récupération dépend principalement de l'étendue du champ d'irradiation et des glandes salivaires qui y sont situés, de la dose totale d'irradiation, et de la technique d'irradiation (IMRT ou pas).

. La radiothérapie peut interrompre le cycle de régénération du bourgeon gustatif. Des expériences sur des animaux ont montré qu'après application d'une dose de 20 Gy, environ 20 à 30% des cellules d'un tel bourgeon du goût sont susceptibles de se nécroser [186]. Dans la plupart des cas, ces cellules se régénèrent dans un délai de quatre mois après la fin de la radiothérapie.

5.3. Signes buccaux et modifications endocriniennes [82]

Les pathologies bucco-dentaires d'origine endocriniennes de la femme permettent de mieux comprendre l'influence des hormones dans l'homéostasie de l'épithélium buccal.

5.3.1. Pathologies endocriniennes

- *Le diabète insulino-dépendant* est responsable d'une déparpilliation de la muqueuse linguale voire de signes inflammatoire favorisé par une sècheresse buccale. De plus, l'hyperglycémie limite le nombre des facteurs de croissance au niveau d'une plaie buccale et perturbe donc la cicatrisation.

- *L'hypothyroïdie* serait responsable d'un retard de l'éruption dentaire et de dents irrégulières. La fréquence des caries serait augmentée.

- *L'hyperthyroïdie*, pathologie plus fréquente chez les femmes que chez les hommes favoriserait des lésions d'ulcération voir de nécrose de la muqueuse buccale.

- *L'hypoparathyroïdie* est essentiellement responsable de candidose orale.

- *L'insuffisance surrénalienne* lors de la maladie d'Addison s'accompagne d'un retard de l'éruption dentaire.

- *Le syndrome de Turner* est caractérisé par une perte partielle ou totale d'un chromosome X. Il serait associé à un moins grand nombre de carie. Pour expliquer cet effet on avance que la carence en œstrogène protègerait contre les caries.

5.3.1. Pathologie bucco-dentaire de la femme [82]

A la puberté, l'augmentation des taux d'hormones féminines est associée à une fréquence accrue de la gingivite et de la parodontite. Lors de la menstruation, une inflammation gingivale et une légère modification de la mobilité dentaire sont observés quelques jours avant en rapport avec des taux élevés d'œstrogènes et de progestérone. Les utilisatrices de contraceptifs oraux présentent plus souvent une destruction parodontale plus importante. Lors de la grossesse les phénomènes d'inflammation de la gencive sont significatifs à partir du deuxième trimestre toujours en rapport avec une augmentation des œstrogènes mais aussi de la progestérone qui va diminuer la résistance gingivale aux agressions par inhibition de la production d'IL6. Quant à la ménopause, elle est liée à la maladie parodontale par les phénomènes d'ostéoporose et par la xérostomie.

5.4. Sénescence des muqueuses buccales et pathologies associées [46, 170, 187]

De nombreuses études cliniques ont montré que les muqueuses buccales s'atrophient chez le sujet âgé et qu'elles présentent progressivement un aspect fin et lisse, associé à une perte d'élasticité. Ceci concerne les muqueuses masticatoires et de recouvrement mais également la muqueuse « spécialisée dans la gustation ». [170].

Histologiquement, les modifications des muqueuses correspondent principalement à une diminution de l'épaisseur de l'épithélium, une diminution de la kératinisation, une altération de la morphologie de l'interface entre l'épithélium et le tissu conjonctif et une fibrose conjonctive. Cependant, les modifications histologiques liées au vieillissement lui-même semblent minimes, alors que des facteurs nutritionnels ou systémiques tels que des déficiences en fer, en vitamine B ou en œstrogènes seraient responsables d'altérations morphologiques et physiologiques importantes des muqueuses buccales chez les patients âgés [187].

Les répercussions fonctionnelles sont nombreuses, notamment en termes de fragilité muqueuse, de susceptibilité accrue aux agressions externes et de retard de cicatrisation. De plus, l'atrophie des muqueuses masticatoires et de recouvrement, entraînant une vulnérabilité aux traumatismes et à la pression durant la mastication, expliquent la difficulté de consommer des aliments durs et la moindre tolérance au port de prothèses dentaires [187, 188]. Enfin, l'atrophie physiologique des papilles gustatives, observable cliniquement par l'aspect lisse de la langue, participe aux modifications de la perception du goût et des régimes alimentaires, susceptibles de favoriser une malnutrition chez le sujet âgé.

Outre les ulcérations et autres lésions traumatiques, la candidose est l'une des premières pathologies des muqueuses buccales rencontrées chez le sujet âgé. Elle est favorisée par de nombreux facteurs tels qu'une hygiène insuffisante, la diminution de la sécrétion salivaire, le port de prothèses défectueuses, l'antibiothérapie au long court, un diabète mal équilibré ou une immunodéficience. Les lésions cliniques de la candidose chez la personne âgée sont souvent localisées au niveau de la muqueuse palatine recouverte d'une prothèse dentaire.

Selon leur stade d'évolution, ces lésions vont d'une plaque discrètement érythémateuse bien limitée, à une hyperplasie inflammatoire avec de nombreuses formations exophytiques. Une atteinte linguale en miroir peut également être observée. Enfin la perlèche du sujet âgé est rarement isolée ; elle est généralement associée à une candidose buccale [76].

Le vieillissement ou les facteurs associés au vieillissement peuvent rendre les individus plus vulnérables à un dysfonctionnement du goût [189]. Les personnes âgées, en bonne santé ont des modifications du goût liés à l'âge qui sont moins prononcées que ceux de l'odorat [190]. De plus ce trouble du goût est souvent signalé comme étant spécifique du sel (augmentation du seuil) [190-193]. Néanmoins, Cowart *et al* [194] a constaté que les patients âgés (≥ 65 ans) étaient significativement plus susceptibles d'avoir des phantoguesies que les patients jeunes ou d'âge moyen. De plus, dans une étude réalisée chez l'animal, il a été démontré une

diminution des cellules gustatives exprimant les récepteurs T1R3, le glucagon-like peptide-1, chez les souris âgées de 18 mois avec une réceptivité au sucre et à l'umami diminuée par rapport aux animaux jeunes alors que les autres goûts (salé, aigre, et amer) sont restés intacts [195].

Nous venons de constater que le bon fonctionnement de l'épithélium buccal dépend en grande partie de la salive dans lequel il baigne ainsi que de nombreux neuropeptides ou hormones contenus ou pas dans la salive. La salive est par ailleurs sécrétée par les glandes salivaires, elles-mêmes en partie sous la dépendance des hormones notamment sexuelles. L'homéostasie buccale est donc sous dépendance hormonale et toute perturbation hormonale peut donc avoir une modification de cette homéostasie.

2. Perturbateurs endocriniens

A. Système endocrinien

Pour comprendre ce qu'est un perturbateur endocrinien, ses modes d'action et ses effets il faut avoir une idée du fonctionnement du système endocrinien.

1. Généralités

. Le système endocrinien (SE) contrôle et régule les grandes fonctions physiologiques de l'organisme tel que la croissance, le développement, la reproduction, le métabolisme, la pression artérielle, la glycémie, l'équilibre des fluides, le stress, la régulation et le fonctionnement de nombreux tissus [196]. Il constitue un des deux grands systèmes de communication de l'organisme, l'autre étant le système nerveux.

Ces deux systèmes sont étroitement liés et sont regroupés sous le terme de système neuro-endocrinien (SNE).

. Le SE comprend l'ensemble des organes et des tissus qui fabriquent et libèrent les hormones (messagers chimiques). Ces organes endocriniens sont des glandes endocrines, c'est-à-dire des glandes à sécrétions internes, dont le produit est directement libéré dans la circulation sanguine qui le mène vers des organes ou des cellules cibles distants, où il exerce des fonctions spécifiques (Figure 13).

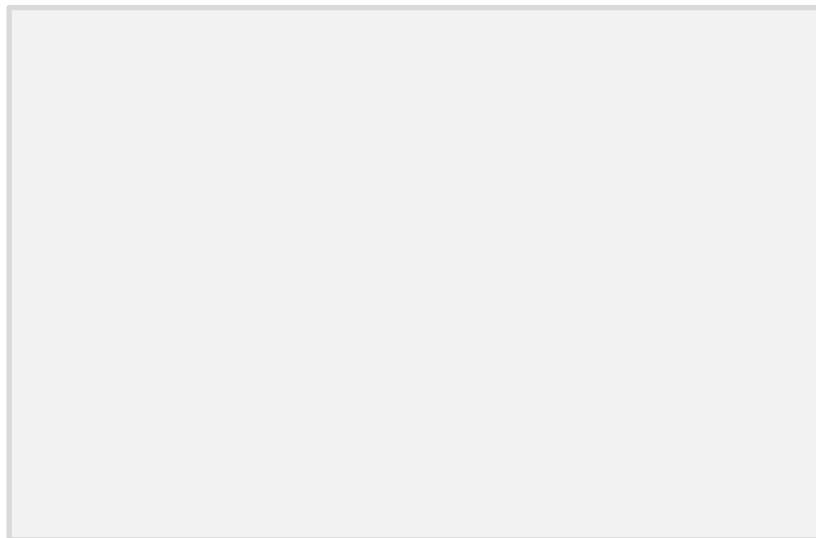
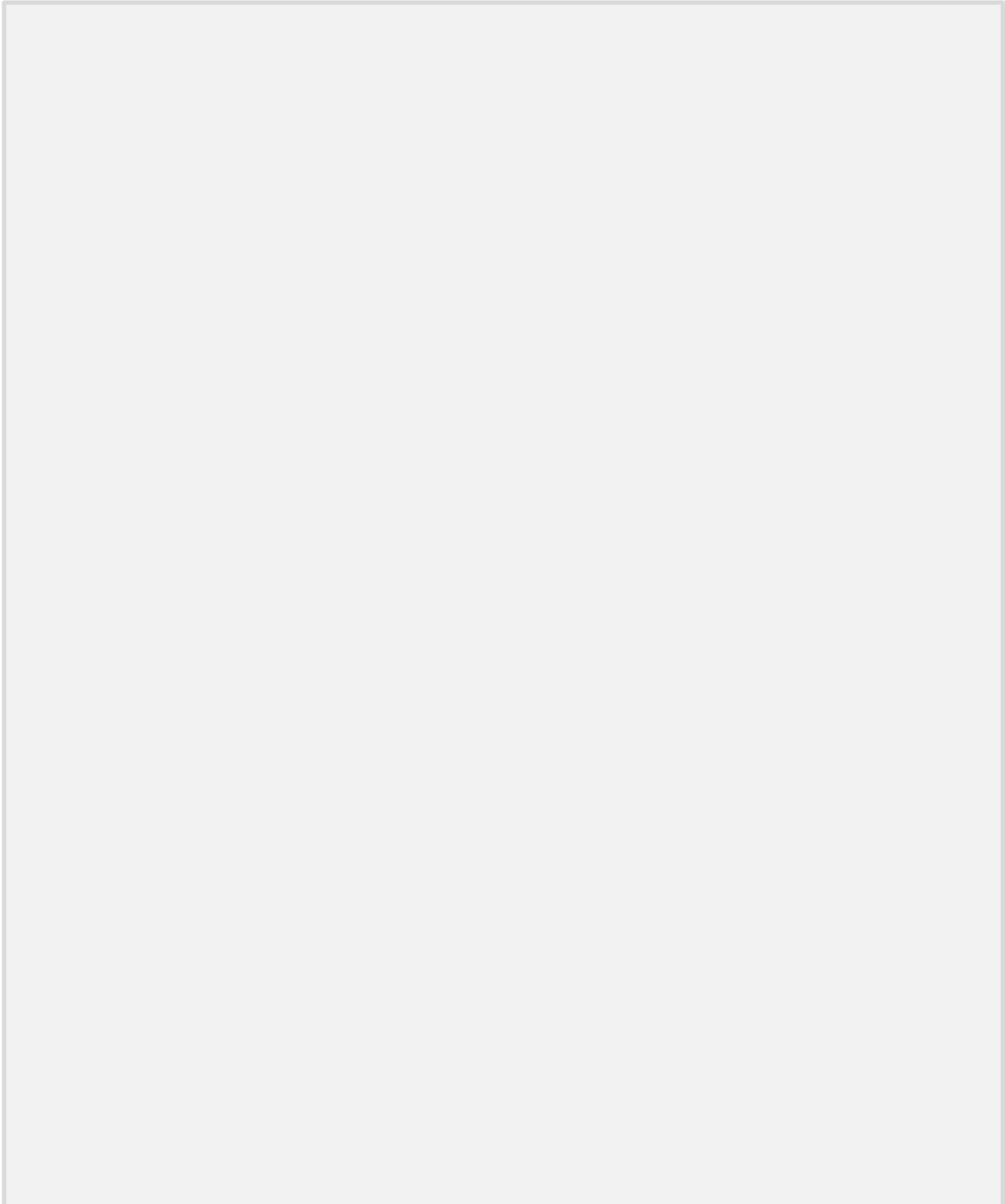


Figure 13 : différents modes d'action des hormones (d'après Labrie 1991)

Les principales glandes endocrines, leurs hormones et leurs fonctions sont représentées dans le tableau 10 [197].

Tableau 10 : les différentes hormones et leurs fonctions principales



Par ailleurs, ces hormones peuvent également influencer l'activité des cellules voisines (activité paracrine), alors que d'autres peuvent exercer leur action positive ou négative sur la cellule même qui les a secrétées (activité autocrine). L'activité intracrine décrit l'action d'hormones au sein même des cellules où elles ont été formées, sans libération significative

dans le compartiment extracellulaire et la circulation générale (figure 12). Certaines glandes du SE sont dites endo-exocrines, comme par exemple le pancréas, les gonades ou, comme nous venons de le voir les glandes salivaires. Une hormone est une substance chimique sécrétée dans l'organisme et qui agit sur un récepteur du tissu cible pour en modifier le fonctionnement.

2. Classification

Les hormones peuvent être classées en trois groupes selon leurs natures biochimiques: les protéines, les stéroïdes, et les amines.

2.1. Les hormones peptidiques

Ce sont des peptides de taille et de structure très diverses. Elles sont synthétisées par les ribosomes du réticulum endoplasmique et empaquetées dans des vésicules sécrétoires au niveau de l'appareil de Golgi. Ces vésicules permettent le franchissement de la bicouche lipidique membranaire, et ainsi la circulation de ces hormones dans le sang. Les hormones atteignent leurs organes cibles sur lesquels elles agissent par l'intermédiaire de récepteurs protéiques transmembranaires qui servent de relais pour transmettre les signaux à l'intérieur de la cellule. Cette classe d'hormones comprend les hormones produites par l'antéhypophyse, les parathyroïdes, le placenta, le tissu adipeux blanc (Leptine), la muqueuse du duodénum (CCK), le pancréas ainsi que les hormones activatrices de l'antéhypophyse produites par l'hypothalamus (comme l'ocytocine).

2.2. Les hormones monoaminées

Elles dérivent d'acides aminés, principalement de la tyrosine et du tryptophane, et sont des molécules de petite taille. Elles sont produites soit par la médullosurrénale (catécholamines) et circulent librement dans le sang pour agir sur les cellules cibles par le biais de récepteurs transmembranaires, comme les hormones peptidiques, soit par la thyroïde (T3 et T4) et agissent au niveau de récepteurs nucléaires comme le font les stéroïdes. La synthèse de ces hormones est intracellulaire et, dans la plupart des cas, le produit est retenu à l'intérieur de la cellule jusqu'à sa libération dans le sang.

2.3. Les hormones stéroïdiennes

Ce sont des composés classés parmi les lipides car ils comprennent un noyau « stérane » dérivant de la cyclisation de triperpénoides (lipides à 30 atomes de carbone). Ils sont synthétisés dans le cytosol à partir du cholestérol (figure 14). Dans ce groupe d'hormones se retrouvent les hormones sécrétées par les corticosurrénales et par les gonades.

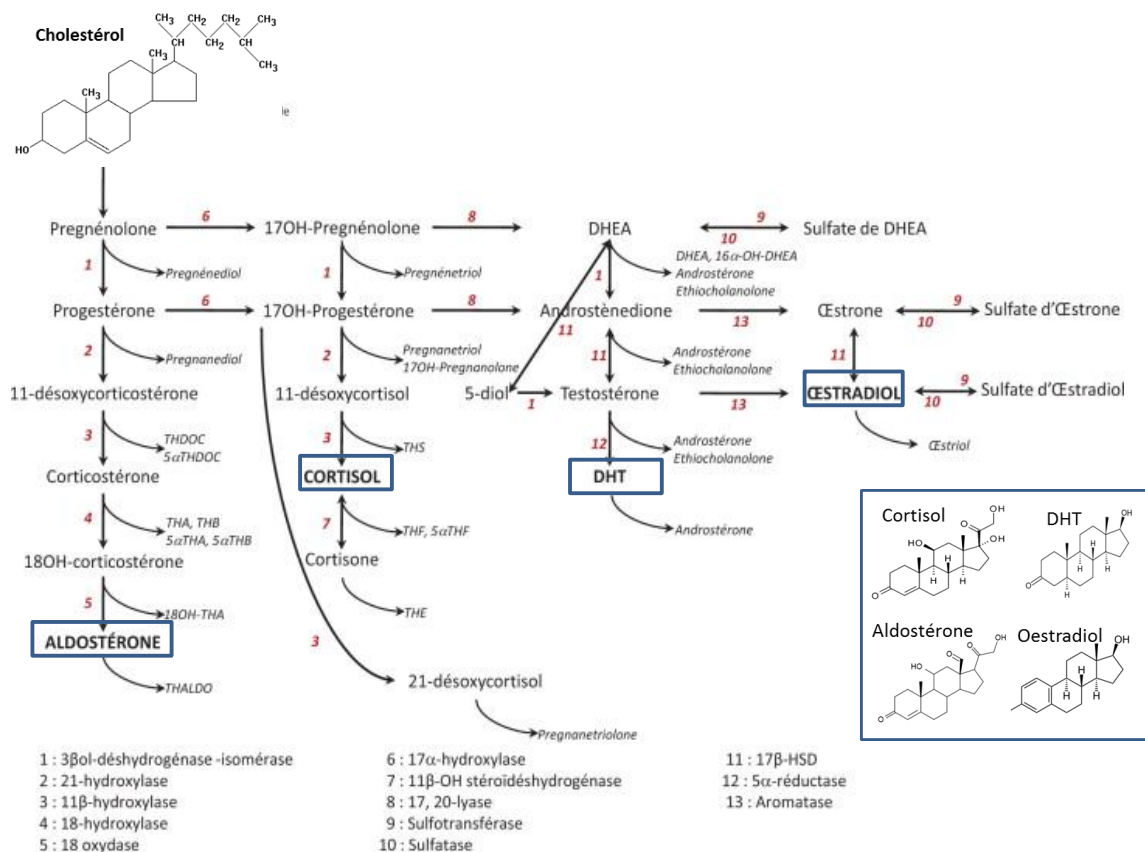


Figure 14 : biosynthèses des hormones stéroïdiennes

Ces hormones hydrophobes traversent aisément les membranes plasmiques et doivent se complexer avec des protéines plasmatiques pour circuler dans le sang. La protéine de « transport » ne libère l'hormone stéroïde qu'au niveau des capillaires sanguins qui irriguent les organes cibles (figure 15). Elles pénètrent ensuite dans le cytoplasme de leurs cellules cibles où elles se lient à des récepteurs intracellulaires. Ces récepteurs appartiennent à une grande famille de molécules protéiques qui sont les récepteurs nucléaires.

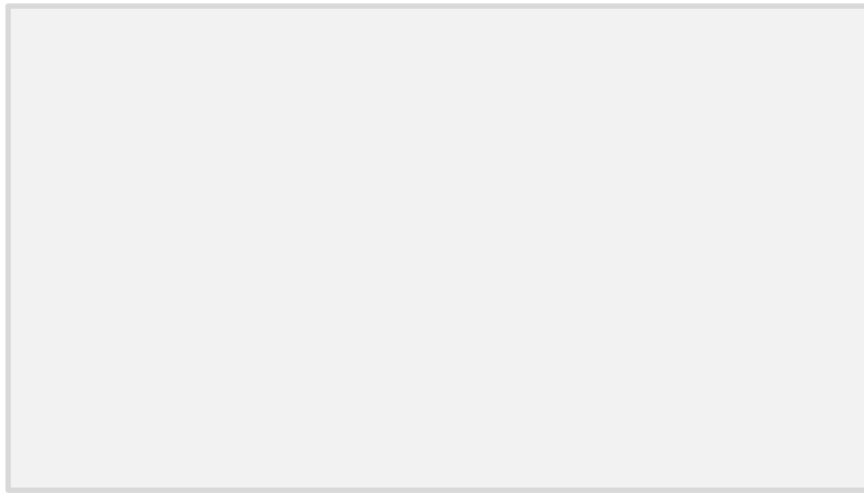


Figure 15: mécanisme général d'action des hormones (d'après Labrie 1991)

3. Hormones sexuelles

Les hormones sexuelles sont des hormones stéroïdes synthétisée principalement par les ovaires les testicules ou les glandes surrénales à partir du cholestérol. Les mécanismes de leur biosynthèse sont rapportés dans la figure 15.

3.1. Classification

3.1.1. La progestérone

C'est un stéroïde synthétisé dans les ovaires et dans le placenta. Sa concentration évolue au cours du cycle menstruel : elle augmente après l'ovulation et chute si aucune fécondation ne se produit. Elle intervient donc dans la régulation des cycles de la reproduction chez la femme. Elle permet, en cas de grossesse la poursuite de la grossesse et prépare les glandes mammaires pour la lactation [198]. Les surrénales et les testicules produisent aussi de faibles quantités de progestérone.

3.1.2. Les androgènes

Ce sont les hormones sexuelles masculines. Ils sont principalement représentés par la testostérone. Chez l'homme elle est produite par les cellules testiculaires de Leydig alors que chez la femme elle est produite au niveau des cellules thécales qui entourent le follicule. Cette hormone favorise la spermatogénèse et les caractères sexuels masculins alors que chez la femme elle peut se transformer en œstrogène ou permettre l'atrésie folliculaire. De plus, comme il s'agit d'une hormone anabolique, elle stimule la synthèse des protéines, et participe à l'augmentation de la masse musculaire [198]. La sécrétion de la testostérone, est régie par la gonadolibérine (GnRH), neurohormone produite dans l'hypothalamus. Cette dernière

contrôle la production des hormones gonadotrophine (GTH), folliculo-stimulante (FSH) et lutéinisante (LH) par l'adénohypophyse. La LH stimule la sécrétion ainsi la testostérone [198].

La DHEA qui provient des glandes surrénales peut être responsable d'une augmentation du taux d'androgènes dans le sang pouvant favoriser la puberté précoce [199].

3.1.3. Les œstrogènes

Ils jouent un rôle important dans la reproduction et la fertilité [200]. Chez la femelle, l'œstradiol est synthétisé par le follicule de graff et favorise la maturation et la « ponte » de l'ovule. Les œstrogènes permettent le développement des caractères sexuels féminins primaires et secondaires. De plus, les œstrogènes sont impliqués dans le développement du système nerveux central, dans l'homéostasie du squelette et du système cardio-vasculaire. Ils sont nécessaires à la masculinisation du cerveau et impliqués dans le comportement sexuel et ils ont également des effets sur le foie et le tissu adipeux [201]. Chez la femme en âge de procréer, l'œstradiol est essentiellement produit par conversion enzymatiques des androgènes.

3.2. Mode de fonctionnement

3.2.1. Les récepteurs stéroïdiens

Les hormones stéroïdes et thyroïdiennes (hormones hydrophobes) agissent via des récepteurs intracellulaires. Les récepteurs de cette famille interagissent avec leur ligand spécifique au niveau du cytoplasme et/ou du noyau et agissent directement au niveau du noyau en modulant la transcription en ARN messager de divers gènes spécifiques (Figure 16). Pour cette raison, ces récepteurs intracellulaires sont souvent dénommés «récepteurs nucléaires» et ils sont donc des facteurs de transcription dont l'activité est dépendante de la liaison de leurs ligands. La réponse biologique induite se produit après quelques heures mais est durable.

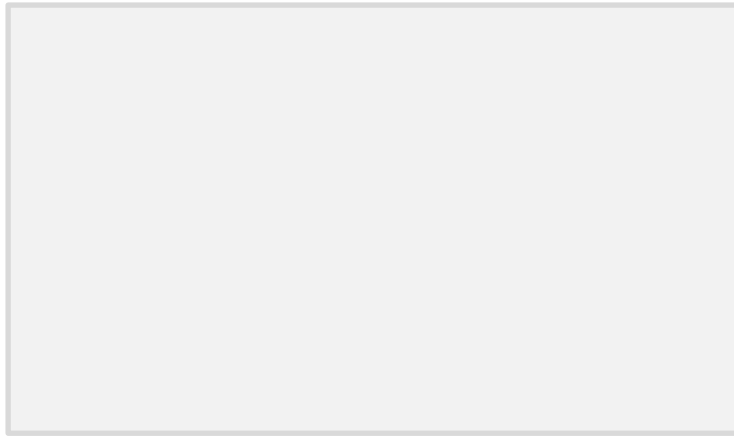


Figure 16 : mécanismes cellulaires d'action des hormones via les récepteurs nucléaire

3.2.1.1. Récepteurs de la progestérone.

On recense 2 isoformes du récepteur PRA et PRB. Il semble que PRB soit activateur de l'expression de gènes cibles alors que PBA aurait un rôle inhibiteur vis-à-vis de PRB ou des récepteurs nucléaires [202]. De plus, les œstrogènes induisent l'expression de PR dans de nombreux tissus comme le vagin et son augmentation représente un bon marqueur de stimulation oestrogénique. Cette induction est régulée par $E\alpha$.

3.2.1.2. Récepteur aux androgènes

La structure de ce récepteur est très proche de celle du récepteur de la progestérone. Il existe deux isoformes de l'AR, l'AR A et l'AR B. Les AR A et B diffèrent par la longueur de leur séquence amino-terminale [203]. Les 2 isoformes sont fortement exprimées au niveau des organes génitaux mâles et femelles, ARB étant la forme prépondérante. [204]. On retrouve les AR dans de nombreux autres tissus foetaux tels que la vessie, les poumons, le muscle, les reins, la peau l'estomac ou l'intestin. Chez l'adulte on retrouve le récepteur dans le cerveau, la glande mammaire ou encore les glandes salivaires. L'AR s'associe aux protéines chaperonnes HSP90 et 70. La fixation d'un agoniste provoque la dissociation du complexe, et un changement conformationnel du AR, qui se dimérise puis se fixe aux éléments de réponse de l'ADN nucléaire qui régulent l'expression de gènes spécifiques. Ses ligands endogènes sont la testostérone et son métabolite, la 5 α -dihydroxytestostérone (5 α -DHT), ainsi que l'androstènedione et la dihydroépiandrostérone (DHEA).

3.2.1.3. Récepteurs aux œstrogènes

Comme d'autres hormones stéroïdes, les œstrogènes agissent via des récepteurs nucléaires [205]. Deux sous types de récepteurs ont été identifiés : ER α et ER β se trouvant respectivement sur les chromosomes 6 et 14 [206]. Un troisième, ER γ , a été décrit chez les poissons.

L'ER α et ER β stimulent le plus souvent la transcription des mêmes gènes mais chaque ER détient une spécificité de ligand [207]. L'existence de ces deux sous-types d'ER permet une modulation de l'activité des molécules œstrogénique en fonction de leur expression tissulaire et de l'affinité différente de ces molécules pour l'un ou l'autre des sous-types [205,208,209,210]. Ceci pourrait expliquer une sensibilité et une réponse des organes cibles différente. Ainsi, même s'ils possèdent des affinités équivalentes ou moindres pour l'œstradiol, les xéno-hormones seront préférentiellement reconnus par l'un ou l'autre des récepteurs. Par exemple les phyto-œstrogènes comme la génistéine ont une affinité plus élevée pour l'ER β alors que l'estrone se fixe plutôt sur l'ER α [206].

3.2.2. Mode d'action génomique : cas des œstrogènes

Ils découlent de l'aptitude des œstrogènes à se fixer sur les récepteurs des œstrogènes (ER) classiquement appelés alpha et bêta, entraînant la dimérisation des récepteurs cytoplasmiques, leur adressage nucléaire, leur liaison aux ERE et leur destruction subséquente par les ubiquitines du protéasome [211]. Les récepteurs ER sont également capables de former des hétérodimères avec d'autres récepteurs cellulaires (AHR, RXR, etc.), ce qui permet d'expliquer pourquoi des ligands de ces récepteurs secondaires peuvent exercer des effets de type œstrogénique sans pour autant se lier sur les ER [212]. Les œstrogènes endogènes ont une meilleure affinité pour l'ER α . Selon leur structure, les phyto-œstrogènes lient les ERs avec des affinités différentes pour les 2 isoformes (α et β). Génistéine, daidzéine, coumestrol lient préférentiellement la forme β [205,213]. Par exemple la génistéine, qui a une taille voisine de celle de l'œstradiol et qui présente des groupements hydroxyles, lie le ER β avec une affinité 21 fois plus importante que pour le ER α [214]. D'autres xéno-hormones, comme le Bisphenol A ou le distylbène, sont de meilleurs ligands pour la forme alpha, mais leur affinité est plus faible que celle de l'œstradiol.

3.2.3. Effets non génomiques

Des récepteurs aux œstrogènes sont également localisés sur la membrane plasmique : ils sont à l'origine d'effets non génomiques incluant l'implication de messagers secondaires

caractéristiques de voies de signalisations cellulaires [215]. Les mécanismes moléculaires de ces effets non génomiques directs sont de type biochimique, telle la phosphorylation de facteurs de croissance ou l'inhibition de tyrosine kinase. L'interaction compétitive ou non compétitive avec les sites catalytiques de divers complexes enzymatiques permet aux œstrogènes d'exercer des effets cellulaires sur un grand nombre d'enzymes (notamment des enzymes du métabolisme des hormones stéroïdes) et des hormones thyroïdiennes mais aussi sur des facteurs de croissance [216,217].

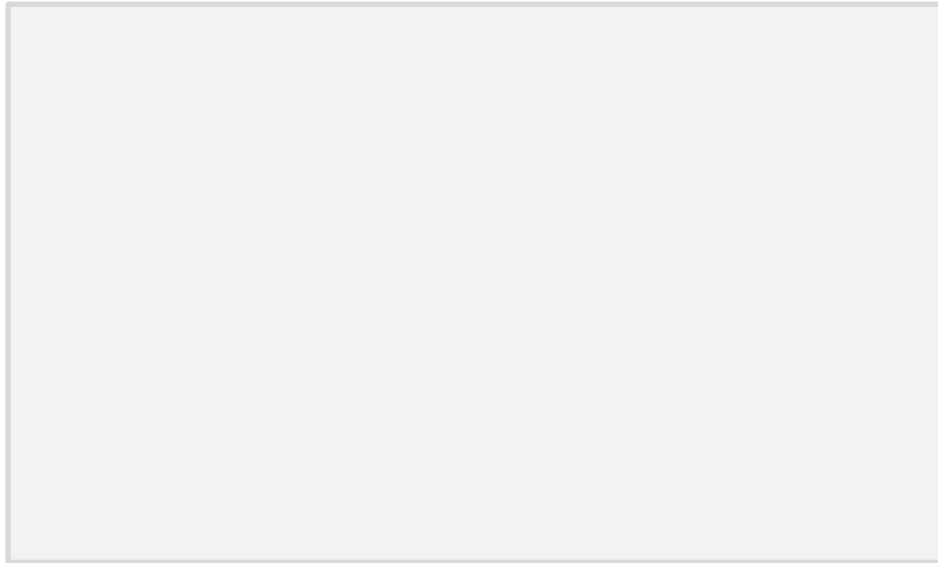


Figure 17 : action génomique et non génomique [218] 1. Mécanisme classique de l'action ER activation de la transcription des gènes et de la synthèse protéique via un effet direct sur les récepteurs nucléaires. 2. Action non génomique (ERE-indépendants) . Le complexe E2-ER dans le noyaux est attaché par interactions protéine-protéine à un complexe facteur de transcription (TF) qui contacte le promoteur du gène cible. 3. Actions génomiques indépendante du ligand. (par exemple, les facteurs de croissance (GF) active la protéine-kinase cascades, ce qui conduit à la phosphorylation (P) et l'activation de RE nucléaires à ERE). 4. Actions non génomique (activation de la protéine-kinase cascades, et modifications des protéines dans le cytoplasme).

4. Tissus cibles

4.1. Tissus cibles de la progestérone.

Chez l'homme le récepteur de la progestérone a été détecté au niveau de l'utérus, des ovaires, du sein, des testicules , du vagin ou encore au niveau du cerveau [219]. Le récepteurs PRA sont plus spécifiquement sur l'endometreet PRB plutôt sur les glandes mammaires.

4.2. Tissus cibles des androgènes.

Les récepteurs aux androgènes sont largement distribués dans l'organisme. Les concentrations les plus élevées sont présentes dans les organes sexuels (prostate, testicules, ovaires) mais

aussi dans le coeur, le muscle et le foie, alors que les concentrations dans les autres tissus androgéno-sensibles, comme l'os par exemple, sont beaucoup plus basses.

4.3. Tissus cibles de l'œstrogènes.

Les récepteurs aux œstrogènes ne sont pas répartis uniformément dans le corps humain. Ainsi, comme nous l'avons vu les glandes salivaires et l'épithélium buccal ont essentiellement des récepteurs ER β alors que le foie et le tissu adipocytaire n'ont que des récepteurs ER α , d'autre organe comme le sein contiennent les 2 récepteurs [206]. De plus, cette répartition sur un même organe peut être différente sur les cellules qui le compose. Ainsi, dans l'ovaire, ER α est mis en évidence dans les cellules thecales et ER β dans la granulosa ; au niveau testiculaire, ces récepteurs sont exprimés au niveau des cellules de Leydig (ER α) ou de Sertoli (ER β) [220]. La répartition des récepteurs est rappelée sur la figure 18.

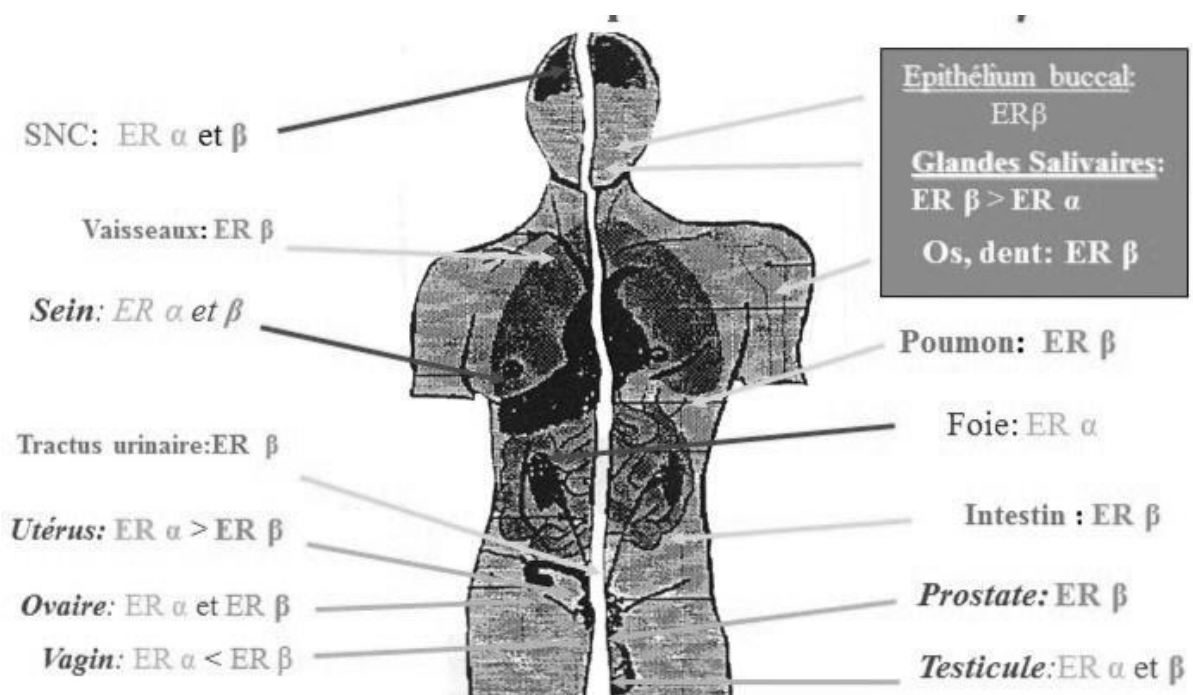


Figure 18 : répartition des récepteurs aux œstrogènes

B. Généralités sur les perturbateurs endocriniens

Comme nous venons de le voir, les glandes endocrines sécrètent des substances biologiques hautement actives appelées hormones. Leur dysfonctionnement peut altérer différentes fonctions telles que la croissance, le développement, le comportement, la production, l'utilisation et le stockage de l'énergie, etc. Les perturbateurs du système endocrinien sont des substances chimiques d'origine naturelle ou artificielle qui peuvent interférer avec le fonctionnement des glandes endocrines.

1. Définition

Un perturbateur endocrinien est une substance d'origine naturelle ou artificielle étrangère à l'organisme qui, interférant avec les fonctions du système hormonal, risque d'influer négativement sur les processus de synthèse, de sécrétion, de transport, d'action ou d'élimination des hormones provoquant des effets délétères sur l'individu ou ses descendants (UE 2002).

2. Les différents perturbateurs endocriniens

Les perturbateurs endocriniens peuvent être soit d'origine naturelle (hormones) qu'il s'agisse d'organisme animal (œstrogènes, progestérone, testostérone) ou végétal (phyto-œstrogènes). Certains perturbateurs endocriniens sont des substances chimiques synthétiques utilisées dans l'industrie (phtalates, alkylphénols, BPA...) ou dans le secteur agricole (pesticides, hormones synthétiques). Les principales catégories de perturbateurs sont répertoriées dans le tableau 11.

Tableau 11 : catégorie de perturbateurs endocriniens

Groupes	Exemples de substances à activité de PE reconnue
Les pesticides	DDT, chlordane, pyréthroides, pesticides organochlorés, linuron, vinchlozoline, bromure de méthyle
Les produits pharmaceutiques	Hormones de synthèse, DES, ketoconazole
Les hormones naturelles	Hormones humaines et animales, phyto-œstrogènes
Les produits de combustion	Dioxines, furanes
Les plastifiants	Phtalates, bisphénol A, styrènes
Les antioxydants alimentaires	Nonylphénol
Les produits ignifuges* et isolants	PBDE, PCB
Les détergents	Alkylphénols

3. Mode de fonctionnement

3.1. Interaction directe avec les récepteurs hormonaux (fig 19) :

- Le PE peut imiter l'action d'une hormone naturelle en se fixant sur le récepteur cellulaire. Il entraîne une réponse normale, appelée agoniste qui mime les effets de l'hormone. L'importance de l'effet mimétique dépend à la fois de son affinité pour le récepteur et de sa capacité à induire une réponse. Le BPA et les phyto-œstrogènes ont principalement un effet agoniste.

- Le PE peut se lier au récepteur hormonal et empêcher l'émission d'un signal. Il entrave alors l'action des hormones. Il s'agit d'une réponse antagoniste. Cet effet est mis en évidence pour la Vinclozoline ou le tamoxifène [221].

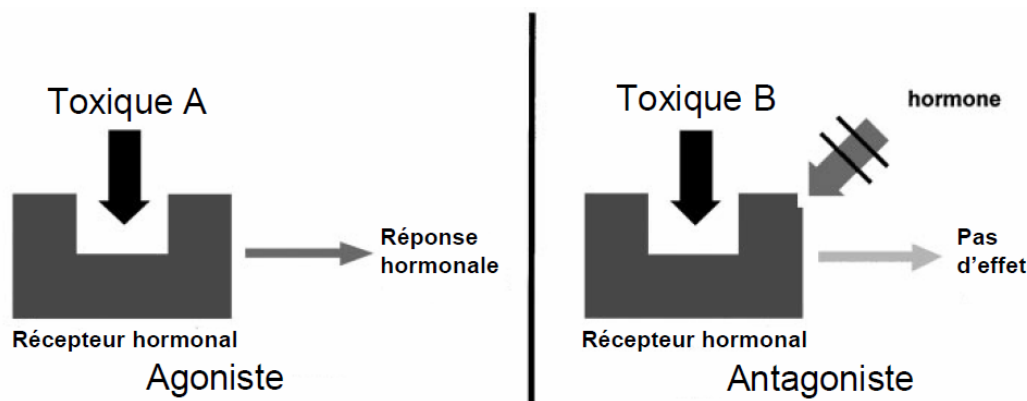


Figure 19 : modes d'action agoniste et antagoniste par interaction directe avec le récepteur hormonal (d'après McLachlan *et al.*, 2001).

3.2. Modification du taux d'hormones ou de son récepteur

Un PE peut perturber indirectement les fonctions d'une hormone en influant sur sa concentration, via une modification de sa métabolisation (production ou élimination), de son transport ou de sa libération depuis son lieu de stockage. Par exemple, l'induction des enzymes impliquées dans le métabolisme des hormones peut modifier leur niveau circulant. Ainsi, l'induction au niveau du foie du cytochrome P450 1A1, impliqué dans l'hydroxylation de l'E2, serait responsable de l'activité anti-œstrogénique de certains PCBs substitués en positions non-ortho, en facilitant l'inactivation et l'élimination de l'E2 [222]. De même, la génistéine peut réduire l'activité de la 17 β -HSD amenant une réduction de la synthèse d'œstradiol [223]. Si la concentration en ligand joue sur sa capacité à entraîner un effet, il en va de même de son récepteur. Ainsi, certains PE peuvent agir en modifiant la concentration en récepteur d'une hormone.

4. Perturbateur endocrinien et dogme en toxicologie

On fonde traditionnellement la toxicologie sur les travaux de Paracelse, médecin suisse du 16e siècle, dont une maxime est particulièrement connue « Rien n'est poison, tout est poison : seule la dose fait le poison ». Selon ce principe, tout produit peut devenir nocif pour la santé s'il est consommé en excès. Ainsi, Paracelse a inventé la relation entre l'effet et la dose. La relation dose-effet conduit à une progression de l'effet selon un mécanisme logique. Cette démarche se caractérise également par son caractère monoproduit. Chaque produit ayant son effet selon son mécanisme propre [224,225].

La dose non toxique d'une substance est usuellement calculée à partir de la définition de sa dose létale pour aboutir à la définition d'une dose journalière admissible ou tolérable. La dose létale retenue pour la toxicité est la « dose létale 50 » où celle qui provoque la mort de 50 % d'un échantillon de rongeurs exposés. Cette mesure a été définie en 1927 par le scientifique anglais John. Selon le même processus, on cherche alors logiquement à définir la dose à partir de laquelle aucun effet ne peut être observé sur les animaux de laboratoire (No Observed Adverse Effect Level - NOAEL). Pour obtenir la DJT, on applique un facteur de sécurité de 100, qui est le résultat d'une double précaution : un facteur de 10 pour tenir compte des différences entre l'animal et l'homme et des éventuelles imprécisions des études disponibles ayant déterminé la NOAEL. Un second facteur de 10 est appliqué pour tenir compte de la variabilité de la sensibilité interpersonnelle chez l'homme.

La conférence de Wingspread dans le Wisconsin sur les altérations du développement sexuel induites par les produits chimiques qui a réuni 21 participants du 26 au 28 juillet 1991 a remis en avant l'effet hormesis décrit en 1943 et ainsi a ajouté aux dogmes de la toxicologie classique la description d'un nouveau dogme [226]. Il était constaté qu'un grand nombre de produits chimiques de synthèse libérés dans la nature, ainsi que quelques composés naturels, étaient capables de dérégler le système endocrinien des animaux, y compris l'homme. Il s'agissait notamment de certains pesticides (fongicides, herbicides et insecticides) et produits chimiques, ainsi que d'autres produits synthétiques et certains métaux. A l'issue de cette conférence quatre remarques étaient faites : les composés concernés pouvaient avoir des effets très différents sur l'embryon et sur l'adulte; les effets se manifestent surtout sur la génération suivante, et non chez les parents exposés ; la période d'exposition au cours du développement de l'organisme était cruciale, déterminant l'ampleur et la nature des effets ; et la période d'exposition la plus critique correspondait à la vie embryonnaire, mais les effets pouvaient ne pas se manifester avant l'âge adulte. De plus, lors de cette conférence il était

constaté que les mécanismes d'action de ces composés étaient variables, mais d'une manière générale : ils imitaient les hormones naturelles en se liant à leurs récepteurs ; ils inhibent les hormones en les empêchant de se lier à leurs récepteurs ; ils réagissaient directement ou indirectement avec les hormones elles-mêmes, soit en perturbant leur synthèse soit en modifiant le nombre de récepteurs dans les organes.

De plus, progressivement le dogme de l'effet-dose linéaire a été remis en question. Ana Soto a exposé des rongeurs à des doses de bisphénol A, très inférieures à la DJA, mais a obtenu des effets, notamment des lésions précancéreuses du sein [227]. D'autres études comme celles de Frederick vom Saal [228] ou de Channda Gupta [229] ont également montré des effets à des doses égales ou inférieures à la DJT. Ainsi, il a été décrit le mécanisme de dose-effet non monotone avec des effets pouvant être plus forts à faible dose qu'à forte dose (fig 20).

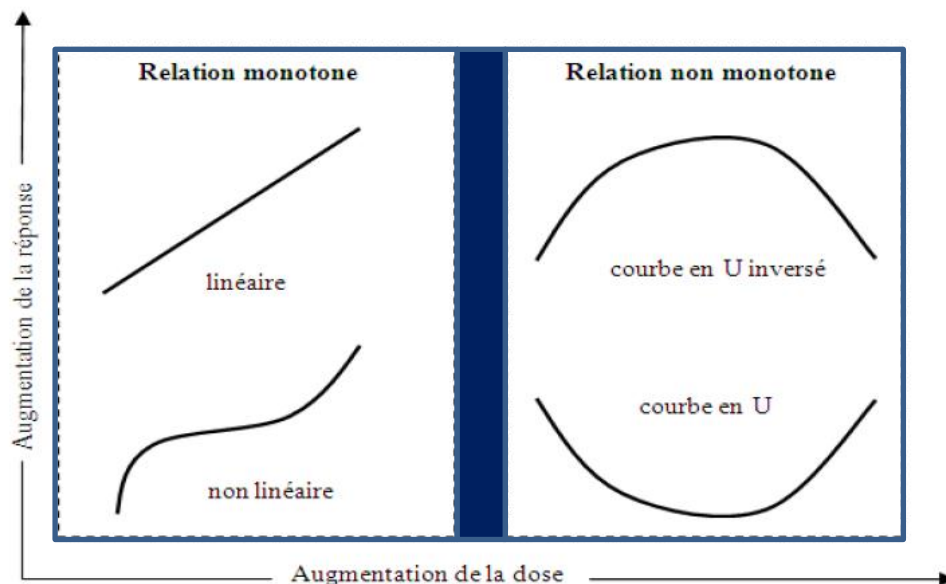


Figure 20 : les différentes relations dose-effets

Les xéno-hormones ont été étudiées chez l'animal adulte afin d'établir les doses journalières admissibles. Les perturbateurs endocriniens à des doses inférieures à la DJT semblaient sans effets apparents sur cette population. Les effets néfastes des xéno-hormones ont surtout été visualisés avec une exposition in utéro ou en période néonatale.

Leur effet a été étudié sur le goût et les glandes submandibulaires également lors d'exposition in utéro. Xu *et al* [230] chez des rats exposés au BPA pendant la période périnatale à des doses de 0,01, 0,1 et 1,0 mg / L a testé la préférence à la saccharine ainsi que le pourcentage de graisse corporelle. Il a ainsi montré que l'exposition au BPA pouvait accroître la préférence au sucré des rats mâles (féminisation) et la prise de poids. Quant à

Kouidhi *et al* [231] elle a montré qu'il existait des similitudes d'action entre la génistéine, un phytoestrogène, et la vinclozoline, un anti-androgène, sur la morphogenèse des submandibulaires de rat femelles.

Un autre point crucial est celui des effets des mélanges ou des effets cocktail. Il n'y a pas dans l'environnement de dose pure. Les résultats peuvent être différents [232]:

- L'addition des réponses : l'effet du mélange est la somme des effets de chaque composé à la dose considérée.
- L'addition des concentrations : Ainsi, un mélange peut avoir un effet alors que tous ses composés se trouvent à une concentration inférieure à la dose sans effet observé. Ce modèle s'appliquerait aux mélanges composés de produits ayant les mêmes voies d'action.
- La potentialisation des produits les uns par les autres,
- L'effet synergique des produits
- Un effet antagoniste peut également être constaté entre les produits.

Au niveau des glandes submandibulaires il a été démontré toujours en période néonatale une potentialisation des effets histologiques par le mélange de génistéine + vinclozoline avec un nombre significativement plus faible de canaux striés liés à une augmentation de leur superficie et la prolifération des cellules acineuses [231].

C. Les Phyto-œstrogènes

1. Définitions [233,234]

Les phyto-œstrogènes désignent des composés végétaux qui miment l'action des œstrogènes. Cette appellation regroupe des molécules de structures diverses et attachées à plusieurs familles de microconstituants végétaux (tableau 12). Les phyto-œstrogènes sont susceptibles d'interférer avec les œstrogènes sur des cibles biologiques associées à l'appareil reproducteur, au développement, ou au comportement. La majorité des phyto-œstrogènes appartient au groupe des flavonoïdes, parmi lesquels se distinguent 3 catégories principales : les isoflavones, les lignanes et les coumestanes. Un autre groupe de phyto-œstrogènes rassemble des molécules non flavonoïdes. Les phyto-œstrogènes décrits dans la littérature (essentiellement les isoflavones et les coumestanes) présentent une similitude structurale plus ou moins grande avec l'œstradiol. Toutes ces substances possèdent un ou plusieurs cycles aromatiques, porteur d'au moins un groupe hydroxyle libre ou engagé dans une autre fonction éther, ester, hétéroside.

Tableau 12: les différentes catégories de phyto-œstrogènes

<u>Phytoestrogènes</u>			
Flavonoïdes			Non flavonoïdes
Isoflavones	Coumestanes	Prénylflavonoïdes	Lignanes
Génistéine	Coumestrol	8-prénylnaringénine	Laricirésinol
Daidzéine		6-prénylnaringénine	Isolaricirésinol
(Equol)		Xanthohumol	Matairésinol
Glycitéine		Isoxanthohumol	Sécoisolaricirésinol
Biochanine A			(Entérodiol)
Formononetine			

Les isoflavones sont présents dans les légumineuses comme les graines de soja (et plus accessoirement les lentilles et les pois). Ils possèdent tous une structure diphénolique ; les principaux composés sont la génistéine, la daidzéine et plus accessoirement la glycitérine, la biochanine A et la formononetine.

Les lignanes se retrouvent dans diverses céréales : graines de lin, son, seigle, sarrasin, millet, soja, avoine et orge, ainsi que dans les fruits, certains légumes et les baies mais en faible

quantité. Ce sont les graines de lin qui en contiennent le plus. Ils possèdent tous un squelette 2, 3 - dibenzylbutane ; les principaux composés sont l'entérodiol et l'entérolactone.

Les coumestanes sont essentiellement représentées par le coumestrol, présent dans les luzernes utilisées pour l'alimentation animale. L'être humain n'est pas théoriquement susceptible d'absorber ces produits ; cependant, le soja mal entreposé pourrait en produire. Le coumestrol est le plus puissant des phyto-estrogènes, son affinité pour le récepteur ER β des œstrogènes étant supérieure à celle de l'œstradiol (E2). Les différentes structures moléculaires des principaux phyto-estrogènes sont rappelées figure 21.

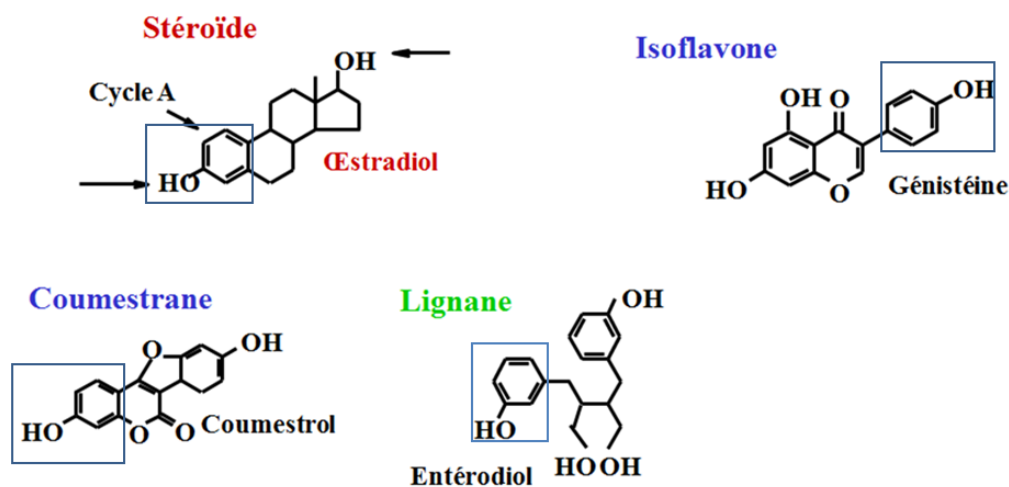


Figure 21: principaux phyto-œstrogènes et leurs structures moléculaires

2. Sources d'exposition

2.1. Exposition alimentaire

L'exposition aux phyto-œstrogènes se fait essentiellement par voie alimentaire par l'intermédiaire de plantes

2.1.1. Plantes à propriétés phyto-œstrogénique

Les isoflavonoïdes, dont la génistéine et le daidzein sont les plus étudiés, sont contenus dans les légumineuses. La source majoritaire d'isoflavonoïdes dans l'alimentation est le soja et les aliments à base de soja (laits infantiles à base de soja, lait de soja, graines de soja, tofu) [235]. Pour les stilbènes, la source principale est le resveratrol dans le vin rouge (contenu dans la peau du raisin) et les cacahuètes. Le secoisolariciresinol et le matairesinol sont deux lignanes qui n'ont pas d'activité œstrogénique mais qui sont convertis dans l'organisme des mammifères en des composés œstrogéniques. Ils sont retrouvés en très grande quantité dans

les graines de lin, les céréales et le pain, les légumes et fruits (canneberges et framboises) ou le thé [235]. Certains légumes contiennent de petites quantités de coumestrol, les coumestans ayant une activité œstrogénique démontrée, comme les épinards et le brocoli.

C'est le lin et autres graines oléagineuses qui contiennent la plus grande quantité totale de phyto-œstrogènes, puis le soja. Le tableau 13 présente les différentes plantes répertoriées. [234]. De plus des phyto-œstrogènes sont retrouvés dans la viande, puisque le bétail en ingère [236]. On en retrouve également dans le lait de vache, à des concentrations moindres que dans les produits à base de soja ou les laits infantiles au soja, mais néanmoins non négligeables [237].

Tableau 13 : plantes sources de phyto-œstrogènes [234]

Classe	Molécule		Plante source de la molécule
Isoflavones	Biochanine A	Génistéine	Soja et dérivés, haricots, trèfles, pois chiches, lentilles, arachides, orge, seigle, noix, trèfle rouge, kudzu,
	Daidzéine	Glycitéine	
	Formonétine		
Isoflavanes	Glabrène	Glabridine	Régliasse
Flavanones	Naringénine	6-phénylnaringénine	Houblon
	8-phénylnaringénine	Xanthohumol	
	Isoxanthohumol		
Coumestranes	Coumestrol		Luzerne, pousses de soja (haricots mungos, <i>Vigna radiata</i>), trèfles, épinards
Lignanes	Iso-larici-résinol	Mataïrésinol	Graines de lin, tournesol, seigle, sésame, courge, cerises, pommes, poires, carottes, fenouil, ail, céleri, oignons, thé, café, pin,
	Larici-résinol	Secoisolaricirésinol	

2.1.2. Consommation de phyto-œstrogènes

Le soja est la source principale en phyto-œstrogènes, et particulièrement en génistéine. La consommation de phyto-œstrogènes varie beaucoup d'un pays à l'autre et en fonction de l'alimentation...l'estimation pour une population est donc difficile. Cependant, les études montrent qu'une alimentation asiatique traditionnelle riche en soja peut être plus de 100 fois plus riche en isoflavones qu'une alimentation occidentale typique. Grâce au développement récent des tables de composition alimentaires en isoflavones, des apports moyens en isoflavones aglycones ont pu être estimés dans diverses populations : 45 mg/j au Japon, 9-35 mg/j dans les autres pays asiatiques et 0-2 mg/j dans les pays occidentaux comme en Europe ou aux Etats-Unis. En France, les apports en génistéine et daïdezéine dans la population française chez les non consommateurs de soja, sont de 0,026 mg/j en moyenne (écart-type : 0,024 mg/j) chez les adultes [238]. Cependant, les européens végétariens ont un taux plus de 10 fois supérieur à la même population non végétarienne (0,1 mg/kg PC/j) [239].

Chez l'enfant et le nourrisson, on retrouve les isoflavones, dont la génistéine, dans les laits infantiles à base de soja (18 – 41 mg d'isoflavones par litre [234]). La consommation d'isoflavones chez les nourrissons âgés de 4 mois nourris avec ces laits maternisés serait de 4,5 à 8 mg/kg PC/j [240]. Le lait provenant du sein maternel peut également contenir des isoflavones, en fonction du régime alimentaire de la mère et exposer les nourrissons à des quantités variables de phyto-œstrogènes. Ainsi, des concentrations allant de 5,1±2,2 à 70,7±19,2 nM voire 200 nM d'isoflavones ont été retrouvées dans les laits de mères consommant de la nourriture à base de protéines de soja [241]. Les variations du taux de génistéine en fonction de l'alimentation chez l'enfant sont rapportées dans le tableau 15.

Tableau 14 : quantité d'isoflavones ingérées par différentes populations

référence	pays/population	isoflavones totales	isoflavones individuelles	types d'aliments
deKleijn 2001[242]	USA 964 femmes ménopausées 35-81 ans	Médiane=0,154 mg (25-75ème perc= 0,099-0,235) (moyenne=0,760 mg ±4345) Forme aglycone	Génistéine 0,070 mg Daïdzéine 0,039 mg Formononétine 0,031 mg Biochanine-A 0,006 mg Formes aglycones	Haricots secs, pois, thé, café, fruits secs
KeinanBoker 2002[243]	Pays-Bas 17357 femmes 50-69 ans	Médiane=0,355 mg Moyenne=0,881 mg Forme aglycone	Médianes : Génistéine 0,141mg Daïdzéine 0,134 mg Formononétine 0,079 mg Biochanine-A 0,001 mg	Pois, haricots secs, céréales, café/thé, aliments à base de soja, fruits secs
Van Erp-Baart 2003[239]	Irlande 1379 Italie 1513 Pays-Bas 4085 Royaume-Uni 335	Non consommateurs de soja : Irlande 0,545mg ±0,337 Italie 0,554mg ±1,072 Pays-Bas 0,683mg ±0,372 Royaume-Uni 0,602mg ±0,350 Consommateurs de soja : Irlande (n=42) 5,996mg±8,123 Pays-Bas (n=85) 11,111mg±6,728 Royaume-Uni (n=15)3,176mg ±4,034		
Linseisen 2004 [244]	Allemagne Femmes non ménopausées	Médiane= 0,289 mg 11 (25-75ème % = 0,173-0,414) Forme aglycone	Médianes : Gén+Daïd=0,172 mg	Pousses soja, légumineuses, sauce soja, café
Kim 2001 [245]	Corée 3224 hommes 3475 femmes	14.88 mg	Génistéine 7,32 mg Daïdzéine 5,81 mg Glycitéine 1,75 mg	Soybeans, tofu, soybean, paste, soybeansprouts
Dai 2001[246]	ChinenShanghai 3015 femmes : 25-64 ans	Médiane=33,2 mg (25-75ème%=18,7-53,3) Moyenne=40,9 mg		
Yamamoto 2003[247]	Japon 21852 femmes, 40-59 ans		Quartile 1 : 6,9 mg ±2,6 Quartile 4 : 25.3 mg ±2.2 Forme aglycone	Soybeans, tofu, tofu frit,,Natto

Tableau 15: concentration de génistéine dans le sang, l'urine, la salive en fonction de l'alimentation chez les nourrissons

Auteur	Fluide mesuré	n	Âge	Génistéine (ng / ml)	Équol(ng / ml)
Lait nourrissons à base de soja au lait maternisé					
Irvine <i>et al.</i> [248]	Urine	4	2-16 semaines		
Yang Cao[249]	Urine	125	0-12 mois	5891 × / ÷ 3,1	2,3 × / ÷ 4,6
	Salive	119	0-12 mois	11,6 × / ÷ 5,1	-
	Sang	27	0-12 mois	757 × / ÷ 3,0	-
Les nourrissons, lait maternisé					
Irvine <i>et al.</i> (1998) [248]	Urine	25	2-16 semaines	-	
Yang Cao[249]	Urine	128	0-12 mois	11,8 × / ÷ 5,7	2,4 × / ÷ 2,1
	Salive	120	0-12 mois	0,7 × / ÷ 1,3	-
	Sang	30	0-12 mois	14,2 × / ÷ 1,5	-
Les nourrissons allaités					
Franke <i>et al.</i> [241]	Plasma	11	2-4 semaines	-	
Yang Cao[249]	Urine	128	0-12 mois	1,5 × / ÷ 4,8	1,7 × / ÷ 1,2
	Salive	120	0-12 mois	0,7 × / ÷ 1,3	-
	Sang	20	0-12 mois	10,8 × / ÷ 2,7	-

De plus, existe des suppléments alimentaires riches en isoflavones. Leurs contenus en phyto-œstrogènes sont extrêmement variables, cependant la prise quotidienne moyenne est estimée entre 30 et 70 mg d'isoflavones [250].

2.1.3. Métabolisme des phyto-œstrogènes (fig 22)

Les humains ne métabolisent pas les phyto-œstrogènes de la même manière en raison des différences dans les activités des enzymes les métabolisant et du fait de l'influence de la microflore intestinale sur la biodisponibilité des phyto-œstrogènes [251]. Les phyto-œstrogènes sont métabolisés avant tout par la flore intestinale, au niveau du grêle et du colon : par exemple la génistéine est hydrolysée et libérée de son sucre par la flore bactérienne et transformée ainsi en génistéine [252]. L'efficacité de cette «déconjugaison» dépend de l'équilibre de la flore, du sexe et de l'origine ethnique. Une absorption directe des molécules est possible en fonction de la perméabilité intestinale. Les phyto-œstrogènes sont ensuite métabolisés par le foie et éliminés majoritairement par les urines. Ainsi, Une fraction de la génistéine peut également migrer vers le foie pour y être conjuguée à l'acide glucuronique et/ou sulfatée [252]. Il existe par ailleurs un cycle entéro-hépatique d'une partie des molécules. Chaque phyto-œstrogène a une vitesse d'excrétion différente et des capacités de fixation sur

les protéines sériques variables. Par exemple pour une consommation unique de 16 mg/ kg PC de génistéine, la concentration de la génistéine non modifiée retrouvée dans le sang est de 0,07 μM , alors qu'elle est de 7,7 μM pour la génistéine et ses conjugués [253]. Les hommes éliminent 2 fois plus vite les phyto-œstrogènes que les femmes. La puissance d'action d'une molécule dépendra donc également des capacités de métabolisation et d'élimination de chaque individu. De fait, il est délicat d'extrapoler les résultats obtenus chez l'animal.

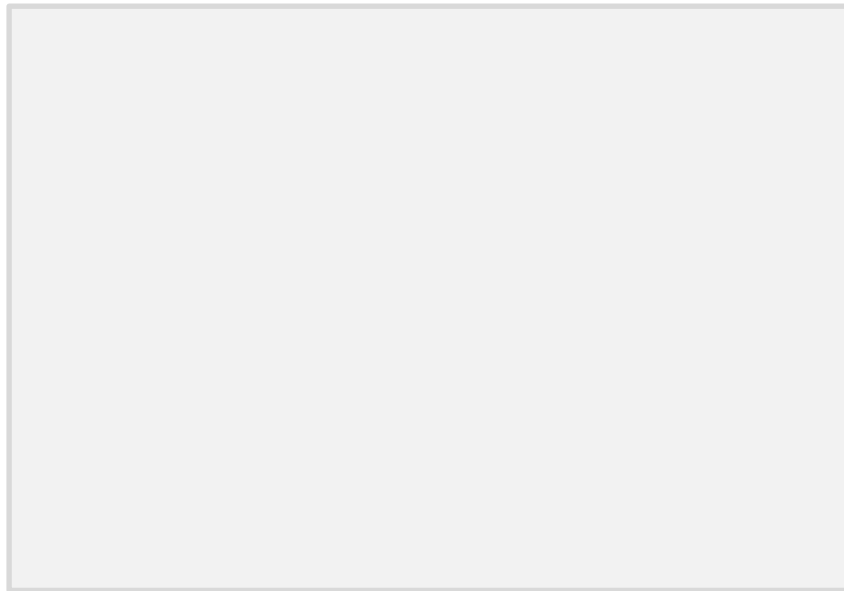


Figure 22 : absorption et métabolisation de la daidzéine. (d'après Chatenet C)

2.2. Voie transcutanée

Les chercheurs ont mis au point des hydrogels topiques contenant de la génistéine chargés de nanoémulsions. Les résultats ont montré un écoulement lent de la génistéine à travers la peau. Il pourrait s'agir d'une nouvelle possibilité de diffusion de molécules à travers la peau [254].

3. Effets des phyto-œstrogènes

3.1. Génotoxicité

A partir des souches de *Salmonella typhimurium* TA 1538, TA 98 et TA 100, la génistéine et la daidzéine à des concentrations allant jusqu'à 100 $\mu\text{g}/\text{plaque}$ en présence ou non d'activateur métabolique, ne sont pas mutagènes [255]. A partir d'un test comète réalisé sur des lymphocytes ou du sperme humain, Anderson *et al* [256] conclue à l'augmentation de l'incidence des cassures de brins d'ADN après exposition à la génistéine ou daidzéine (>10 μM). Ainsi, par son action sur la topoisomérase II (inibiteur) la génistéine intervient dans les

cassures de l'ADN et probablement dans l'apoptose (clastogénicité). Il a aussi été décrit par Kulling [257] avec le coumestrol (>50 mM), des cassures de chromatides et des délétions dans des cultures de lymphocytes

3.2. Effets œstrogénomimétiques

Les phyto-œstrogènes sont définis par leur capacité à induire *in vivo* des effets comparables à ceux des œstrogènes animaux (test utérotrophique et cornification vaginale). Ces effets sont liés à leur capacité à se fixer aux récepteurs des œstrogènes, du fait de leur analogie structurale avec ces composés. Ces effets sont répertoriés dans le tableau 16 [258]. Son action peut être œstrogénique à faibles concentrations et anti-œstrogénique à fortes concentrations [259].

Tableau 16 : effets œstrogénique de la génistéine

Génistéine (mg/kg/j)	4	40
distance AG	ND	ND
Taux d'hormone à jour 22	ND	ND
Poids utérus au jour 22	ND	Augmentation
Utérus poids à la semaine 12	ND	ND
l'ouverture vaginale	ND	Avancé
séparation du prépuce	ND	ND
Vagin frottis	ND	kératinisation persistants
1-7 semaines Poids du corps	ND	ND
Le poids corporel semaine 7 +	ND	Diminué
Les niveaux de progestérone	ND	Diminué chez les femelles
Poids des organes: les animaux adultes	ND	ND

Note. AG , la distance anogénitale ND , aucune différence

3.3.Effets chez l'embryon en cas de consommation maternelle de phyto-œstrogènes

Il n'a pas été mis en évidence de risque particulier pour le fœtus en cas de consommation modéré d'isoflavones comme c'est le cas dans les populations asiatiques[233]. L'étude de North & Golding [260] a montré une association forte entre le régime végétarien pendant la grossesse et l'incidence des hypospadias (odds ratio de 4,99 - Intervalle de confiance à 95 %, 2,10-11,88). Ces auteurs attribuent cet effet aux phyto-œstrogènes mais on pourrait aussi évoquer une plus grande exposition des végétariennes à des xénobiotiques œstrogéniques (herbicides et/ ou pesticides) ou un effet de carence alimentaire selon d'autres auteurs [261].

3.4. Effet chez le nourrisson ou le jeune enfant

D'après le rapport américain de Rozman *et al.*[262] l'exposition des nourrissons nourris exclusivement aux formules infantiles à base de protéines de soja pendant la période de 1 semaine à 4 mois peut atteindre jusqu'à 11 mg/kg/jour vers 1 mois et être responsable d'un taux d'isoflavones circulants de 3,5 µM.

Concernant les conséquences sur l'appareil reproducteur, au vues des études expérimentales, on pourrait s'attendre chez les jeunes garçons à une diminution de la production de LH qui se traduirait par une réduction du développement puis du fonctionnement testiculaire à l'âge adulte. Chez la fille on pourrait craindre une oestrogénisation de la gonade et éventuellement une masculinisation de l'aire sexuellement dimorphique de l'aire préoptique[233]. Cependant ces hypothèses n'ont jamais été vérifiées par la réalisation d'études chez l'homme. Il a par contre été établi que la prise de phyto-œstrogènes pouvait être responsable d'une puberté précoce [263], [264]. Fort *et al* [265] ont rapporté une plus forte proportion d'enfants atteints de maladies auto-immunes parmi des enfants nourris avec des préparations infantiles à base de protéines de soja.

3.5. Reprotoxicité

3.5.1. Chez la femelle

Chez les rates, l'exposition à 0,2 mg de génistéine/kg pc/j via la nourriture du 10ème jour de gestation jusqu'au 70ème jour après la naissance a provoqué une diminution du poids de leur utérus et de leurs ovaires et un oestrus irrégulier [266]. Néanmoins, des doses supérieures (0,4 et 4 mg/kg pc/j) via l'alimentation n'ont eu aucun effet sur le nombre et poids des nouveau-nées [267] montrant l'importance de la dose d'exposition.

À ce jour, seules deux études chez l'homme ont examiné la relation entre l'exposition aux phyto-œstrogènes et la fonction de l'appareil reproducteur féminin; dans ces études, l'exposition était postnatale. Une étude rétrospective a montré que les femmes nourries avec du soja avaient des saignements menstruels plus importants ainsi que des dysménorrhées [268]. Dans la deuxième étude qui comprenait près de 20 000 femmes, l'utilisation du lait de soja pendant l'enfance était associée avec un risque légèrement accru d'un diagnostic précoce des fibromes utérins [269].

3.5.2. Chez le mâle

Au niveau des organes sexuels on note chez le rat des malformations de l'appareil reproducteur (hypospadias, cryptorchidies) lors d'une exposition utérine, qui apparaissent à des doses de l'ordre du mg/kg/j pour la génistéine, donc compatibles avec des doses d'exposition alimentaire [270]. L'effet dépréciateur de la consommation de soja sur la production spermatique (passant vraisemblablement par un effet anti-LH) a été suspecté par Fisch *et al.*[271] qui montraient une concentration plus faible en spermatozoïdes chez les Asiatiques par rapport aux Occidentaux, ceci sans incidence sur la fertilité. Une étude récente de Chavarro *et al.* [272] indique une baisse significative de la production spermatique avec la prise de soja sur des volontaires adultes obèses.

3.6. Cancers

Gao a montré *in vitro* chez le rat que les phyto-œstrogènes pouvaient favoriser l'induction de l'apoptose [273]. Les incidences de plusieurs cancers hormono-dépendants, dont ceux de la prostate et du sein, sont plus élevées dans les pays occidentaux (Europe et USA) qu'en Chine ou au Japon [274]. Chez l'animal adulte, des travaux sur les lignanes font état d'un effet inhibiteur sur la croissance des tumeurs chimio-induites [275] et donc d'un effet protecteur des lignanes sur les cancers mammaires [234]. De plus, il a été montré en Asie qu'une exposition aux phyto-œstrogènes chez la fille dans l'enfance, l'adolescence et pendant la première partie de la vie d'adulte prévient le risque de cancer à la ménopause [276]. Cependant, une étude épidémiologique menée en Occident a montré une légère augmentation du risque de cancer du sein à faible dose [277]. Il est donc difficile de conclure sur les effets bénéfiques ou délétères des phyto-œstrogènes vis-à-vis du cancer du sein [234]. Sur les cancers de l'endomètre les études sont elles aussi contradictoires [234]. Sur le cancer de la prostate une étude chez le rat montre que l'incorporation de génistéine dans le régime inhibe de manière dose dépendante le développement d'adénocarcinomes invasifs induits par des cancérigènes [278]. Ses effets semblent également confirmés chez l'homme [279].

3.7. Autres effets hormonaux

- Perturbation Thyroïdienne : La nourriture standard pour rongeurs peut contenir des phyto-œstrogènes (dont la génistéine) en quantité suffisante pour présenter un effet œstrogénique, comparée à une alimentation spécifiquement dépourvue en phyto-œstrogènes [280]. Une activité goitrigène des phyto-estrogènes a été rapportée chez le rat dont

l'alimentation enrichie en extrait de soja augmente le poids de la thyroïde et diminue la captation d'iode [281].

- Ostéoporose : Chez l'homme, la génistéine et la daidzéine préviennent la différenciation ostéoclastique, augmentent la production de la phosphatase alcaline osseuse et la minéralisation des ostéoblastes, et diminuent la production de cytokines pro-inflammatoires comme IL-6 qui activent les ostéoclastes [282]. Chez les rates ovariectomisées on constate qu'une supplémentation en génistéine améliore la géométrie osseuse au niveau du fémur, l'effet sur l'ostéoporose étant confirmé sur d'autres études [283],[284]. Chez l'homme les données épidémiologiques indiquent que la consommation de phyto-œstrogènes est associée à une densité minérale osseuse plus élevée dans les populations consommant plus de soja que la moyenne [285-286], mais les données de Densité Minérale Osseuse (DMO) ne mette pas forcément en évidence de différence en fonction de la consommation ou pas de phyto-œstrogènes [287]. Malgré toutes ces données, on ne peut pas conclure de façon définitive à une prévention du risque fracturaire avec la consommation de phyto-œstrogènes [288].

3.8.Maladies cardio-vasculaires

Legette [289] a réalisé une étude chez les rates ovariectomisés. Il constate qu'une supplémentation en génistéine donne de modestes avantages pour la santé cardiaque. Il a été montré que les régimes riches en soja ou en protéines de soja avaient un effet hypocholestérolémiant chez l'Homme [290]. Néanmoins, les phyto-œstrogènes ne seraient pas les seuls responsables pressentis, les fibres ou les phytostérols du soja, structurellement similaires au cholestérol, ont montré des effets hypocholestérolémiants [291].

3.9.Comportement troubles neurologiques

Les rats mâles qui reçoivent un régime alimentaire contenant 150µg/g de génistéine montrent un comportement anxieux et un taux élevé de vasopressine et de corticostérone dans le plasma, indicateur d'un stress induit [292]. Chez l'homme il semble que les phyto-œstrogènes puissent avoir un effet protecteur contre la maladie d'Alzheimer [293]. Concernant le comportement alimentaire Flynn [294] rapporte que les rats exposés pendant la période de gestation et de lactation à 1 250 ppm préféraient la solution saline. Par contre, la génistéine n'avait aucun effet sur la préférence au sucre.

3.10. Glandes salivaires :

Kouidhi W [231] montre que chez les rats exposés à la génistéine (1mg/kg pc) pendant la gestation et la lactation que les canaux striés apparaissent plus larges et moins fréquents que chez les animaux contrôles (-15.2%; $p < 0.05$). Mais aucune étude dans la littérature n'a été faite chez le rat adulte.

D. Le bisphénol A

1. Définition et propriétés physico-chimique

Le Bisphénol A (BPA) est un composé chimique issu de la réaction entre deux équivalents de phénol et un équivalent d'acétone.

Il a été très étudié dans les années 1930 au cours de la recherche d'estrogènes de synthèse [295]. Il ne fut jamais utilisé comme œstrogène de synthèse du fait de la découverte à la même époque d'un autre composé de synthèse, le diéthylstilbestrol, dont les propriétés se révélèrent plus intéressantes. Le BPA fait partie des contaminants environnementaux qui possèdent des propriétés œstrogène-mimétiques et qui sont à l'origine de dysfonctionnements hormonaux constatés chez diverses espèces animales.

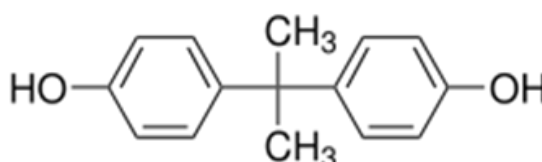


Figure 23 : formule chimique du BPA

Le BPA est une molécule sous forme de cristaux dont la solubilité est de 300mg/l. Les propriétés physicochimiques sont rappelés dans le tableau 17.

Tableau 17 : propriétés physico-chimiques du BPA

Propriétés physiques		Propriétés chimiques	
T° fusion	152 à 153 °C	Formule brute	C ₁₅ H ₁₆ O ₂ [Isomères]
T° ébullition	250 à 252 °C	Apparence	cristaux blancs
Solubilité	300 mg·l ⁻¹ (eau)	Masse molaire	228,2863 ± 0,0137 g·mol ⁻¹
Masse volumique	1,2 g·cm ⁻³		C 78,92 %, H 7,06 %, O 14,02 %
T° d'auto-inflammation	600 °C		
Point d'éclair	207 °C (coupelle ouverte)		
Pression de vapeur saturante	à 190 °C : 87 Pa		

2. Dose journalière tolérable

Une étude in vivo réalisée en 2002 chez le rat a montré un retard de la puberté des rats exposés in utero au BPA à la dose journalière de 50mg/kg. Chez une des lignées de rats femelles incluses dans l'étude, un retard significatif de l'âge à la puberté chez les descendants des animaux traités a été observé par rapport aux animaux contrôles (35.3 jours vs 33.8 jours). Cet effet n'a pas été retrouvé aux doses inférieures de BPA (20µg/kg/j et 100µg/kg/j). Les premières expériences réalisées sur des animaux de laboratoire ont estimé la plus faible dose testée ayant des effets délétères sur l'organisme (LOAEL) à 50mg/kg/j. Ceci a permis aux autorités réglementaires de fixer la dose journalière tolérable en 2006 à 50µg/kg [296]. Les effets du BPA détaillés plus loin montrent bien qu'il s'agit d'un perturbateur endocrinien pouvant avoir des effets à faible dose et ayant une courbe effet-dose non linéaire et non monotone.

3. Sources et voies d'exposition

Le BPA est utilisé comme monomère dans la fabrication industrielle (polymérisation) de plastiques de type polycarbonate et de résines époxy et comme antioxydant dans le polychlorure de vinyle (PVC) [297]. Les polycarbonates entrent dans la composition d'un très grand nombre d'objets courants (CD, lunettes, bouteilles plastiques...), alors que les résines époxy sont principalement utilisées pour réaliser le revêtement intérieur des boîtes de conserves ou les composites dentaires. C'est une substance chimique fabriquée en grande quantité (High Production Volume). Selon les données fournies par l'industrie (Plastics Europe), la production mondiale est supérieure à 3 millions de tonnes par année. Environ 75 % de la production européenne est destinée à la fabrication de polycarbonate. D'après les données de 2005 et 2006, 1,15 million de tonnes de BPA sont utilisés par année dans l'Union européenne avec une croissance de 6 à 10% par an [298].

3.1. Voies de contaminations du BPA

3.1.1. Exposition orale au BPA

Le BPA est retrouvé dans l'environnement, résultat d'une contamination à chaque étape de sa production, de sa transformation et de son utilisation. Ainsi, le BPA a été détecté dans les eaux de surface et les eaux souterraines, notamment dans des zones de pompage destinées à la distribution d'eau potable. Les concentrations en BPA mesurées dans les rivières de nombreux pays industrialisés sont inférieures ou égales à 8 ng/ml [299,300].

Dans l'air, des études ont montré la présence du BPA à des concentrations allant de 2 à 208 ng/m³ [301]. Les voies respiratoires sont donc une source possible d'exposition au BPA.

Cependant, cette voie pourrait être considérée comme une source importante pour les employés de l'industrie du plastique.

3.1.2. Contamination par l'alimentation

Quatre-vingt-dix-neuf pour cent de la contamination humaine par le BPA se fait par ingestion [302]. Pendant le stockage des aliments, une partie du BPA composant le contenant alimentaire est libérée par hydrolyse de la liaison ester qui lie les différents monomères, et se retrouve dans l'aliment. Ce taux de migration dépend directement des conditions de stockage et d'utilisation, comme la température et le temps de chauffage, la durée de conservation et le pH des aliments. Ainsi le chauffage à des températures élevées lors de la stérilisation (biberons) ou de l'appertisation (procédé d'autoclavage après la mise en conserve) accroît considérablement le passage du monomère, auquel vient s'ajouter sa migration dans le cas de stockage de produits alimentaires acides, aboutissant à augmenter les concentrations de BPA libre dans le produit consommé [300,303].

Une exposition orale au BPA est également observée après application de résines composites pour combler les caries chez les enfants et les adultes, ou dans le cas de scellement dentaire des premières et secondes molaires permanentes qui apparaissent vers l'âge de 6 et de 12 ans respectivement. Olea *et al* [304] ont ainsi détecté des concentrations élevées en BPA (3,3 - 30µg/ml) dans la salive prélevée 1 heure après l'application des composites dentaires composés de Bis-glycidyl diméthacrylate et de Bisphénol Adiméthylacrylate [304]. Concernant les composites dentaires, une étude [305] montrait que la concentration salivaire en BPA était 100 fois plus faible chez les individus sans composites. Toutefois, l'exposition au BPA dans le cadre d'un traitement dentaire représente un événement aigu et transitoire, et marginal par rapport aux autres sources d'exposition orale et, de plus, tous les composites dentaires ne libèrent pas autant de BPA.

3.1.3. Contamination transcutanée :

L'importance de la voie cutanée, considérée négligeable jusqu'à présent, a été mise en évidence très récemment [306, 307]. Le BPA est utilisé pour enduire les papiers d'impression thermique : en réagissant à la température, le BPA libère un colorant (lactone) donnant l'encre noire sur les tickets de caisse, relevés bancaires ... cette voie reste cependant négligeable.

3.1.4. Voie intraveineuse.

Le bisphénol A entre également dans la composition du PVC, et le PVC sert à la fabrication de matériel médical (cf. phtalates), dont le matériel utilisé dans les Unités de Soins Intensifs de Néonatalogie. Peu d'études ont cependant étudié la voie intraveineuse ou l'exposition des enfants prématurés au bisphénol A.

3.1.5. Voie transplacentaire.

Plusieurs études suggèrent que l'absorption et la distribution du bisphénol A dans les organes de la mère et dans le fœtus est très rapide, et qu'il peut traverser le placenta après administration orale chez les rats [300]. Chez l'humain, des résultats importants ont été obtenus par une équipe allemande en 2002 ; les concentrations moyennes en BPA dans le sang maternel était de 3,1 ng/mL, dans le sang fœtal de 2,3 ng/mL, et dans le tissu placentaire de 12,7 ng/g, indiquant une accumulation du BPA dans le placenta [308].

3.2. Exposition humaine environnementale au bisphénol A

Les résultats de différentes études sont rapportés dans les tableaux 18,19 et 20. Le BPA a été mesuré dans les tissus et les liquides humains des populations des pays industrialisés, à une concentration moyenne comprise entre 0,1 et 10nM. Elle concernait plus de 90% de la population de différentes études [303]. Au Canada, l'exposition de la population au BPA varie de 0,08 à 4,30 µg/kg p.c. par jour. D'autres sources indiquent une consommation qui varie de 0,028 à 0,18 µg/kg p.c. par jour chez les bébés, de 0,04 à 14,7 µg/kg p.c. par jour chez les enfants et de 0,36 à 0,43 µg/kg p.c. par jour chez les adultes (NTP-CERHR 2007 [309]), chiffre bien inférieurs à la DJA (50 µg/kg/j).

Les niveaux sériques en BPA dans la population adulte ont été estimés de 0,2 à 20 ng/ml [303,310,311]. Concernant la biodisponibilité, Völkel *et al.* [302] ont administré sous forme de gélule 5 000 µg en dose unique de BPA marqué au deutérium à des volontaires humains des deux sexes (correspondant à des doses variant de 50 à 90 µg/kg). Des prélèvements de sang et d'urine ont été effectués à intervalles réguliers au cours des heures qui ont suivi l'administration et ces échantillons ont fait l'objet d'analyses en GC-MS/MS et LC-MS/MS avant et après hydrolyse à la b-glucuronidase. Les résultats obtenus indiquent un pic plasmatique aux environs de 80 minutes après l'ingestion (concentration=800 nmol/l) et

montrent que le BPA circulant est presque exclusivement sous la forme de conjugué à l'acide glucuronique (BPA-glucuronide), ce qui suggère un large effet de premier passage et une faible biodisponibilité du BPA.

L'urine est considérée comme le meilleur liquide corporel pour estimer l'exposition humaine au BPA. Calafat *et al* ont mis en évidence la présence du BPA dans l'urine de 93% des individus [312]. Cette étude montre aussi une variation des niveaux urinaires du BPA en fonction de l'âge, avec des concentrations plus importantes chez l'enfant. Il a été démontré aussi des niveaux urinaires de BPA 10 fois supérieur chez les nourrissons prématurés hospitalisés en soins intensifs par rapport à la population adulte [313].

Le BPA est une molécule lipophile qui peut être retrouvé dans les graisses et le lait maternel. Le BPA a été décelé dans le lait maternel à des concentrations moyennes allant de 0,61 à 1,1 ng/ml [314,314]. Le BPA a également été mesuré dans le liquide amniotique au cours d'amniocentèses, effectuées avant la 20ème semaine de grossesse. Les concentrations détectées ont varié de 0,5 à 1,96 ng/ml [316]. Certains sérums fœtaux [311] ont aussi révélé des quantités détectables de bisphénol A.

Tableau 18: comparaison des taux urinaires de BPA (ng/ml)

Étude	Origine	Méthode de détection	DL (ng / mL)	Effectifs	% détection	Ratio AM /GM/médian	Gamme
Genius SJ	Canada	LC-MS	0.2	20 adultes	70	AM: 13 médiane de 8	0-42
Bushnik <i>et al.</i> [10]	Canada	GC-MS	0.2	5462 (âge 6-79)	90,7	GM 1.16	N / A
Calafat <i>et al.</i> [9]	USA	LC-MS	0.4	950 adultes	N / A	GM 2,4	N / A
Calafat <i>et al.</i> [8]	USA	GC-MS	0.1	394 adultes	95	GM 1,33 1,28 médian	0,1-5,18
Maures <i>et al.</i> [108]	Allemagne	GC-MS	3	15 adultes	60		ND-55
Mendiola <i>et al.</i> [107]	USA	LC-MS	0.4	375 hommes	90	GM 1,50	<0,- 6,5

DL: limite de détection; AM: la moyenne arithmétique; GM: moyenne géométrique; ND: non détecter; N / A: non disponible.
LC-MS: chromatographie en phase liquide-spectrométrie de masse.GC-MS: chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse.

Tableau 19: comparaison des taux sanguin

Référence	LOD (ng / mL)	Taille de l'échantillon	Population à l'étude	Taux de détection	BPA niveau [ng / mL (ppb), moyenne ± SE]
					Total des BPA
Ouchi et Watanabe 2002	0.2	48	étudiantes (Japon)	2% non conjuguée BPA, 100% BPA glucuronide	
Kim <i>et al.</i> 2003	0,28	15	Hommes coréens	100% non conjugué et le BPA totale	2,82 ± 0,73
		15	Femmes coréens		2,76 ± 0,54
Arakawa <i>et al.</i> 2004	0,38	36	hommes japonais	100%	Gamme, de 0,2 à 14 (mg / jour)
Calafat <i>et al.</i> 2005	0.1	184	homme américains	96%	GM, 1,63
		210	femmes américaines	94%	GM, 1,12
Ye <i>et al.</i> 2005b	0.3	30	Adultes américains	97%	Moyenne, 3,2
Joskow <i>et al.</i> 2006	0.1	14	hommes avant un traitement dentaire	NR	2,41 ± 0,33
Yang <i>et al.</i> 2006	0,026	172	Coréens	97,50%	Médian, 7,86
Wolff <i>et al.</i> 2007	0,36	90	filles américaines, 6-9 ans	94%	GM, 2.0
Calafat <i>et al.</i> 2008	0.4	314	enfants, 6-11 ans	92,6% de tous les individus examinés	GM, 4,3
		713	adolescents, 12-19 ans		GM, 2,8
		950	Adultes, 20-59 ans		GM, 2,4
		537	Adultes ≥ 60 ans		GM, 2,3
Teitelbaum <i>et al.</i> 2008	0,36	159 échantillons sur 35 enfants	Enfants américains, 6-10 ans	95%	GM, 3,4
Wolff <i>et al.</i> 2008	0,36	404	femmes enceintes américaines	90,80%	Gamme, ND-35.2
Ye <i>et al.</i> 2008b	0,26	100	femmes enceintes néerlandais	82%	Médian, 1,2

Abréviations: GM, la moyenne géométrique; LOD limite de détection LQ, limite de quantification;; ND, non détecté; NR, non déclarés; R

Comme l'urine, la salive est un fluide corporel potentiellement intéressant pour la bio-surveillance du fait de sa collecte nécessite des procédures non invasives. À ce jour, les études qui ont examiné le BPA dans la salive ont porté sur les effets de l'application de composites dentaires. Depuis les années 1960, le BPA a été utilisé comme composant de nombreux matériaux de restauration dentaire, y compris ceux utilisés pour les pansements d'étanchéité. Six études ont mesuré le BPA dans la salive après application d'un scellant dentaire, et tous étaient en mesure de détecter le BPA dans la salive de certains des individus examinés [304,305,317-320]. Ces études ont utilisé différentes méthodes analytiques et de la salive a été recueillie en différents points, après application d'un scellant. Bien que ces études fournissent des informations intéressantes sur la dynamique de la libération du BPA du matériau d'étanchéité peu de temps après le placement d'étanchéité [303], elles sont moins instructives sur l'utilisation de la salive comme une matrice pour la biosurveillance du BPA.

Joskow *et al.* [305] ont mesuré les concentrations de BPA dans la salive avant tout traitement, avec un niveau moyen de 0,3 ng / ml de salive; cette concentration est beaucoup plus faible que celle mesurée dans l'urine (Tableau 20).

Tableau 20 : concentration salivaire de BPA

Référence	(ng / mL)	Nb	Échantillon	Point final (s)	Niveau de lixiviation (pg / ml)
Olea <i>et al.</i> 1996[304]	NR	18	50 mg de composite dentaire appliqué à un total de 12 molaires	La salive 1 h après l'application	Gamme, de 3,3 à 30
Arenholt-Bindslev <i>et al.</i> 1999[317]	100	8	38 mg de composite, dentaire appliqué à un total de 4 molaires	La salive immédiatement après l'application	Gamme, ND-2.8, moyenne, 1,43
				La salive 1 h après l'application	Détectée dans aucun échantillon
				La salive de 24 heures après l'application	Détectée dans aucun échantillon
Fung <i>et al.</i> 2000[318]	5	22	32 mg composite dentaire appliqué à 4 molaires	H salive 1-3 après l'application	Gamme, 0.0058 à 0,1056
Zafra <i>et al.</i> 2002[320]	3	8	Les patients avec réparations dentaires	La salive 1 h après l'application	Gamme, 0.0153 à 0,0324
Sasaki <i>et al.</i> 2005[319]	NR	21	Les patients traités avec une des neuf résines composite	La salive immédiatement après l'application	Gamme, de 0.0210 à 0.0601
				La salive après l'application et de se gargariser	Gamme, 0.0016 à 0.0047
Joskow <i>et al.</i> 2006[305]	0.1	14	Les patients traités avec l'un des deux composites dentaires (Delton et Helioseal)	La salive avant application d'un scellant dentaire	0,00030 ± 0,000043
				La salive immédiatement après application d'un scellant Delton	0,0428 ± 0,01032
				La salive 1 h après application d'un scellant Delton	0,00786 ± 0,00424
				La salive immédiatement après application d'un scellant Helioseal	0,00054 ± 0,00020
				La salive 1 h après application d'un scellant Helioseal	0,00021 ± 0,000013

4. Métabolisme

Les études de toxicocinétique chez l'homme, par voie orale, indiquent une absorption importante, une biotransformation au premier passage et une élimination rapide du BPA. Dans le rapport EURA [321], chez des volontaires exposés à une faible dose par voie orale (54-88mg/kg) seul le BPA-glucuronide est mesuré dans le plasma. Le pic plasmatique de la molécule conjuguée est atteint en 80 minutes et sa concentration plasmatique diminue de façon exponentielle avec une demi-vie de 89 minutes. Son volume de distribution suit celui de l'eau intra et extracellulaire sans fixation évidente aux protéines plasmatiques. Le glucuronide est libéré par le foie dans la circulation systémique et excrété dans l'urine. On n'a pas mis en évidence de cycle entéro-hépatique contrairement aux rongeurs. La concentration urinaire

atteint un pic 6 heures après administration. Si le BPA a une faible activité, son dérivé glucurono-conjugué n'en a aucune. Après administration orale de BPA la conjugaison et l'élimination sont rapides (quelques heures) et quasiment totales. La concentration sanguine du BPA libre disponible pour une fixation aux récepteurs œstrogénique est donc très faible ($<1.25\mu\text{g/l}$) [321].

5. Données toxicologiques et métabolisme

Les études sur les effets du bisphénol A *in vitro* et *in vivo* chez les rongeurs sont nombreuses, et décrivent les conséquences néfastes d'une exposition. Vingt-deux études sur les effets du BPA ont retrouvé une courbe dose-réponse en U-inversé (études listées par Vom Saal [322]). Cette relation dose-réponse en U-inversé suggère que d'anciennes études n'examinant que quelques doses (doses élevées qui plus est) ne sont pas pertinentes pour l'évaluation du risque, puisque des effets sont susceptibles de n'apparaître qu'à l'intérieur d'une fourchette spécifique. Les différents effets démontrés *in vitro* et *in vivo* chez les animaux sont présentés ci-après.

5.1. Cytotoxicité et génotoxicité

Les données obtenues semblent montrer que le BPA n'est pas mutagène, mais présente une activité génotoxique. Naik *et al* a montré que bien que BPA n'induisait pas d'aberrations classiques chromosomiques et des micronoyaux, son potentiel génotoxique était manifeste sous la forme de la lésion achromatique et mitotiques dans les cellules de la moelle osseuse [323]. Il a été montré que le BPA était largement métabolisé par plusieurs lignées cellulaires, surtout dans les cellules intestinales [324] et qu'il diminuait le nombre de spermatozoïdes et la qualité du sperme et induisait des ruptures de brins d'ADN dans les lymphocytes et les cellules de la rate, des reins, des poumons et dans les cellules germinales [325]. Certaines hypothèses ont été évoquées dans des études avec des composites dentaires : le HEMA (2-hydroxyéthyle méthacrylate) et le Bis-GMA (bisphénol A-diglycidyleméthacrylate) (utilisés dans les composites dentaires) induisent des cassures double-brin de l'ADN dans des cultures de fibroblastes gingivaux humains, en partie via un mécanisme oxydatif. La vitamine C ou la mélatonine pourraient réduire les effets néfastes induits par les méthacrylates utilisés en dentisterie [326]. Il a aussi été démontré que le bisGMA 1 a un effet cytotoxique et génotoxique sur la lignée de cellules macrophages murines RAW264.7 et que cette activité était médiée par l'altération de l'ADN et l'activation de caspases [327]. De plus, il semble que le BisGMA ait une activité cytotoxique. Il induirait une régulation à la hausse de la production du TNF alpha ainsi que de l'expression des antigènes de surface appartenant à la

lignée de macrophages murins RAW264.7 [328]. Ces résultats indiquent que ces deux adhésifs sont des inducteurs de toxicité génétiques, la recombinaison mitotique étant le principal mécanisme d'action [329]. De plus, Iso *et al* suggèrent que le BPA provoque une génotoxicité ER dépendante [330].

5.2.Effets consécutifs à une exposition in utéro

Concernant l'embryogénèse, une étude menée sur des œufs d'orveau a montré qu'une exposition au bisphénol A (0,05 ; 0,2 ; 2 et 10µg/mL) perturbait l'embryogénèse et pourrait nettement réduire le taux d'éclosion des embryons, augmenter les taux de malformation congénitale et supprimer la métamorphose des larves [331]. Il a également été démontré que l'exposition au BPA à un niveau d'imprégnation maternelle de 30-50 ng/mL BPA se traduit par un impact hormonal (Baisse de l'hormone LH) et un faible poids à la naissance [332]. Chez le têtard, il a été montré que le BPA modifiait le fonctionnement thyroïdien [333]. Il a également été démontré chez la souris que l'exposition au BPA au cours des périodes périnatale et postnatale affectait les fonctions endocrines de l'axe hypothalamo-hypophysogonadique (HPG) et provoquait des troubles de la reproduction. Les auteurs concluent que ces effets pourraient être dus à l'action du BPA sur la stéroïdogénèse gonadique et donc à la libération anormale d'hormones stéroïdes endogènes [334,335].

De plus, il semble que l'imprégnation du fœtus par du BPA ait des effets sur la capacité reproductive des rats adultes en effet une étude réalisée chez le rat à des doses de 1.2mg/Kg/j montre que le BPA modifie chez la descendance femelle à l'âge adulte le cycle de reproduction ainsi que l'anatomie et la physiologie utérine [336] de même une étude menée chez la rate gestante à la dose de 20mg/kg/j montre que le BPA diminue le pool folliculaire primordial en stimulant le recrutement initial néonatal [337]. Chez la souris il a été démontré que l'exposition maternelle au BPA affectait les premières étapes de l'ovogénèse dans l'ovaire en développement du fœtus avec des défauts méiotiques responsables d'anomalies embryologiques dans la génération suivante [338].

Concernant l'inflammation, une exposition périnatale au bisphénol A par injection intrapéritonéale chez la souris gestante et jusqu'à la fin de la lactation entraîne une modification de la production des cytokines chez la descendance mâle à l'âge adulte. On observe une modification de l'équilibre entre le profil Th1 et Th2 caractérisé par une prépondérance de type Th1 pro-inflammatoire [339]. Il a également été démontré chez les rats

nouveau-nés qu'une exposition in utero et pendant l'allaitement au BPA augmentait le risque de développer une inflammation intestinale sévère à l'âge adulte [340].

Au niveau cérébral, une étude faite sur des cultures de cellules hypothalamiques de fœtus de rat montre que le BPA modifie le développement dendritique et synaptique par l'intermédiaire de voies de signalisation cellulaire distinctes [341]. L'ingestion de BPA au cours de la grossesse provoque des troubles de la fonction cognitive et des pathologies de type dépression par trouble du taux de monoamine impliqué dans la neurotransmission [342]. Il a été démontré qu'à des doses de 40µg/Kg /j pendant la grossesse ou la lactation (doses inférieures à la DJA), on provoquait chez les femelles rats de l'anxiété et chez les 2 sexes des troubles de la reconnaissance spatiale [343]. Les auteurs s'accordent sur le fait qu'une exposition périnatale au BPA pourrait avoir un impact important sur l'organisation des circuits neuronaux spécifiques, pouvant ensuite affecter des comportements et des fonctions complexes [344,345]. Enfin, concernant le risque de cancer, l'exposition prénatale au BPA peut prédisposer la glande mammaire au processus de cancérogénèse chez le rat adulte [346].

5.3.Reprotoxicité

5.3.1. chez la femelle

Au niveau des cellules reproductrices, le BPA perturbe le fonctionnement des cellules de la granulosa ovarienne chez le porc via un effet de promotion du processus d'angiogenèse [347]. De plus, le BPA 44µM et 440µM inhibe la production de progestérone, de déhydroépiandrostérone, d'androstènedione, d'estrone, de testostérone et d'œstradiol [348]. Ces données montrent que le BPA cible la voie de biosynthèse de l'œstradiol dans l'ovaire [347, 348]. Le BPA altère les possibilités de reproduction : chez l'isopode terrestre *Porcellioscaber* le BPA a augmenté le nombre d'avortements avec une courbe en U en fonction de la dose [349].

Chez la femme, il a été constaté qu'il existait une association entre les concentrations de BPA et de SHBG (globuline se liant aux hormones sexuelles) [350]. De plus, chez 60 femmes pré-ménopausées les concentrations urinaires de BPA étaient associées à la diminution de la réponse ovarienne chez les femmes subissant une Fécondation In Vitro [351]. De plus, il a été montré chez 60 femmes dans le troisième trimestre de grossesse que la concentration totale de BPA allait de <0,4µg/L à 6,7 µg/L. Les femmes qui ont donné naissance à 37 semaines de gestation et prématurément (< 37 semaines) avaient des concentrations urinaires de BPA plus élevées que les femmes ayant donné naissance après 37 semaines, le phénomène

était encore plus marqué pour les naissances <37 semaines [352]. Par ailleurs il a été montré que les taux de BPA dans le sang des jeunes filles ayant une puberté précoce étaient plus élevés que celui des jeunes filles ayant une puberté normale. Ces résultats étaient également en corrélation avec le volume augmenté de l'utérus et des ovaires [353].

5.3.2. Chez le mâle

Chez le rat mâle, il a été montré que le BPA provoquait d'une diminution des cellules de Leydig (ces cellules sont des cellules interstitielles situées dans le testicule et produisant la testostérone) mais la dose utilisée l'a été à des doses supérieures à la DJA [354]. Chez la souris il a été montré que l'exposition pubertaire au BPA induisait l'apoptose des cellules germinales dans les testicules, non seulement par la voie de signalisation Fas/FasL, mais aussi par la voie mitochondriale apoptotique [355]. Les études chez l'homme montrent qu'il existe un lien entre le taux urinaire de BPA et la qualité du sperme d'un facteur de 3 à 4 [356, 357]. Le BPA urinaire pourrait, de plus, être associé à l'augmentation des lésions de l'ADN du sperme [358]. Il y a donc une corrélation dose-réponse entre une mesure biologique du niveau de BPA dans les urines et le déclin de la fonction sexuelle masculine [356]. De plus, une étude sur les ouvriers chinois exposés professionnellement au BPA a montré une réduction du désir sexuel, des difficultés érectiles et d'éjaculation ainsi qu'une satisfaction de vie sexuelle réduite. Ces altérations étaient de type doses dépendantes [359]. Concernant les taux hormonaux, une étude suggère que, chez les hommes fertiles, une exposition à des niveaux environnementaux faibles de BPA pourrait être associée à une réduction modeste des marqueurs de la testostérone libre, mais les effets sur la fonction reproductrice sont probablement mineurs, et ont une signification clinique incertaine [360]. Cependant Meeker *et al* constate qu'il existe une relation inverse entre les concentrations urinaires de BPA et l'indice d'androgènes libres, l'œstradiol, et la TSH [361]. Cet effet est également retrouvé par Galloway *et al* qui a trouvé que l'excrétion quotidienne de BPA était associée à la concentration totale de testostérone chez les hommes [350].

5.4. Cancers

Selon Cavalieri, une exposition au BPA entraînerait des processus métaboliques pouvant augmenter le risque de développer un cancer [362]. En effet, des essais sur cellules mammaires humaines de type MCF-10F montrent que le BPA est capable d'induire une

transformation néoplasique de ces cellules [363]. Dans une lignée cancéreuse colique exprimant le récepteur ER, le BPA diminue l'activation de la cascade apoptotique induite par le 17 β -estradiol (E2) qui est à la base du rôle protecteur joué par l'hormone contre le cancer du côlon, sans pour cela toucher l'activité du récepteur ER. Il semblerait ainsi que les femmes soit une population très vulnérable avec un risque accru de cancer du côlon après une exposition BPA[364]. De plus une autre étude sur les neuroblastomes montre que le BPA favorise fortement l'invasion et les métastases des cellules du neuroblastome par la surexpression des MMP-2 et MMP-9, une baisse de l'expression du TIMP-2 ainsi que la phosphorylation de la protéine kinase Akt [365]. De plus le BPA diminue un mécanisme de défense contre l'angiogenèse (permettant la croissance de nouveaux vaisseaux et jouant un rôle majeur dans la croissance des tumeurs malignes et le développement des métastases)[366]. Il semble de plus que le BPA favorise la résistance à la chimiothérapie (cisplatine, doxorubicine, taxol, vinblastine) [367].

Si les études sont nombreuses *in vitro* elles restent rare *in vivo* chez l'homme. Une étude s'est intéressée aux taux de BPA sérique et à la densité mammaire. Les résultats suggèrent que des niveaux plus élevés de BPA sériques sont associés à une densité mammaire (liée au risque de cancer du sein) plus élevée de 5%. Les auteurs concluent que des recherches supplémentaires sur l'influence potentielle du BPA sur le risque du cancer du sein chez l'humain sont justifiées [368].

5.5. Autres troubles endocriniens

Au niveau des cellules hormonales, une étude menée dans les cellules pituitaires de rat (GH3/B6/F10) montre que de très faibles concentrations de xéno-oestrogènes, tels que le bisphénol A, ont un effet perturbateur sur l'action des œstrogènes endogènes qui leur sont structurellement liés, en modifiant les mécanismes de signalisation et la sécrétion de prolactine [369].

Différentes études ont mis en évidence une relation entre diabète et BPA : Shankar A *et al* sur l'enquête cohorte National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) a trouvé que les niveaux de BPA urinaires sont associés au diabète sucré, indépendamment des traditionnels facteurs de risques liés au diabète [370].

Le même auteur de cette étude réalisée dans le cadre de la NHANES 2007-2008 a montré, chez 1346 sujets adultes et 329 adolescents, qu'il existait une association inverse entre les

concentrations urinaires de BPA, et les concentrations d'hormones thyroïdiennes T4 (total et libre), de T3 (total) et de thyroglobuline (et donc une association positive avec la TSH). Ces résultats n'ont pas été confirmés par Ning G sur 3423 participants [371].

5.6.Troubles cardio-respiratoires

- Concernant les maladies cardiovasculaires, une étude réalisée chez 1380 sujets faisant partie de l'enquête NHANES 2003-2004 a permis de constater une association positive entre l'augmentation des niveaux de BPA et l'hypertension, indépendamment des facteurs de confusion possibles que sont l'âge, le sexe, la race/ethnie, le tabagisme, l'IMC, le diabète sucré et les niveaux de cholestérol total [372]. Il a également été démontré dans la population de l'étude NHANES un lien entre les niveaux d'imprégnation élevés en BPA et la survenue de maladies coronariennes et, dans une moindre mesure, de diabète [373]. Ces résultats ont été confirmés par l'étude de Melzer D *et al* réalisée au Royaume Uni sur 758 cas [374].

- Concernant les troubles respiratoires, une étude a mesuré les concentrations en BPA chez 398 couples mère-enfant et a estimé les problèmes respiratoires rapportés par les parents chez leur enfant tous les 6 mois pendant 3 ans. Le BPA a été détecté chez 99% des échantillons d'urine maternelle pendant la grossesse. Les données obtenues pour 365 enfants ont montré que la moyenne de BPA prénatale était associée à une probabilité accrue de sibilants respiratoires au début de la vie, l'effet diminuant au fil du temps. L'évaluation a révélé une association entre les sibilants respiratoires de six mois à trois ans et les concentrations de BPA à seulement 16 semaines de gestation [375].

5.7.Système immunitaire

Concernant l'inflammation, dans des chondrocytes le BPA perturbe les effets protecteurs de E2 en fonction de sa concentration et pourrait favoriser l'ostéoarthrite [376].

L'impact du bisphénol A sur le système immunitaire en se basant sur les données américaines de la National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) de 2003-2006 a été étudié. Il semble que le BPA pourrait avoir un impact négatif sur la fonction immunitaire de l'homme comme le montre l'association entre les taux d'anticorps anti- CMV et les concentrations urinaires de BPA [377].

5.8.Troubles neurologiques et du comportement

Une étude de cohorte prospective qui portait sur 244 mères et leurs enfants âgés de 3 ans montre que du BPA a été détectée dans plus de 97% des échantillons d'urines au cours de la grossesse ainsi que chez les enfants. Les auteurs ont trouvé que l'exposition au BPA pendant la grossesse affectait le comportement et le contrôle des émotions des enfants à l'âge de 3 ans, surtout chez les petites filles [378].

Une autre étude qui s'est intéressée aux répercussions neurocomportementales chez 350 nouveau-nés de 5 semaines en rapport avec l'exposition intra-utérine au BPA, via des mesures de concentration dans le sang maternel à 16 et 26 semaines de grossesse, ne retrouve pas d'association évidente entre l'exposition prénatale au BPA et la présence d'anomalies neurocomportementales [379].

Xu a montré une modification du comportement alimentaire après une exposition au BPA à la période périnatale à des doses de 0,01, 0,1 et 1,0 mg / L. Il constate une féminisation de la préférence gustative des mâles qui consomment plus de saccharine ($p < 0.01$). Alors qu'il ne semble pas y avoir d'effet chez la femelle. Les mâles traités par BPA ont montré un excès de poids ($p < 0,001$), un pourcentage plus élevé de graisse ($p < 0,001$) que le groupe témoin.

3. Problématique et objectifs de la thèse

Cette étude bibliographique nous a permis de relever plusieurs points clé pour notre projet d'étude du BPA sur l'homéostasie buccale :

D'une part, l'homéostasie buccale implique de maintenir un épithélium buccal en bon état qu'il soit spécialisé ou pas, et des dents en bonne santé. Elle nécessite le bon fonctionnement des glandes salivaires, la salive agissant comme un film protecteur et antibiotique, pour protéger l'épithélium buccal et l'email dentaire des agressivités chimiques et bactériennes, mais aussi comme un catalyseur des perceptions gustatives, notamment via les protéines spécialisées qui assurent le pouvoir tampon et anti-inflammatoire, mais aussi via les facteurs de croissances indispensables au bon fonctionnement de des bourgeons du goût et au renouvellement de l'épithélium. La présence d'un dimorphisme sexuel au niveau des glandes salivaires et des organes gustatifs qui se répercutent sur les choix gustatifs sucré et salés nous a conduits à prendre en considération l'impact des hormones sexuelles dans le maintien de l'homéostasie buccale, en particulier dans les mécanismes de maturation et de cicatrisation de l'épithélium buccal et dans la régulation des sécrétions salivaires. .

Cette analyse bibliographique souligne la sensibilité androgénique et œstrogénique des glandes salivaires résultant de l'expression des récepteurs aux hormones sexuelles. Elle identifie les glandes salivaires comme un organe exprimant peu ou pas le récepteur ER α , et pouvant développer des états pathologiques en lien avec un dérèglement hormonal. Ceci nous amène de prendre en considération l'action des hormones sexuelles sur les propriétés exocrines, mais aussi endocrines, des glandes salivaires, et de considérer ces organes comme une cible privilégiée des perturbateurs endocriniens, notamment de composés œstrogénique.

Le Bisphénol A et les phyto-œstrogènes sont des perturbateurs endocriniens présents dans notre bol alimentaire, qui possèdent des propriétés oestrogénomimétiques et antiandrogéniques. Ces 2 perturbateurs endocriniens ont une capacité de liaison reconnue pour les ER β , mais se distinguent par leur degré d'affinité pour ces récepteurs. Ils exercent des effets physiologiques allant d'une altération du fonctionnement de certains organes (organes reproducteurs, glande mammaire) à une modification du comportement (alimentaire, sexuel ou social). Dans la mesure où les glandes salivaires et l'épithélium buccal sont sous dépendance hormonales il peut être légitime de se demander quel pourrait être l'impact de perturbateurs endocriniens tel que le BPA et les phyto-œstrogènes sur l'homéostasie buccale.

Ceci nous a conduits à réaliser ce travail afin de préciser l'action des xéno-hormones sur l'homéostasie buccale chez le rat mâle adulte en considérant trois cibles hormone-réglées : le comportement gustatifs, l'intégrité de l'épithélium buccal, et les glandes salivaires. Trois scénari ont retenu notre attention :

1) La libération du BPA présent dans les composites dentaires ou dans les plastiques médicaux expose la sphère buccale à un pic de concentration en BPA : quels sont les effets du BPA en fonction de la dose, et sont-ils réversibles ? Pour cela nous avons développé une étude effet doses sur laquelle nous avons également regardé la réversibilité fonctionnelle à l'arrêt du traitement.

2) La consommation de protéine à bases de soja apporte un cocktail de phyto-œstrogènes à des quantités bien supérieures à celles d'un régime classique : afin de connaître l'impact d'un tel régime sur la sphère buccale, nous avons comparés les effets 'un régime à base de soja avec un régime totalement dépourvu de phyto-estrogènes

3) notre alimentation nous expose simultanément à des résidus de BPA et à des phyto-œstrogènes et de possibles interactions ne peuvent être exclues : nous avons donc étudié les effets d'une faible dose de BPA en fonction de la présence de phyto-œstrogènes dans le régime alimentaire.

Les chapitres suivants rapportent les résultats obtenus et les questionnements scientifiques qu'ils soulèvent et l'analyse qui peut en être fait au regard des données de la littérature et du contexte médico-social actuel vis-à-vis des personnes hautement médicalisées ou de populations ciblées par ce type d'exposition.

Deuxième Partie : Etudes expérimentales

I. Effets d'une exposition orale en Bisphénol A sur les préférences gustatives et l'homéostasie buccale chez le rat mâle adulte : étude effets-dose

1. But de l'étude

Le BPA est présent dans notre alimentation mais également dans nos soins dentaires. Si son impact a bien été étudié chez le nourrisson (avec l'interdiction récente des biberons en France) ou en ce qui concerne le développement sexuel, son effet sur l'homéostasie buccale n'a pas été étudié.

Il nous a semblé important d'envisager son impact sur les modifications du comportement alimentaire et l'état endobuccal. L'ingestion de BPA par « contamination alimentaire » est faible, chronique et prolongée alors qu'elle est plus importante et de courte durée en cas de traitement dentaire. Il nous paraissait donc intéressant d'étudier les effets du BPA à différentes concentrations afin de pouvoir avoir une idée du retentissement chronique de son ingestion mais également des effets d'une exposition plus aiguë.

Le but de l'étude est de savoir si chez le rat la prise de BPA dans l'alimentation (eau de boisson) modifie :

1. l'homéostasie buccale, en étudiant les modifications histologique et immunohistologique de l'épithélium buccal, des glandes salivaires,
2. la préférence gustative pour les goûts sucré, salé et gras et ce pour différentes concentrations de BPA.

2. Matériel et méthodes

2.1. Déroulement de l'expérimentation animale

2.1.1. Produits chimiques

Le BPA, la saccharine, le NaCl, le xanthane (pureté supérieure à 98%) ont été obtenus auprès de Sigma-Aldrich (Saint-Quentin, Fallavier, France). L'huile de maïs était originaire de System U (Rungis, France). Les produits chimiques utilisés pour l'analyse histologique provenaient de sources commerciales standards et présentaient la plus haute qualité.

2.1.2. Animaux et modalités d'expositions au BPA:

La procédure expérimentale a été approuvée par le comité d'éthique local de l'Université de Bourgogne. A leur arrivée, un total de 60 rats mâles Wistar âgés de cinq semaines (Harlan France SARL, Gannat, France) ont été acclimatés à l'animalerie dans des conditions contrôlées (22 °C, 55% d'humidité relative, alternance jour/nuit de 12 heures) et dans des conditions d'élevage visant à se protéger de toute source de contamination œstrogénique via l'environnement ou la nourriture. Pour cela, les rats ont été logés dans des cages en polypropylène (3 à 4 par cage, plastique sans BPA) et nourris *ad libitum* avec un régime synthétique dépourvu de phytoestrogènes (régime L5, INRA, Jouy-en-Josas, France). L'eau, décontaminée de toute trace de pesticides par filtration sur charbon actif, était distribuée dans des biberons, également en polypropylène.

A l'âge de 12 semaines (poids de 440 à 450 g), les rats ont été placés en cage individuelle et répartis au hasard en cinq groupes (12 rats par groupes), un groupe témoin et 4 groupes exposés au BPA pendant 6 semaines *via* l'eau de boisson (0 ; 0.12 ; 1.2 ; 120 et 300 mg/l) pour administrer les doses journalières suivantes: 0, 5 µg/kg, 50 µg/kg, 5 mg/kg et 12.5 mg/kg de masse corporelle. La dose la plus élevée correspondait à une solution de BPA saturée (solubilité: 300 mg/l). Le bon état des animaux a été évalué sur la base de la prise de poids corporel et de la consommation d'eau et de nourriture deux fois par semaine. Lors de cette première phase un test sur les préférences gustatives était réalisé. Au bout de 6 semaines d'imprégnation au BPA, 6 animaux par groupe étaient randomisés pour être sacrifiés. Les rats restant n'étaient plus exposés au BPA pendant 6 semaines (phase 2). La persistance d'un effet BPA était recherché avec une nouvelle étude des préférences gustatives, puis, les rats restant étaient sacrifiés.

2.1.3. Test de Préférences gustatives

La préférence gustative a été évaluée au cours des 10 derniers jours de chaque phase en soumettant les animaux pendant 3 jours consécutifs au choix de 2 biberons, l'un contenant de l'eau pure (ou le xanthane 0.3%), l'autre contenant la solution sucrée (saccharine à 0.3%), salée (NaCl à 1%), ou grasse (huile à 1% et Xanthane à 0.3%). Les rats ont été préalablement familiarisés à la présence des deux biberons pendant 3 jours. Pendant le test, la position des biberons était inversée chaque jour; la consommation de boisson était mesurée par pesée des deux biberons chaque matin à la même heure. Les résultats sont exprimés en valeur relative de la quantité consommée par jour (g) par rapport au poids du rat (g consommés / jour /100 g de poids corporel). La préférence gustative a été définie sur la base du rapport entre la

quantité moyenne de solution test consommée sur les 3 jours du test et la quantité moyenne de boisson totale consommée au cours de ces 3 jours.

2.2. Sacrifices et analyse des échantillons prélevés

2.2.1. Rats sacrifiés : pesée et glycémie

La veille du sacrifice les rats étaient mis à jeûn. Le jour du sacrifice les rats étaient pesés et bénéficiaient d'une mesure de la glycémie par un Glucomètre (Accu-Chek) à bandelette, en réalisant un prélèvement sur la veine de la queue du rat. Le rat était alors anesthésié à l'isofluorane (2.5%) puis sacrifié par exsanguination. Pour ce faire une incision abdominale en U était réalisée. Après avoir écarté les intestins on identifiait la veine cave inférieure et l'aorte abdominale. L'exsanguination était réalisée par ponction dans l'aorte abdominale. Le foie, les glandes salivaires sublinguales, submandibulaires et parotidiennes étaient pesées puis conditionnées pour l'histologie ou la PCR.

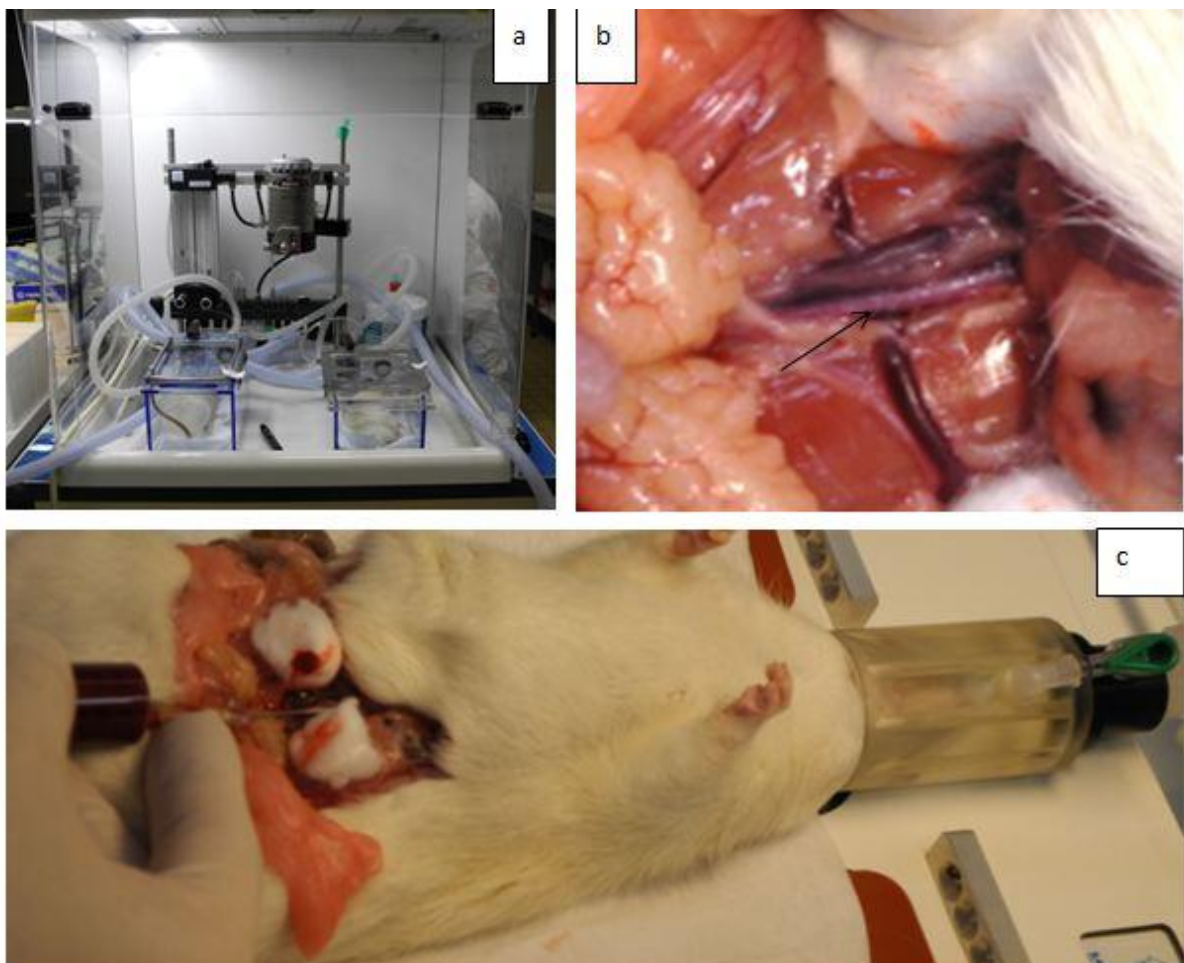


Photo 4: sacrifice a) anesthésie puis b) repérage de l'aorte abdominale et c) exsanguination du rat par ponction de l'aorte abdominale (fleche).(m folia INRA)

2.2.2. Mesure de l'EGF sanguin

Le prélèvement obtenu par exsanguination était de l'ordre de 10 ml. Le sang était centrifugé afin de récupérer le plasma. Ce dernier était ensuite conservé au congélateur (-40°C).

La concentration d'EGF plasmatique était estimée grâce au test ELISA Immunotech Kit (Peprotech Paris, France). Le dosage d'EGF pour chaque rat était réalisé en double.

2.2.3. Histologie de l'épithélium

La muqueuse buccale jugale gauche a été prélevée sur les rats sacrifiés. Ce prélèvement, réalisé au moyen d'un scalpel après luxation de la mâchoire inférieure (photo7), était alors inclus en paraffine. Des coupes de 5µm d'épaisseur étaient réalisées et la coloration utilisée était l'hémalun – éosine. Des photos de l'épithélium buccal ont été prises sous microscope (Nikon Eclipse E600, X10) au hasard, sur des zones distinctes et non chevauchantes, et analysées à l'aide du logiciel Nis-Br. Une mesure de l'épaisseur de l'épithélium et de la couche cornée a été réalisée. Vingt mesures sur 10 photos étaient réalisées par rat. Ont été étudiées l'épaisseur de la couche épithéliale (ce) et celle de la couche cornée (cc).

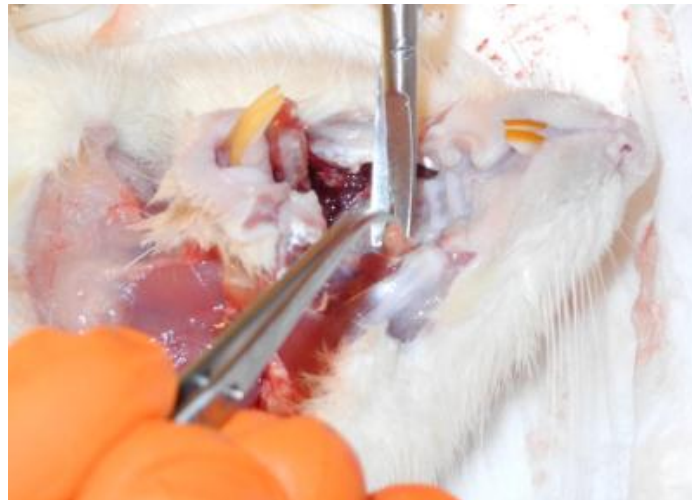


Photo 5 : luxation de la mâchoire inférieure et prélèvement de la muqueuse jugale (m folia INRA)

2.2.4. Prélèvement et analyse des glandes salivaires

2.2.4.1. Prélèvement des glandes salivaires

Le prélèvement était pratiqué immédiatement après la mort de l'animal. Dans un premier temps, une incision verticale de la peau du haut du thorax jusqu'à la mandibule inférieure était réalisée. Elle était complétée par 2 contre-incisions de part et d'autre de la mandibule.

Les glandes submandibulaires et sublinguales qui sont accolées chez le rat se situent au niveau médian. Elles étaient facilement repérées et prélevées puis, les glandes submandibulaires étaient dissociées des sublinguales pour être analysées séparément (figure 8). Les parotides sont disposées à l'arrière des glandes lacrymales et sont intégrées dans du tissu adipeux. Elles étaient prélevées en dernier, la glande étant mal limitée le prélèvement était plus délicat. Les différentes glandes étaient pesées après leur prélèvement, puis congelées (GSM, GSL) ou placées dans des cassettes d'inclusion (parotides) qui étaient ensuite immergées dans un fixateur.



Photo 6 : glande sublinguale (GSL) et la glande submandibulaire (GSM) (folia INRA)

2.2.4.2. Etude histologique

Les différentes étapes de l'étude histologique sont rappelées dans la figure 24.

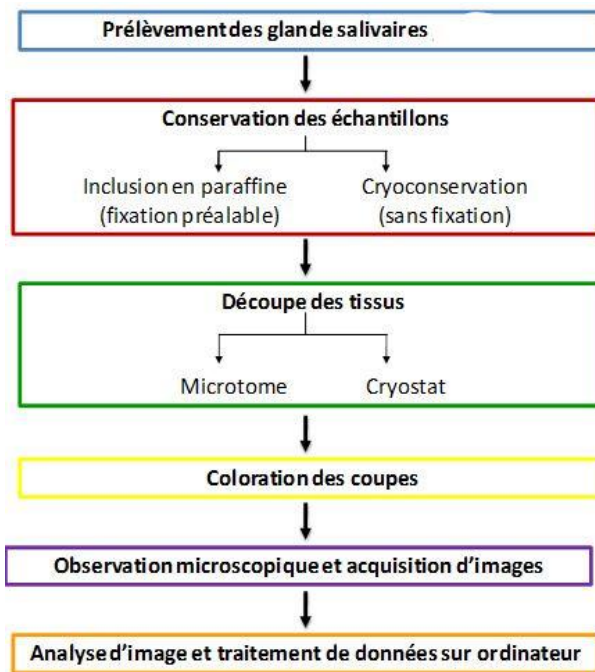


Figure 24 : principales étapes de l'étude histologique des glandes salivaires

a) Conservation des échantillons

○ Cryoconservation (GSM et GSL)

Principe : cette méthode consiste à refroidir de petits échantillons à de très basses températures (< -40°C) empêchant ainsi tout mouvement et toute activité métabolique. L'objectif est de congeler l'échantillon très rapidement afin que les cristaux de glace ne puissent pas se développer suffisamment pour causer des dommages à l'ultra-structure de l'échantillon.

Une fois prélevées et pesées, les GSM et les GSL étaient disposées dans des moules d'inclusion dans lesquels avait été placé, préalablement, un milieu d'enrobage cryoprotecteur: l'Optimal Cutting Temperature (OCT). Puis les échantillons étaient plongés dans un bain d'isopentane à -65°C (Histobath 2 – Thermo Shandon) qui congelait rapidement les tissus. Les échantillons étaient ensuite placés dans des congélateurs à -80°C pour une conservation durable.

○ Inclusion en paraffine (parotide)

Une fois les prélèvements de parotide réalisés, les échantillons étaient placés dans un fixateur (formaldéhyde 4% tamponné (PBS 1X) durant 48 heures à température ambiante et sous sorbonne (car le formaldéhyde est irritant pour les yeux et la gorge). Cette étape de fixation permettait la protection des tissus de toute hydrolyse due à la libération des enzymes contenus dans les lysosomes cellulaires.

La paraffine, matrice de la coupe, n'étant pas miscible à l'eau, les tissus fixés étaient préalablement déshydratés. Pour cela, des bains successifs d'éthanol de degré croissant ont été réalisés (Tableau 21).

Tableau 21: histologie : étapes de déshydratation (réalisées à température ambiante)

Ordre de réalisation	Produits chimiques	Temps
1	Ethanol 70°	1 bain : 1h
2	Ethanol 80°	1 bain : 1h
3	Ethanol 95°	3 bains : 1h – 1h30 – 1h30 chacun
4	Ethanol 100°	3 bains : 1h – 1h30 – 1h30 chacun
5	Toluène	3 bains : 1h – 1h30 – 1h30 chacun

Toutefois, la paraffine n'est pas non plus miscible à l'alcool, celui-ci était remplacé avant inclusion par un « liquide intermédiaire » miscible à la fois à l'éthanol et à la paraffine: le toluène. Les échantillons étaient ensuite imprégnés dans la paraffine liquide (65°C) par trempages successifs dans deux bains (3h LEICA TP 1020, photo 7 (F Menetrier INRA).



Photo 7 Station de déshydratation

LEICA TP 1020



Photo 8 : Station d'enrobage

LEICA EG 1160

Une fois déshydratés, les échantillons étaient disposés selon l'orientation prédéfinie au fond de moules d'inclusion en aluminium remplis d'un peu de paraffine liquide grâce à la station d'enrobage (LEICA EG 1160, photo 8). Le couvercle des cassettes était éliminé alors que la partie portant l'identification était conservée. Cette dernière était placée sur le moule portant l'échantillon puis le moule était rempli intégralement de paraffine liquide qui pénétrait au travers des orifices de la cassette. Les moules étaient laissés quelques minutes sur une plaque réfrigérée à -5°C afin d'accélérer la prise. Les blocs ainsi confectionnés étaient démoulés par simple choc contre la paillasse et stockés, à température ambiante, jusqu'à leur utilisation.

b) Découpe des échantillons

Les échantillons étaient découpés de deux façons différentes selon le type de conservation de l'échantillon. Pour les GSM et GSL (cryoconservation) la découpe était faite grâce à un Cryostat (photo 9) alors que pour les parotides (paraffine), les coupes étaient réalisées grâce à un microtome. Quelles que soient les méthodes utilisées, le but était de réaliser des coupes d'une épaisseur de $5\mu\text{m}$, épaisseur préalablement définie comme optimale pour l'étude histologique de ces échantillons.

○ Découpe au Cryostat

Les lames étaient conservées à température ambiante, et c'est la différence de température entre la lame et la coupe qui permettait l'adhésion de celle-ci. La température du compartiment était de -20°C et celle de l'objet de -18°C . L'objet à découper était fixé à un porte-objet grâce à l'OCT et la découpe était réalisée de façon automatique. La coupe était insérée entre la lame de rasoir et la lame anti-roll puis à l'aide des pinceaux, la coupe était dépliée. Puis on approchait la lame de verre de la coupe pour permettre l'adhésion.

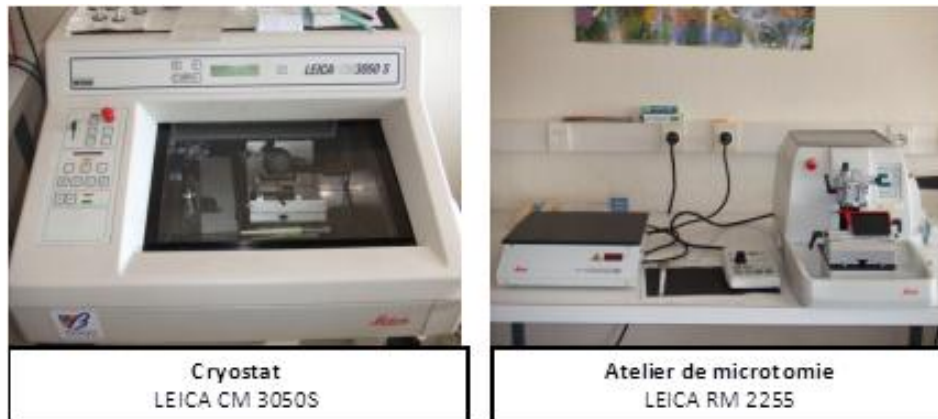


Photo 9 : matériels nécessaires pour la découpe des blocs et la lecture des lames (F Menetrier INRA)

○ Découpe au Microtome

La paraffine était enlevée autour de l'échantillon pour obtenir des coupes les plus nettes possibles. Puis le bloc de paraffine était placé sur le microtome et les coupes étaient réalisées. On obtenait ainsi des rubans de paraffine.

Des lames de verre, préalablement nettoyées à l'alcool pour être dégraissées, étaient disposées sur une plaque thermostatée (température variable entre 38°C et 40°C). Le milieu d'étalement (eau distillée ou colle Stick on) était déposé sur les lames puis les coupes étaient placées sur celles-ci (6 coupes par lame). A l'aide de plumes, les coupes étaient dépliées et l'excès de milieu d'étalement éliminé. Les lames étaient placées à l'étuve à 37°C pendant 48h afin d'être séchées, prêtes à être colorées.

c) Coloration des coupes

○ Principe

Les coupes ont été colorées grâce à la coloration trichromique de Masson. Cette coloration associe une coloration nucléaire grâce à l'hématoxyline, une coloration cytoplasmique par un mélange de colorants acides (fuschine acide et rougeponceau) et une coloration spécifique des fibres conjonctives (collagène) par un autre colorant acide : le Vert Lumière.

○ Coupes au cryostat

Après avoir sorti les coupes du congélateur et laissé décongeler à température ambiante, les coupes étaient fixées par immersion 5 à 7 sec dans Shandon Rapid-Fixx, puis la matrice

d'enrobage hydrosoluble était éliminée par 7 passages de quelques minutes dans l'eau distillée.

- Coupes au microtome

On réalisait un déparaffinage par 3 bains successifs de 3min dans le toluène suivi d'un bain dans l'éthanol pur (1min) puis dans l'éthanol 80° (2min) et puis une réhydratation à l'eau distillée (30sec).

- Coloration au Trichrome de Masson

La première étape était la coloration nucléaire par un bain dans une solution d'Hémalun de Mayer (Hématoxyline). Pour fixer cette coloration, un trempage de 5 à 15 min dans l'eau du robinet puis 30 secondes dans l'eau distillée était nécessaire. La coloration Fuschine-Ponceau colorait les canaux excréteurs et les acini ; l'excès de colorant était ensuite éliminé par 30 secondes dans l'eau distillée. L'étape de mordantage comprenait un bain de 3 min dans de l'acide phosphomolybdique 1% puis les fibres conjonctives étaient colorées au Vert Lumière ; les deux bains successifs d'acide acétique à 1% dans l'eau distillée permettaient le rinçage et l'élimination de l'excès de colorant. Afin de déshydrater les coupes, avant que les lamelles ne soient montées sur les lames, deux passages dans l'éthanol 95° puis 100° et un passage dans le Safesolv (pour la série A) ou dans le toluène étaient réalisés.

Une fois colorées, les lamelles étaient montées sur les lames grâce à du baume Safemount (sans xylène) pour les GSL et GSM et du baume Eukitt (avec xylène) pour les parotides. Une goutte de baume était déposée sur la lamelle puis la lame était retournée sur cette dernière en veillant à bien éliminer les bulles d'air qui rendraient l'observation microscopique impossible. Les lames étaient alors séchées pendant 24h minimum à température ambiante et sous sorbonne en raison des vapeurs de solvant.

d) Numérisation des structures salivaires

Après avoir obtenu les lames, les structures étaient observées au microscope (Nikon Eclipse E600, objectif $\times 10$) en lumière blanche. Une acquisition d'image pour chaque glande de chaque rat, sur la base de 15 photographies/glande/rat était réalisée (Eléments Br 3.0, Nikon). Dans l'objectif d'identifier et de préciser des modifications de ces structures par le BPA, nous avons évalué le nombre et la surface des canaux excréteurs, des acini et des GCT (Granulated Convolutated Tubules) pour les glandes submandibulaires, le nombre et la surface des acini et des canaux excréteurs pour les glandes parotides et les glandes sublinguales à

partir d'une analyse d'image programmée avec le logiciel Visilog (Visilog 6.9, Noesis, Crolles, France, photo10, annexe 1).



Atelier de microscopie
Nikon ECLIPSE E600
DIGITAL CAMERA CXM 1200C

Photo 10 : matériel permettant l'analyse des lames histologiques (F Menetrier INRA)

2.2.4.3. Expression des ARNm par RT-PCR relative en temps réel.

Une analyse de l'expression de marqueurs moléculaires hormono-régulés a été réalisée par RT-PCR relative en temps réel. Nous nous sommes intéressés aux récepteurs hormonaux (œstrogènes (ER α et ER β), androgènes (AR) et progestérone (PR)), aux facteurs de croissance (EGF et NGF), au récepteur muscarinique (Chrm3, cholinergic receptor muscarinic3), et aux protéines salivaires hormono-dépendantes et impliquées dans le goût (mucine 10 et cystatine sous l'influence des œstrogènes, kallistéine 1 et amylase 1 sous l'influence des androgènes). Les différentes étapes sont rappelées dans la figure 25.

a) Principe

La RT-PCR relative en temps réel consiste dans une première étape (RT) à transcrire par réaction enzymatique les ARN en ADN complémentaires puis dans une seconde étape (PCR) à les amplifier à l'aide d'amorces spécifiques (courtes séquences d'ADN) ; un composé fluorescent intercalant de l'ADN amplifié permet de déterminer en temps réel la quantité

d'ADN produite. La quantité d'ARNm codant pour les gènes d'intérêt est déterminée de manière relative par rapport à un ou deux gènes de référence.

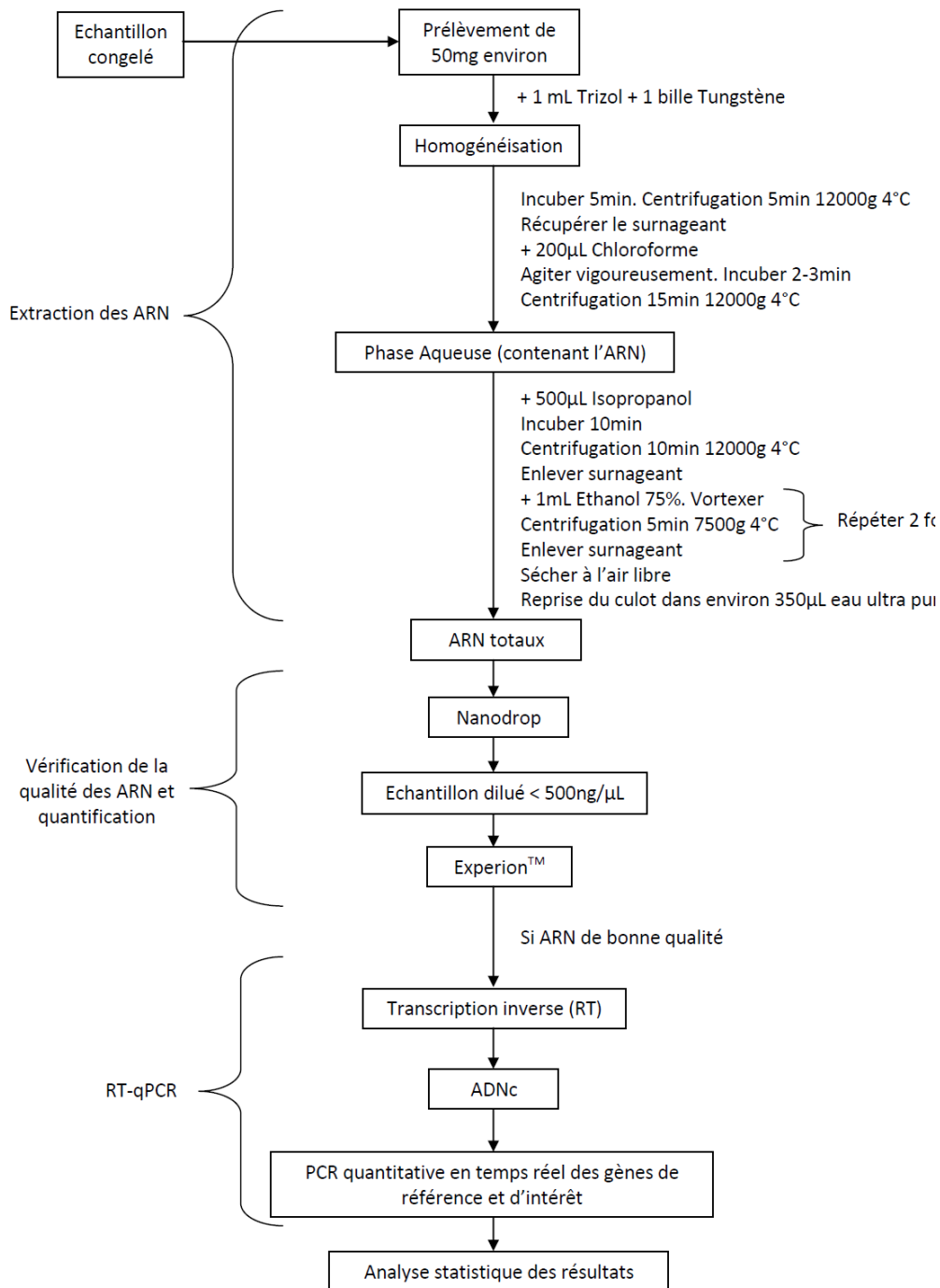


Figure 25 : protocole expérimental pour l'analyse de l'expression des ARNm dans les glandes salivaires

b) Extraction des ARN totaux

Pour éviter la contamination des ARN par des RNases, le matériel utilisé lors des prélèvements était nettoyé par une solution H₂O /0,5% SDS. Le port des gants était également indispensable afin d'éviter toute contamination par des RNases présentes sur la peau.

La glande salivaire encore congelée (environ 50 mg) était coupée avec un scalpel; les ARN totaux étaient extraits en homogénéisant les échantillons à l'aide du Tissue Lyser (Qiagen, France) dans 1 ml de Trizol[®],(Invitogen) (composé de phénol et de thiocyanate de guanidium qui permettent de maintenir l'intégrité des ARN et dissocient les protéines et les composés cellulaires). Après un repos de 5 min à température ambiante, la préparation était centrifugée (5 min, 12000g, 4°C) pour précipiter les débris. Le surnageant était récupéré et transféré dans de nouveaux tubes. On ajoutait du chloroforme (0,2 ml) qui permettait après centrifugation, d'obtenir trois phases: la phase inférieure organique, l'interphase (qui contenaient l'ADN et les protéines) et la phase supérieure aqueuse qui contenait les ARN. Cette dernière était soigneusement transférée dans de nouveaux tubes. Les ARN étaient précipités par addition de 0.5ml d'Isopropanol suivie d'une agitation douce par retournement et incubation pendant 10 minutes à température ambiante. Après centrifugation (10 min, 12000g, 4°C), et 2 lavages successifs du culot d'ARN avec 1 ml d'éthanol à 75% et centrifugation (5 min, 7500g, 4°C), les culots ARN étaient mis à sécher pendant quelques minutes (tube ouvert) puis repris par 300 µL H₂O BM le volume pouvant varier selon leur taille. Les ARN totaux étaient conservés à -80 °C pour utilisation ultérieure.

c) Analyse quantitative et qualitative des ARN messagers

- Dosage des ARN totaux par spectrophotométrie

Les taux d'ARN totaux (1 µL) étaient déterminés au spectrophotomètre NanoDrop[™](Labtech, France) (limite inférieure de détection 2 ng/µ L- limite supérieure 3000 ng/µL) :

Les ARN totaux extraits étaient lus aux longueurs d'ondes de 230, 260 et 280 nm (la Densité Optique (DO) à 260 nm correspond à l'absorbance des acides nucléiques et permet de quantifier les ARN (1 DO correspond à 40 ng/µL) ; celle à 230 nm correspond à l'absorbance des solvants (éthanol, chloroforme et tampons d'extraction), tandis que les protéines absorbent à 280 nm. L'extrait était considéré comme de bonne qualité lorsque le rapport DO₂₆₀/DO₂₃₀ était proche de 2,2 et que le rapport DO₂₆₀/DO₂₈₀ était compris entre 1,8 et 2,1. Après détermination de la concentration au NanoDrop, des dilutions étaient effectuées pour obtenir une concentration comprise entre 100 et 500 ng/µL concentration maximale de dosage des ARN avec l'Expérior[™] (Bio-Rad, France).

- Quantification et vérification de la qualité des ARN totaux extraits avec l'Experion™ (fig26)

L'Experion™ est un outil de vérification et de quantification des acides nucléiques et des protéines. Le principe repose sur une électrophorèse automatisée à l'aide de puces miniaturisées qui permettent d'analyser 12 échantillons (1µL seulement). Il a été déposé sur la puce une solution matrice (appelée G) avec un colorant (appelé S) qui s'intercalait dans l'ARN pour le visualiser. Les échantillons d'ARN étaient alors déposés dans les puits avec un tampon de charge contenant un marqueur inférieur qui permettait d'aligner toutes les pistes de migration et ainsi permettre une comparaison des profils ; un marqueur de taille était également déposé comme ARN de référence. Ainsi, était vérifié par électrophorèse si les ARN étaient de bonne qualité en déterminant le rapport 28S/18S qui devait être proche de 2. L'Experion™ permettait de donner la concentration en ARN totaux de l'échantillon, sa pureté et son intégrité, et de détecter une éventuelle contamination par de l'ADN.



Figure 26 : puce pour l'Experion™ et résultat type : profil et électrophorogramme (gel virtuel)

- d) Transcription inverse (RT) des ARN en ADNc.

Cette étape permettait l'obtention d'ADNc à partir des ARN totaux extraits des glandes salivaires. Elle était réalisée avec 2µg d'ARN afin d'avoir suffisamment d'ADNc pour effectuer toutes les réactions de PCR. La RT était effectuée pour chaque échantillon, à l'aide du kit iScript cDNA Synthesis (BioRad). A 30 µL de la solution d'ARN (volume contenant 2 µg d'ARN totaux), on ajoutait 8 µL du réactif « iScript reaction mix 5X », 2 µL de l'enzyme « iScript reverse transcriptase ». La réaction se faisait dans le thermocycleur icycler (Bio-Rad) : 5 min à 25 °C puis 30 min à 42 °C et 5 min à 85 °C. L'iScript transcrit l'ARN en ADNc, elle

possède une action RNase H (Ribonucléase H) capable de digérer le brin d'ARN qui a servi de matrice. L'expression des ARNm était donc mesurée sur la base des ADNc correspondants qui étaient ensuite amplifiés par PCR.

e) PCR en temps réel

Afin de mesurer l'expression des ARN messagers (ARNm) codant pour les récepteurs hormonaux ER α , AR, PR, et les facteurs de croissance EGF, NGF, le Chrm3 et les protéines gustatives, on a effectué une PCR (Polymerase Chain Reaction) relative en temps réel. L'expression était estimée par rapport à l'expression d'un gène de référence ou gène standard interne en l'occurrence RPS9 (ribosomal protéine S9), gène exprimé dans toutes les cellules.

- Principe de la PCR en Temps Réel :

La PCR temps réel utilise un marqueur fluorescent, le SYBR[®] Green I, qui s'intercale dans l'ADN double brin et excité par les UV, fluoresce (fig 27). Il permet donc de suivre en temps réel l'amplification du gène.

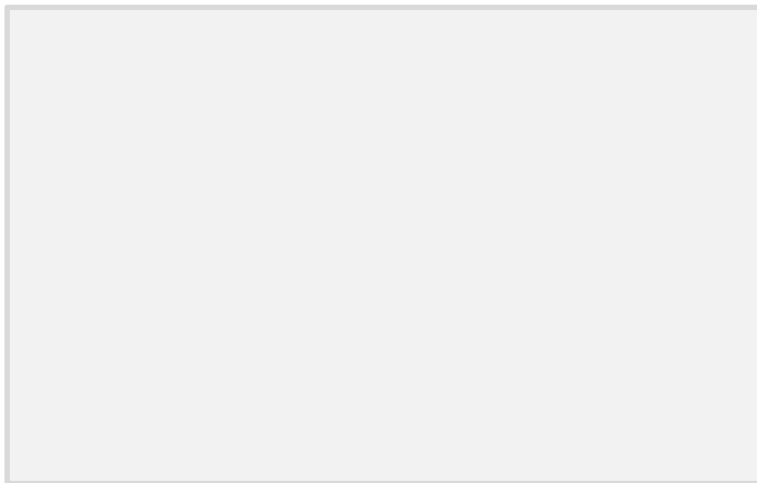


Figure 27 : mode d'action d'agent intercalant type SYBR[®] Green I

La PCR temps réel diffère de la PCR classique par le fait que l'on peut situer exactement le début de l'amplification ou Ct(cf plus bas) alors qu'en PCR classique la lecture se fait en point final. Il n'y a plus que deux étapes, dénaturation et hybridation. L'élongation s'effectue lors de la montée à 95°C ; les ADNc étant de plus petite taille, les quelques secondes à la température d'élongation (72°C) suffisent. C'est pendant cette étape que la fluorescence est mesurée, c'est pourquoi on l'appelle PCR en temps réel.

La réaction se fait dans le thermocycleur MyiQ relié à un logiciel iQ5 d'acquisition des données et de traitement des données permettant d'obtenir plusieurs courbes et de définir

plusieurs paramètres « qualité ». La figure 28 nous présente une courbe d'intensité du signal fluorescent émis au fur et à mesure des cycles d'amplification en PCR temps réel.

Elle comprend plusieurs phases qui permettent d'établir plusieurs paramètres :

- *une phase d'initiation* au cours de laquelle la fluorescence est très faible et stable : il s'agit du bruit de fond de la fluorescence qui définit la ligne de base.
- *une phase exponentielle* qui correspond à l'étape active d'amplification. A sa base se trouve la ligne seuil. C'est la valeur constante, pour laquelle la fluorescence mesurée n'est plus du bruit de fond. Elle est fixée par l'opérateur ou automatiquement par le logiciel. Elle correspond donc au début de la phase exponentielle d'amplification. Le Ct (ou cycle seuil) est le point de croisement entre le seuil et la courbe expérimentale. C'est l'unité de valeur mesurée en temps réel.
- *une phase de plateau* qui correspond à un ralentissement de l'amplification qui peut être dû à un épuisement des réactifs notamment les amorces.

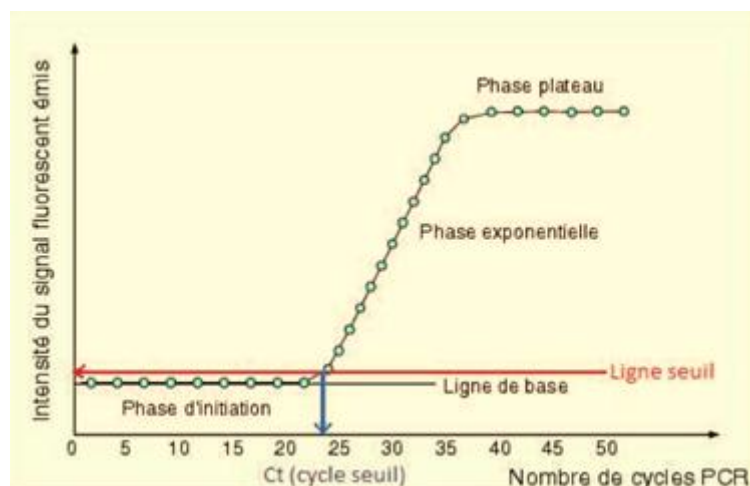


Figure 28 : courbe théorique de l'intensité du signal émis en fonction du nombre de cycles lors d'une PCR temps réel

L'indicateur fluorescent permet aussi de déterminer une courbe de fusion. Elle découle de la diminution de la fluorescence observée lorsque l'ADN double brin se dénature quand la température augmente. Elle comporte trois étapes : une dénaturation rapide à 95 °C, suivie d'une réhybridation par refroidissement à 55 °C puis la température est incrémentée de 0,5 °C jusqu'à 95 °C. A cette étape, la fluorescence est de nouveau mesurée de façon continue. La courbe de fusion peut être représentée sous forme de dérivée première de la diminution de fluorescence par rapport à la température (fig. 29). Elle permet de vérifier la spécificité des

amorces. Si l'amplification est spécifique, il n'y aura qu'un seul pic. S'il y a une amplification non spécifique, il y aura plusieurs pics: il faut alors redéterminer des amorces plus spécifiques. Nous avons utilisé une méthode de quantification relative par rapport à l'expression d'un gène standard interne. Il s'agit d'un gène qui s'exprime dans toutes les cellules et ne doit pas être affecté par le traitement des animaux lors de l'expérimentation. Il permet de s'affranchir des erreurs de pipetages, de dosages et d'efficacité de la PCR. L'analyse des résultats est un modèle mathématique (Pfaffl, 2001) qui détermine la quantification relative d'un gène cible par rapport à un standard interne tout en tenant compte de la différence de Ct entre un échantillon traité et un échantillon témoin.

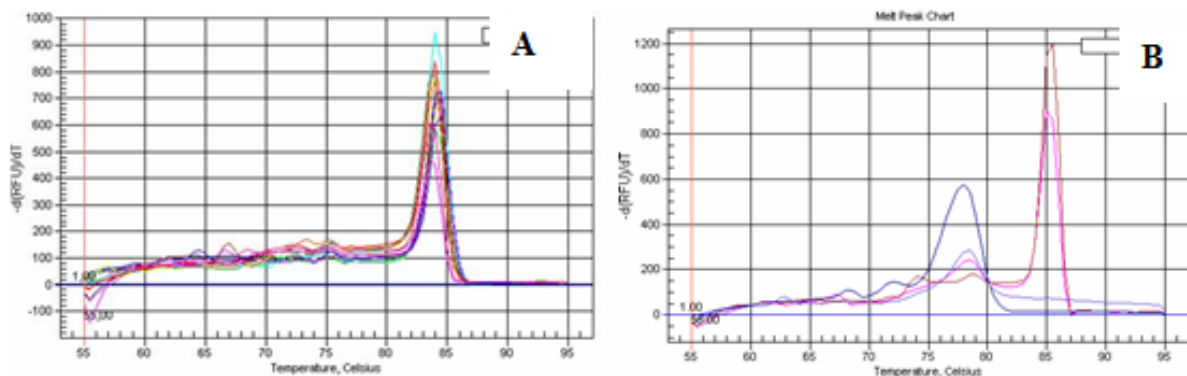


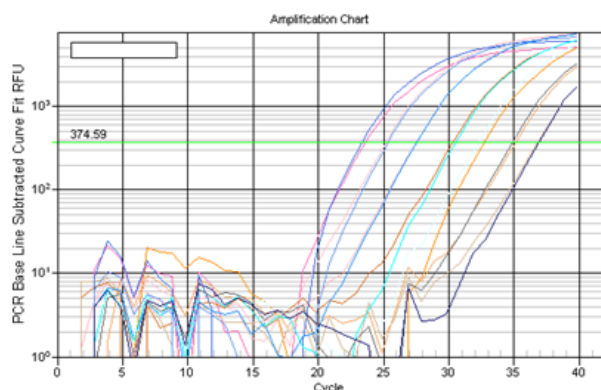
Figure 29 : courbe de fusion : dérivée première de la fluorescence en fonction de la température a : Cas d'une amplification spécifique: un seul pic est observé. b : Cas d'une amplification non spécifique : deux pics sont observés (couple d'amorces non valable).

Une courbe étalon appelée courbe standard (fig 30) est établie à partir d'une gamme standard et qui constitue un test de performance global de la PCR pour l'ADN cible. Elle comporte au moins 5 points et est faite en duplicata. La gamme standard est effectuée pour chaque couple d'amorces. Elle est réalisée à partir d'un mélange de plusieurs échantillons d'ADNc (50 ng.µL⁻¹) de glandes salivaires de rats témoins. La quantité de matrice étant de 5 µL pour chaque réaction, la gamme va de 250 ng à 0,0032 ng, le facteur de dilution est de 5. Pour un gène donné, la courbe standard permet de déterminer l'efficacité E de la PCR. L'efficacité est calculée en fonction de la pente de la courbe standard avec la formule suivante :

$$E=(10^{-1/\text{pente}}-1) \times 100.$$

Idéalement la pente doit être de -3,3. En pratique on accepte une efficacité comprise entre 90 et 110%

PCR Amp/Cycle Chart



Standard Curve Chart

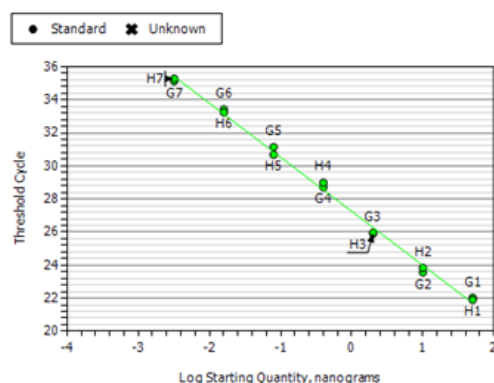


Figure 30 : courbe standard

- Réaction de PCR :

La réaction se faisait en plaque 96 puits. Tous les échantillons étaient effectués en duplicata. Les échantillons étaient à une concentration de $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ après avoir ajouté $80 \mu\text{L}$ d' H_2O BM à la réaction de RT. Ces échantillons étaient conservés à $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. Pour un volume réactionnel final de $25 \mu\text{L}$, $12,5 \mu\text{L}$ de « supermix », $1 \mu\text{L}$ d'amorce sens et $1 \mu\text{L}$ d'amorce anti-sens ($0,4 \mu\text{M}$ en concentration finale) et $5,5 \mu\text{L}$ H_2O étaient ajoutés à $5 \mu\text{L}$ d'ADNc à analyser (soit 50 ng d'ARN totaux). Le supermix contenait la Taq Polymérase (50 U/mL) et le tampon correspondant (100 mM KCl , 40 mM Tris-HCl , $\text{pH } 8,4$), les dNTP ($0,4 \text{ mM}$ de chaque) du 6 mM MgCl_2 , 6 mM du SYBR Green I, 20 nM et de la fluorescéine : marqueur passif non influencé par l'amplification de fluorescence constante qui corrige les différences de lecture.

Sous une enceinte PCR, afin d'éviter toute contamination, on préparait un « mix », en pratique il correspondait au nombre d'échantillons +1 à 5 et contenait le « supermix », l'eau et les amorces. Puis ce « mix » était distribué ($20 \mu\text{L}$) dans chaque puits de la plaque. Lors de la manipulation, la plaque était mise dans un bloc réfrigérant, les amorces et le « supermix » étaient décongelés et conservés dans la glace. Toutes les solutions étaient homogénéisées et centrifugées brièvement avant leur utilisation. On mettait un film sur la plaque qui était ensuite centrifugée à 1500 tours/min quelques secondes.

L'ADN était ensuite déposé à raison de $5 \mu\text{L}$ par puits. Un témoin sans ADN mais contenant $5 \mu\text{L}$ d' H_2O servait de témoin de non contamination du mix de PCR. La plaque était placée dans le thermocycleur où la PCR était réalisée.

Les amorces utilisées sont précisées dans le tableau 22

Tableau 22 : présentation des différentes amorces

Genes	Primer Sequence (Forward and Reverse)	origine
RPS9	5'- GCA AGC AGG TGG TGA ACA TTC C- 3' 5'- CCA TAA GGA GAA CGG AGG GAG AAG- 3'	Beacon Designer (Biosoft)
PR	5'-TGG TCT AAG TCT CTG CCT CTG CTC- 3' 5'-CCA TAA GGA GAA CGG AGG GAG AAG - 3'	Beacon Designer
ERα	5'-TCC AGC AGC AGC GAG AAG G- 3' 5'-GTC GTT ACA CAC AGC ACA GTA GC- 3'	Eurogentec
ERβ	5'-GAGGCAGAAAGTAGCCGGAA- 3' 5'-CGTGAGAAAGAAGCATCAGGA- 3'	Rose Meyer (2002)
AR	5'-ACC ATA TCT GAC AGT GCC AAG GAG - 3' 5'-TCC AGT GCT TCC ACA CCC AAC- 3'	Beacon Designer
EGF	5'-TTG AAA GGA TTT GCT GGC GAT GG- 3' 5'-TGG ACG AGG TGG GAG GAC GG- 3'	Beacon Designer
NGF	5'-TGA TCG GCG TAC AGG CAG AAC- 3' 5'-GCG GAG GGC TGT GTC AAG G- 3'	Beacon Designer
KLK1	5'-CTG TGT GCA GGA GAG ATG GA-3' 5'-CAC TCA GGG GTT TTC CTT CA-3'	Primer 3 TM
MUC 10	5'-GCC AAA ACC ACA TCC ATA CC - 3' 5'-TAT ATC CTG GAG GGC AGA CG-3'	Primer 3 TM
Cys C	5'-TGGTGAGAGCTCGTAAGCAG-3' 5'-TTGCAGCTGGATTTTGTGTCAG-3'	Primer 3 TM
AC 6	5'-GAGAAGGGATGTGGGTGAGA-3' 5'-GGAGGTTTCGGGGTGATTTAT-3'	Primer 3 TM
Amy 1	5'-AGAGGAAACAAAGGCTTCATTG-3' 5'- GGAAGACCAGTCTGTAGAGTTGTTG-3'	Nashida T (2010)

f) Analyse statistique des résultats

On vérifiait la stabilité du gène de référence par un test d'ANOVA. Les résultats d'expression pour chaque gène d'intérêt étaient analysés avec le logiciel REST© (Pfaffl, 2002). Grâce à un modèle mathématique [380], ce logiciel établissait une analyse statistique de la variance et une comparaison des moyennes de chaque lot traité par rapport au lot témoin. Les résultats étaient exprimés en valeur relative donnée par un ratio R qui prenait en compte l'efficacité de la PCR (E) et la différence de Ct (ΔCt) entre témoin et traité selon l'équation suivante :

$$R = \frac{(E_{gène\ intérêt})^{\Delta Ct_{gène\ intérêt}(témoin-traité)}}{(E_{gène\ réf})^{\Delta Ct_{gène\ réf}(témoin-traité)}}$$

Puis, ce logiciel effectuait un test aléatoire qui extrapolait ces résultats à un plus grand nombre d'essais (2000) issus des différentes combinaisons témoin par rapport aux traitements.

2.3. Analyse statistique

L'étude statistique était faite à partir du logiciel StatEL (Adsciences, France). Les données représentent la valeur moyenne obtenue dans chaque groupe (moyenne +/- écart type, N=12/groupe pour l'étude du comportement gustatif lors de l'exposition au BPA ; N=6 pour les sacrifices et la phase de réversibilité au BPA). L'analyse des données est basée sur une analyse de variance (Test ANOVA) suivi d'un Test de Dunnett ou, si la distribution des échantillons ne suit pas une loi normale, nous avons réalisé des tests non-paramétriques (Test de Kruskal-Wallis associé à un Test de Mann-Whitney $p < 0.05$).

3. Résultats

3.1. Effet du BPA sur la prise alimentaire et l'état sanitaire des animaux

Absence de signe de toxicité : Aucun signe de souffrance ni de comportement anormal n'a été observé au cours de l'expérimentation, que ce soit pendant la période de traitement ou dans les 6 semaines qui suivent l'arrêt du traitement, et que nous avons baptisée « phase de réversibilité ».

Les poids moyens des rats des différents groupes au début de l'expérimentation étaient homogènes (442 ± 15 g). L'exposition au BPA n'a pas influencé la prise alimentaire (données non montrées), et au terme de l'exposition, le poids moyen des animaux (482 ± 36 g) n'était pas différent d'un groupe à l'autre, confirmant l'absence de toxicité aiguë du BPA dans nos conditions expérimentales.

Mise en évidence d'un effet sur la soif : Alors qu'il n'y avait pas de différence de consommation moyenne d'eau entre les 5 groupes au début de l'expérimentation (17.5 ± 3.8 ml/jour par rat), une diminution de consommation d'eau est apparue dès les premiers jours

dans le groupe recevant la plus forte dose d'exposition en BPA. Cet effet s'est peu à peu confirmé dans tous les autres groupes et s'avère fortement significatif et proportionnel à la concentration en BPA en fin d'exposition ($p < 0.01$, fig. 31). Toutefois, 48h après l'arrêt du BPA, il n'existait déjà plus de différence de consommation entre les 5 groupes, cette situation restait stable pendant les 6 semaines de la phase de réversibilité.

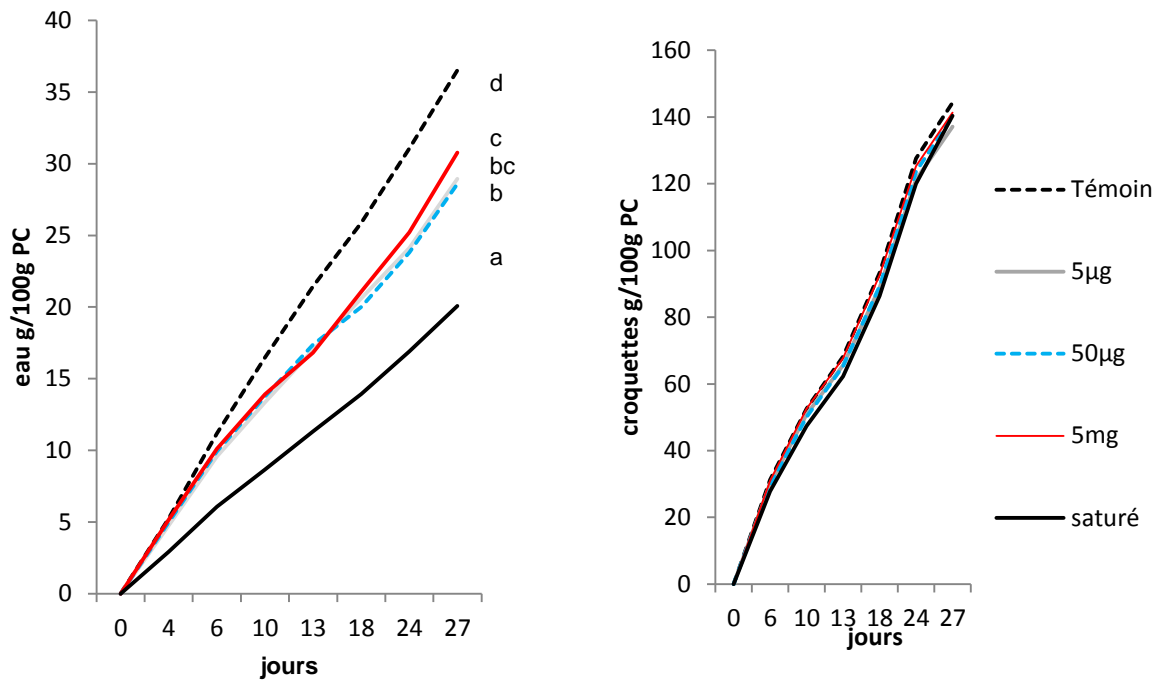


Figure 31 : effets du BPA sur la consommation d'eau (KW $p < 0.01$) et sur la consommation de croquettes (NS) $N=12$ /lot. Les valeurs sont les moyennes \pm SD. Les lettres représentent la différence entre groupe (Kruskall- Wallis ; $p < 0.05$)

3.2. Effet du BPA sur les préférences gustatives :

3.2.1. Pendant la période d'exposition au BPA

Les effets du BPA sur les préférences au goût sucré, salé et gras ont été mesurés pendant les deux dernières semaines d'expositions. Ils sont illustrés dans la figure 32.

- Préférence au goût sucré :

Les animaux témoins préféraient boire de l'eau sucrée que de l'eau pure. Cela se traduit par une valeur de la préférence au sucré très élevée : 90%. L'ingestion de BPA diminuait la consommation de saccharine de manière significative dès la plus faible dose d'exposition et de manière proportionnelle à la dose d'exposition ($p < 0.05$). Toutefois, on ne note pas de

différence significative entre les lots exposés aux plus faibles doses (5 et 50µg/kg/j), tout comme il n'y a pas de différence de consommation significative entre les deux lots recevant les fortes doses (5 et 12,5 mg/kg/j). Curieusement, les animaux compensaient en augmentant la consommation de boisson d'eau pure sauf à la plus forte dose. Il en résultait une diminution de la préférence au sucré qui évoluait de manière significative selon une courbe dose réponse non linéaire en U, l'effet le plus marqué étant obtenu pour la dose de 5 mg/kg/j ($p < 0.05$).

- Préférence au goût salé :

Les rats du groupe témoin consommaient moins d'eau salée que d'eau pure, et la préférence au sel de 30% qui en résultait traduisait une aversion spontanée pour le goût salé. Dans les lots traités, l'ingestion de BPA a entraîné une hausse de la consommation de sel significative pour les fortes doses d'exposition ($p < 0.05$) mais, la consommation d'eau restait plus faible que celle des témoins dès les plus faibles doses d'exposition ($p < 0.05$). De ce fait, il en résultait une augmentation de la préférence au salé qui évoluait de manière significative selon une courbe dose réponse linéaire, avec un effet significatif dès la dose de 50µg/kg/j ($p < 0.05$).

- Préférence au gras :

Les rats du groupe contrôle consommaient davantage d'huile que se solution de xanthane, signe d'une préférence spontanée pour le goût du gras qui, dans nos conditions, était d'environ 75%. Mis à part pour la plus faible dose, l'ingestion de BPA entraînait une baisse de consommation de gras proche de 50% à la plus forte dose, mais qui restait non significative lors de l'analyse statistique. Cependant, ce comportement vis-à-vis du gras était compensée par une plus forte consommation d'émulsion d'eau pure significative dès la dose de 50µg/kg/j que celle des témoins ($p < 0.05$). Il en résultait une tendance à une moindre préférence pour le gras pour les rats exposés à 5mg/kg/j de BPA et pour les rats consommant la solution saturée en BPA (12,5mg/kg/j) c'est-à-dire les fortes concentrations ($p = 0.057$). En effet, en utilisant un test de student on retrouvait une différence significative de préférence pour ces 2 lots exposés aux fortes concentrations par rapport au témoin ($p < 0.05$).

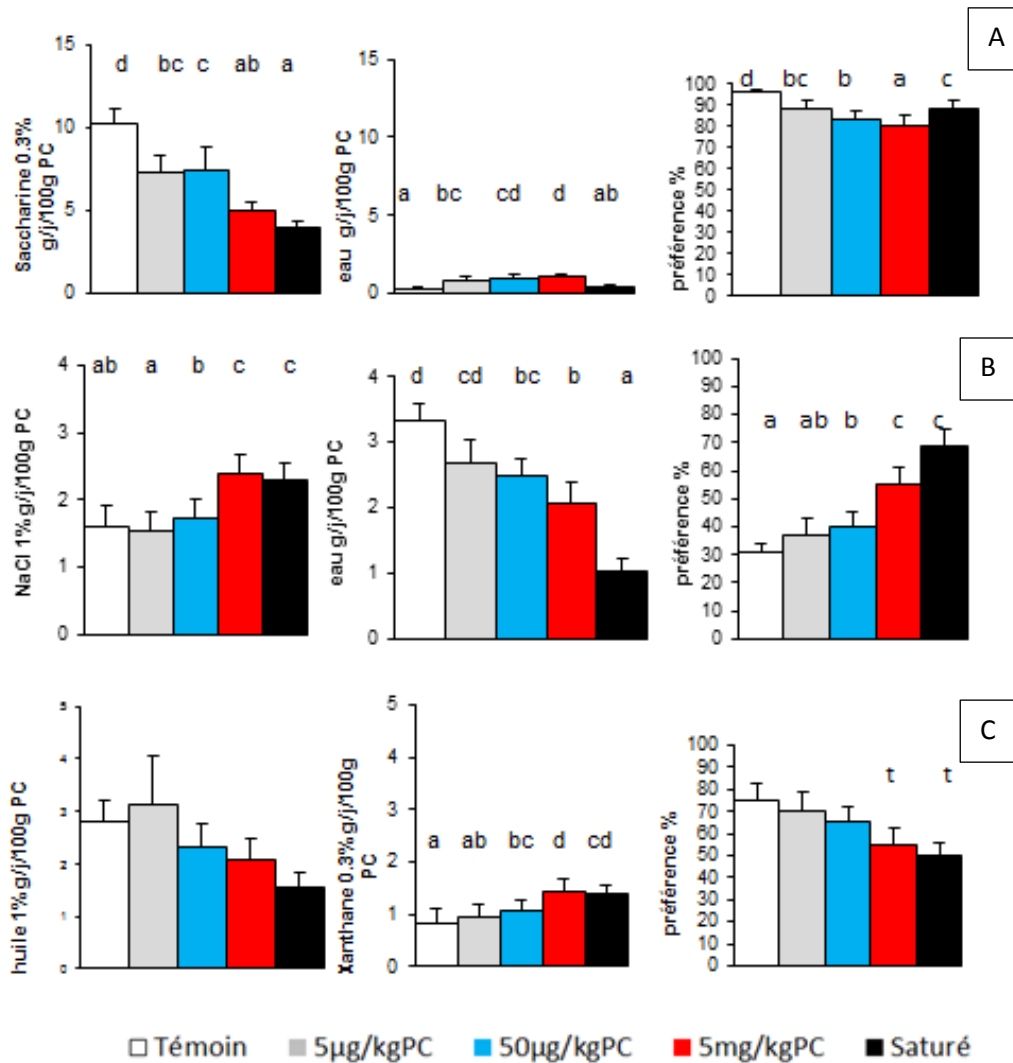


Figure 32 : préférences gustatives pendant la période d'exposition au BPA: (A) sucré (B) salé et (C) gras. Les valeurs sont les moyennes \pm SD (n=12 rats /groupes). Les lettres représentent la différence entre groupe (Kruskal- Wallis ; $p < 0.05$) ; et t indique les lots significativement différents du groupe témoin sur la base d'un test de Student ($p > 0,05$)

3.2.2. Réversibilité des effets à l'arrêt du traitement

Les effets sur les préférences gustatives, évalués un mois après avoir supprimé le BPA de l'eau de boisson, sont rapportés dans la figure 33. Il est à noter que le nombre d'animaux avait diminué (n=6), les autres animaux ayant été sacrifiés pour analyser les organes.

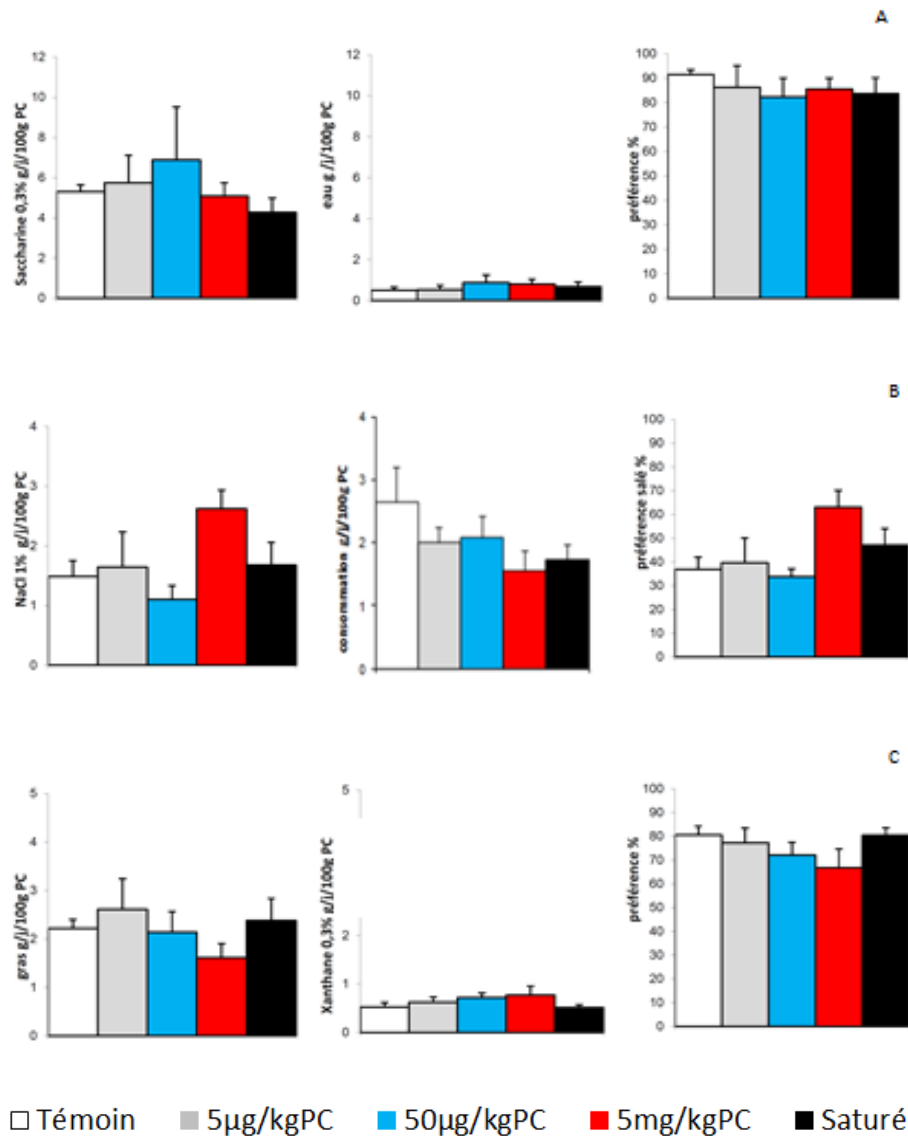


Figure 33: préférences gustatives après la période d'exposition au BPA: (A) sucré (B) salé et (C) gras. Les valeurs sont les moyennes \pm SD (n=6 rats /groupes). L'ANOVA ne fait pas ressortir de différence entre les groupes.

- *Préférence au sucré*

Les animaux restant du groupe contrôle avaient consommé globalement moins de boissons que lors du test précédent, ce qui donne un aperçu de la variabilité intra-individuelle. Toutefois, la valeur de la préférence reste la même, et elle est supérieure à 90%.

Dans les lots traités, l'arrêt du traitement n'influe pas sur la consommation globale de boisson, qui reste quantitativement comparable à celle que les animaux avaient au début du traitement. De fait, on retrouve la même tendance à la préférence (entre 80 e 90%), et elle reste dans tous

les lots inférieure à celle du témoin. Toutefois, cette différence ne ressort pas significative lors de l'analyse statistique.

- ***Préférence au salé :***

Les animaux du groupe témoin présentent un choix gustatif équivalent à celui du début de l'expérience, avec une aversion spontanée de 35%. Les choix gustatifs dans les lots traités étaient relativement irréguliers, mais seuls les animaux du lot traité par 5mg ont maintenu une préférence à 60% pour le sel, tandis qu'on note un retour à la normale pour les animaux recevant la plus forte dose. Cet effet n'est pas significatif probablement à cause du faible effectif de rats. L'arrêt de l'exposition au BPA, semble entrainer une réversibilité de la préférence gustative au salé.

- ***Préférence au gras***

Pour le goût du gras on observe une uniformisation des consommations et des préférences avec une absence de différence significative entre les 5 groupes.

3.3. Etat sanitaire des animaux lors des sacrifices

3.3.1. à l'issue de la période d'exposition

- *Aspect général:* Il n'existait pas de différence de poids des rats entre les différents groupes (466 +/- 13). Il n'a pas été noté de différence sur le poids du foie (1.96 +/-0.05 g/100g PC). Le fait que le poids du foie soit stable permettait d'éliminer une toxicité du BPA sur les rats. De même, nous n'avons pas relevé de différence quant aux poids des différentes glandes salivaires en fonction du traitement (figure 34)

- *glycémie :* réalisée à jeûn le jour du sacrifice, elle n'était pas différente d'un groupe à l'autre (81 +/-2.8 mmol/l) (fig 34).

- *sècheresse buccale :* l'exploration de la cavité buccale à l'aide d'un coton tige permettait d'identifier une sècheresse buccale sévère chez tous les animaux traités. Cette sècheresse, très prononcée dès les plus faibles doses, semblait indépendante de la dose d'exposition.

3.3.2. à l'issue de la période de Réversibilité

Lors du sacrifice des rats sevrés en BPA, on ne retrouvait aucune différence entre le groupe témoin et les groupes BPA tant sur le poids, la glycémie que sur les poids des différents organes prélevés (fig35).

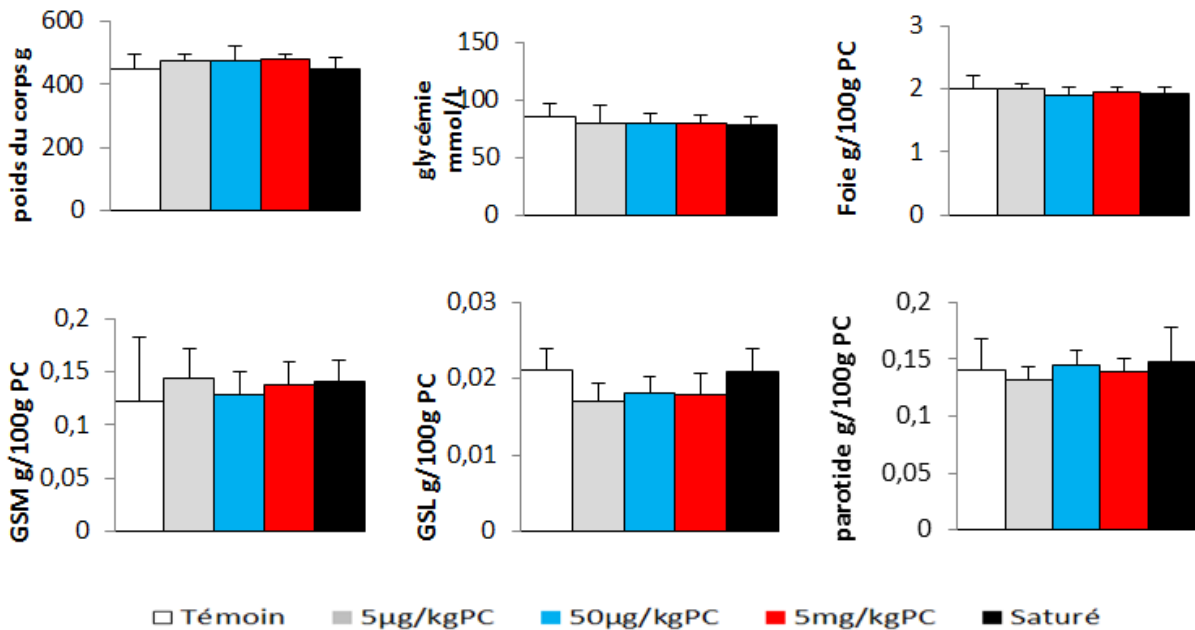


Figure 34 : poids des organes et glycémie des rats exposés au BPA. Les valeurs sont les moyennes \pm SD (n=6 rats /groupes, NS)

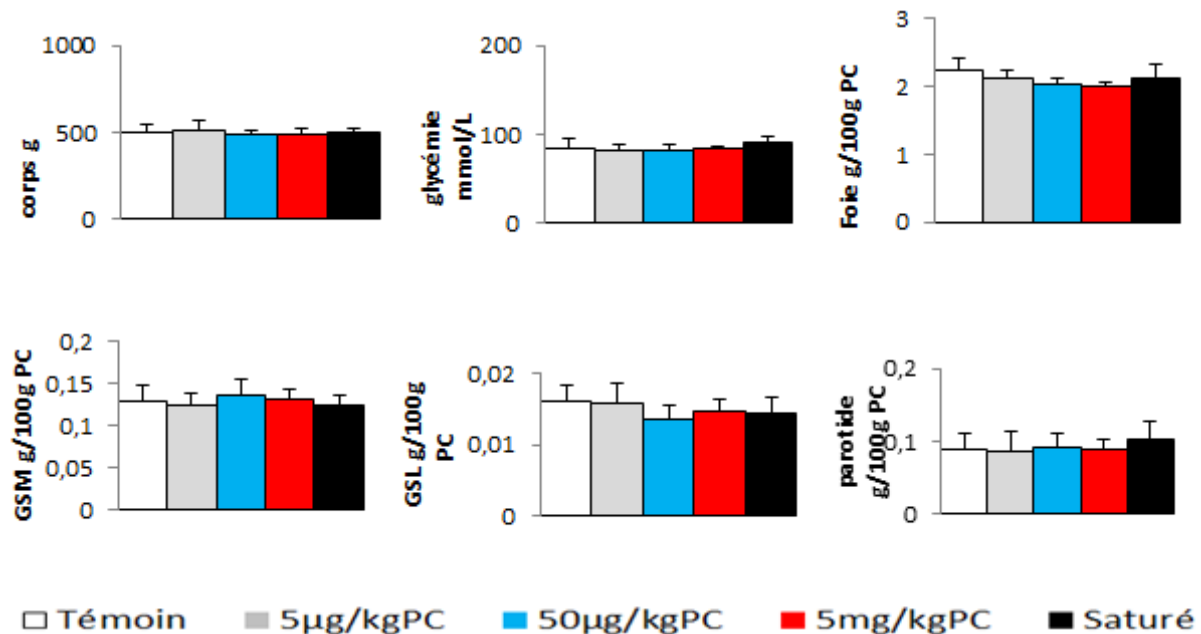


Figure 35 : étude de réversibilité : poids des organes et glycémie. Les valeurs sont les moyennes \pm SD (n=6 rats /groupes, NS)

3.4. Dosage de l'EGF

Ce dosage a été réalisé pour déceler un éventuel effet sur les fonctions endocrines des glandes salivaires, puisque l'EGF est majoritairement produit par ces organes. Comme le montre la figure 36, les taux circulants d'EGF chez les témoins sont de l'ordre de 15 ng/ml. Lors de l'exposition au BPA, on constate une évolution particulière des taux circulants en fonction de la concentration, selon un aspect de courbe en U inversé centrée sur la dose de 50µg. Ce phénomène, bien qu'il ne soit pas statistiquement significatif en raison d'une variabilité trop importante, disparaît après arrêt de l'exposition, puisque mis à part pour le groupe ayant consommé de l'eau saturé en BPA, on retrouve des niveaux plus stables entre les différents groupes.

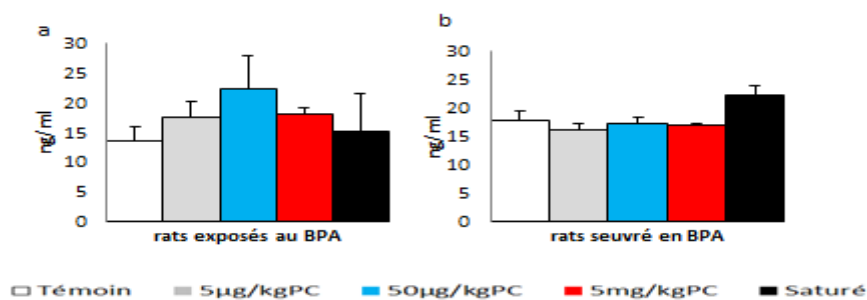


Figure 36 : effet du BPA sur la concentration sérique d'EGF pendant la période d'exposition (a) et après la phase de réversibilité (b). Les valeurs sont les moyennes \pm SD (NS, N=6/lot)

3.5. Effet du BPA sur l'épithélium buccal

Les Muqueuses buccales ont été colorées et observées au microscope pour évaluer l'action du BPA sur l'épithélium buccal. L'aspect histologique de la muqueuse jugale (fig 11) faisait apparaître des disparités en fonction du lot de traitement.

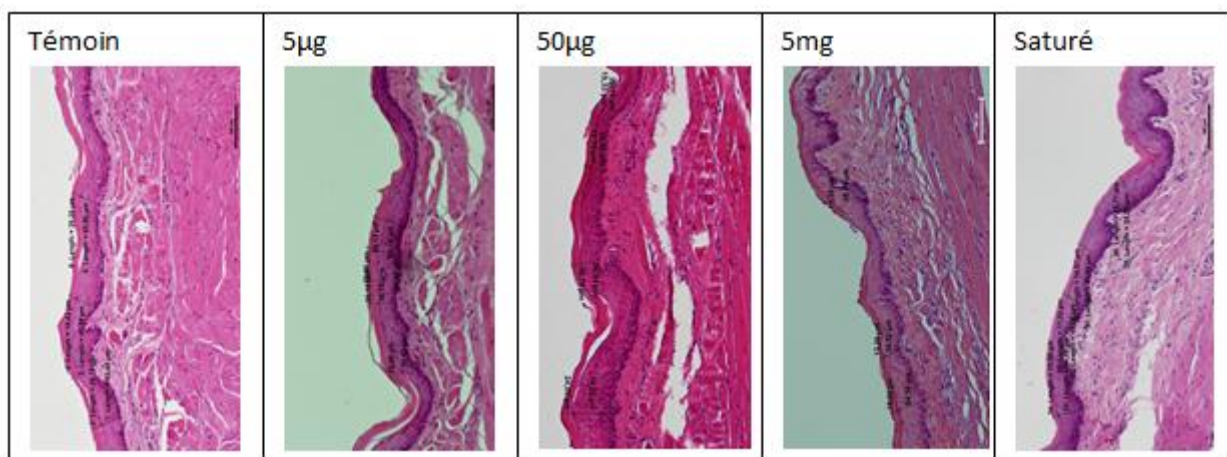


Photo 10 : effets du BPA sur l'épithélium buccal. Coloration à l'hémalun eosine (grossissement X 10)

La mesure de l'épaisseur de l'épithélium et de la couche basale a été effectuée par analyse d'image. La couche épithéliale des rats témoins avait une épaisseur de 66 μm (+/- 16) ; la couche cornée avait une moyenne de 34 μm (+/- 14) et le rapport couche cornée/(couche cornée + couche épithéliale) était de 0.33 (+/- 0.06). Nos résultats faisaient apparaître une couche épithéliale plus importante dans le lot traité par 5 mg/Kg de BPA ($p < 0.05$) mais avec une épaisseur de la couche cornée augmentée mais non statistiquement significative (figure 37).

Ainsi, lorsqu'on faisait le rapport entre l'épaisseur de la couche cornée et celle de la couche épithéliale pour supprimer le « biais de coupe », on ne retrouvait plus aucune différence entre le groupe témoin et les différents groupes de BPA. Il semble donc que le BPA interférait peu sur l'histologie de l'épithélium buccal.

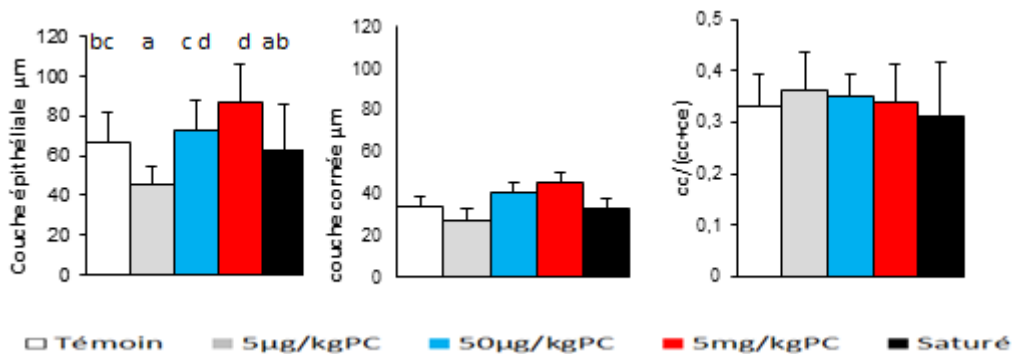


Figure 37: étude de l'impact du BPA sur l'histologie de l'épithélium buccal (N=6/lot): sur la couche épithéliale (ce), sur la couche cornée (cc), et sur le rapport couche cornée/ couche cornée épithéliale. Les valeurs sont les moyennes \pm SD. Les lettres représentent la différence entre groupe (Kruskal-Wallis $p < 0.05$)

3.6. Effet du BPA sur l'histologie des glandes salivaires

L'analyse histologique des glandes submandibulaires a porté sur l'évaluation des structures sécrétrices, c'est à dire sur les GCT et les acini. Les photos prises sous observations microscopiques et analysées par analyse d'images permettent de définir le nombre et la surface de ces structures et de comparer les effets entre les différents groupes.

3.6.1. Effet du BPA sur les glandes submandibulaires

Les glandes salivaires submandibulaires du rat mâle adulte contiennent des GCT très bien développés, qui ont un aspect blanchâtre sur les coupes histologiques, par opposition aux acini, qui sont colorés en rouge violet.

3.6.1.1. Aspect histologique pendant l'exposition au BPA

Comme le montre la photo 11, l'aspect histologique varie en fonction du traitement, et on voit clairement que les tailles des GCT et des acini évoluent, les acini semblant moins développés chez les animaux traités pour les groupes 50 μ et 5mg. On a l'impression que les GCT sont moins matures dans les groupes exposés au BPA. En effet, l'aspect des GCT paraît plus blanchâtre dans le groupe témoin ce qui laisse penser que les GCT étaient pleins de mucus alors que si la taille paraît équivalente pour les groupes BPA l'intérieur des GCT paraît moins homogène peut être en rapport avec une sécrétion de mucus altérée.

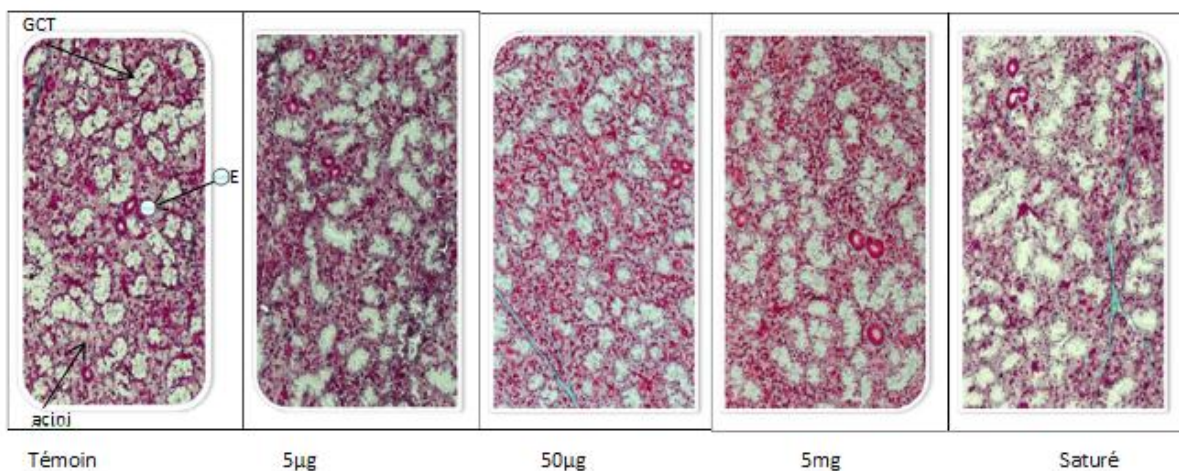


Photo 11 : effets de l'exposition au BPA sur les glandes submandibulaires, coloration Trichrome de Masson ; grossissement x 10

Dans notre étude le nombre de GCT était de 46/mm² (+/- 4); le nombre d'acini était de 425 /mm² (+/- 45) ; la surface moyenne par μm^2 de GCT était de 2791 (+/- 464) et pour les acini elle était de 907 (+/- 74) μm^2 .

L'observation numérique des coupes donne des résultats qui n'ont pas révélé d'effet hautement significatif sur les GCT, même si tous les rats exposés au BPA présentaient un nombre de GCT légèrement plus important que les rats témoins (fig. 38A) et une surface moyenne plus faible (fig. 38B). A l'inverse, les acini étaient significativement moins

nombreux mais plus volumineux chez les rats exposés au BPA ($p < 0.01$, fig. 38C), avec une surface significativement plus importante dès la plus faible dose d'exposition ($p < 0.01$, fig. 38D), traduisant des modifications dans les processus de sécrétion.

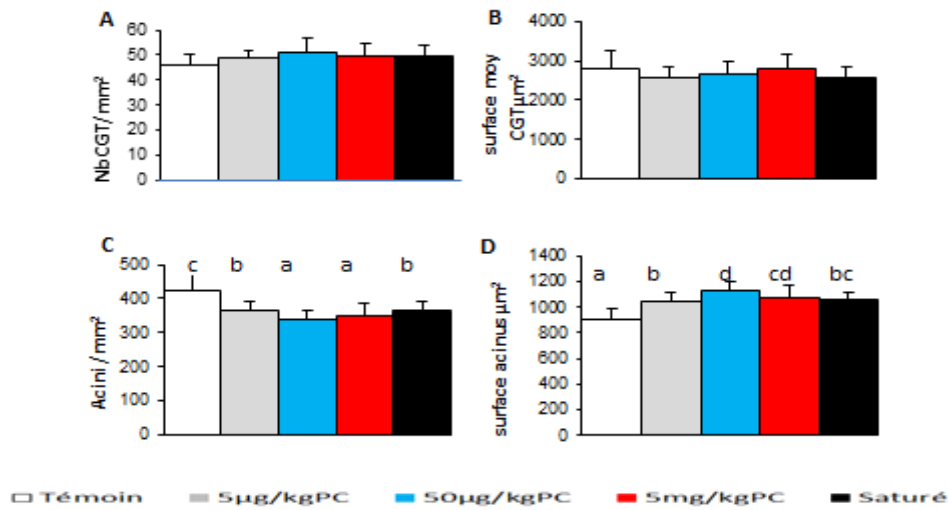


Figure 38: étude de l'effet du BPA sur les structures histologiques de la glande salivaire submandibulaire (N=6/lot): sur le nombre (A) et la surface (B) des GCT et sur le nombre (C) et la surface (D) des acini. Les valeurs sont des moyennes +/- SD. Les lettres représentent la différence entre groupe (KW $p < 0.01$)

3.6.1.2. Etude de réversibilité (fig 39)

Nous avons constaté qu'il existait une réversibilité de l'effet BPA sur l'histologie des glandes submandibulaires puisqu'il n'existait plus aucun effet quel que soit le groupe. Il existe donc une plasticité de la glande submandibulaire (fig 39).

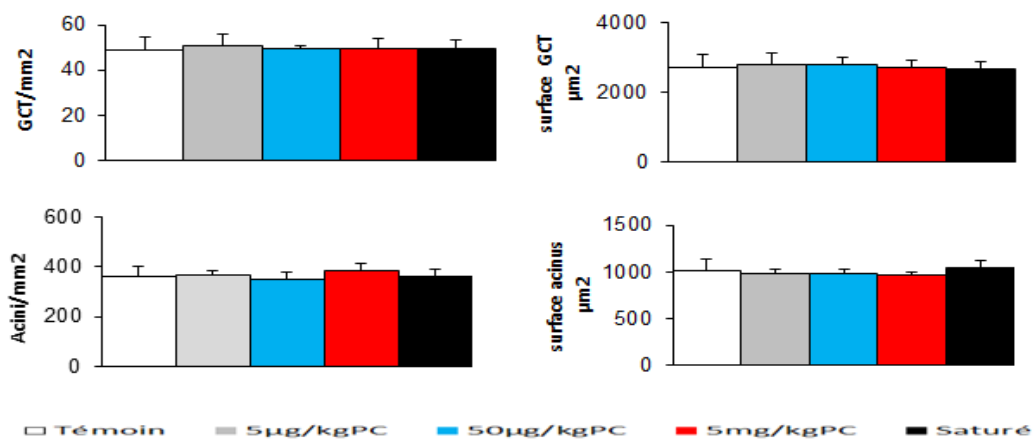


Figure 39 : étude de la réversibilité sur l'histologie de la glande submandibulaire. Les valeurs sont des moyennes +/- SD (N=6/lot).

3.6.2. Effet du BPA sur les glandes sublinguales

Les glandes sublinguales du rat mâle adulte contiennent 2 types de structures : des canaux excréteurs (CE) et des acini séro-muqueux (partie muqueuse en blanc et partie séreuse en rose). Les photos prises sous microscope ont permis de définir le nombre et la surface des acini et des canaux et de comparer les différents groupes.

Comme le montre la photo 12, la taille des structures glandulaires semble peu modifiée.

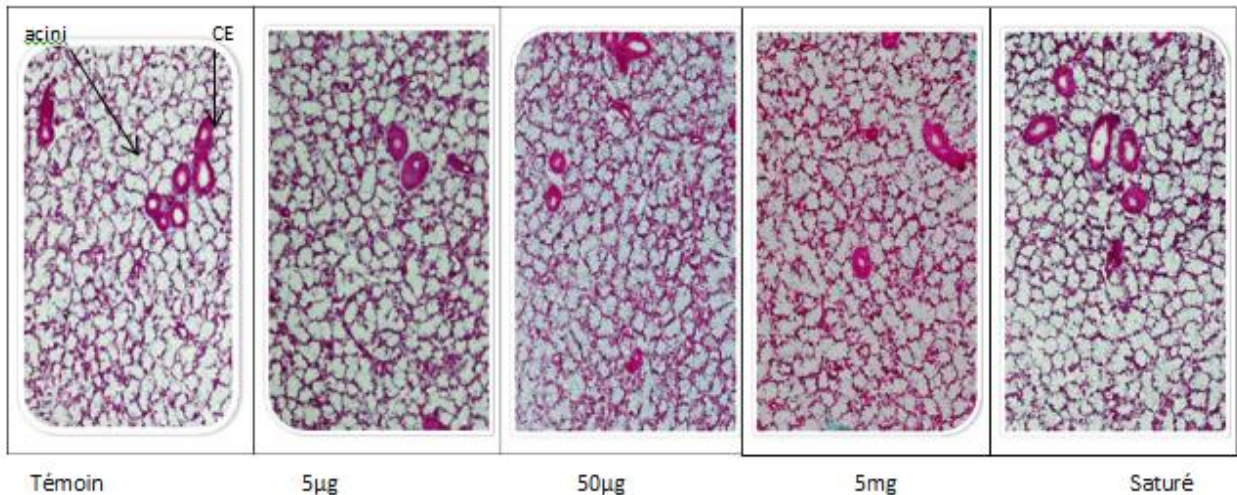


Photo 12 : effets de l'exposition au BPA sur l'histologie des glandes sublinguales (trichrome de Masson, grossissement x 10)

Dans notre série, le groupe témoin comprenait un nombre de canaux de $9/\text{mm}^2 \pm 2$, un nombre d'acini de $169/\text{mm}^2 \pm 3$. Quant aux surfaces moyennes pour ce groupe, elles étaient de $3100\mu\text{m}^2 \pm 250$ pour les canaux excréteurs et de $1300/\mu\text{m}^2 \pm 140$ pour les acini.

Nous n'avons pas noté de résultats significatifs sur le nombre ou la surface des canaux excréteurs. Nous avons mis en évidence une variation du nombre d'acini avec un effet en U inversé ($p < 0.001$), mais sans modification de surface (fig 40).

Compte tenu de la faible modification de structure de la glande sublinguale nous n'avons pas réalisé l'étude de réversibilité.

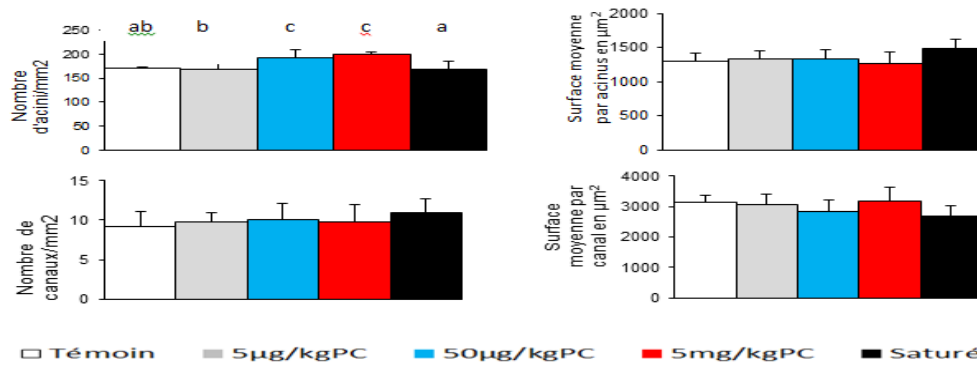


Figure 40: étude de l'impact de l'exposition au BPA sur l'histologie de la glande sublinguale : (N=6/lot): sur le nombre et la surface des acini sur le nombre et la surface des canaux excréteurs. Les valeurs sont des moyennes +/- SD. Les lettres représentent la différence entre groupes (KW p<0.01)

3.6.3. Effets du BPA sur les glandes parotides

L'analyse histologique des glandes parotides a porté sur l'évaluation des structures sécrétrices (en l'occurrence les acini séreux) et les canaux excréteurs. Les photos prises au microscope ont permis d'analyser leur nombre et leur surface afin de comparer l'effet de l'exposition au BPA sur ces structures histologiques entre les différents groupes.

3.6.3.1. Aspect histologique pendant l'exposition au BPA

Comme le montre la photo 13 l'aspect histologique des acini varie en fonction du traitement et on voit que la surface des acini paraît plus grande pour les lot BPA.

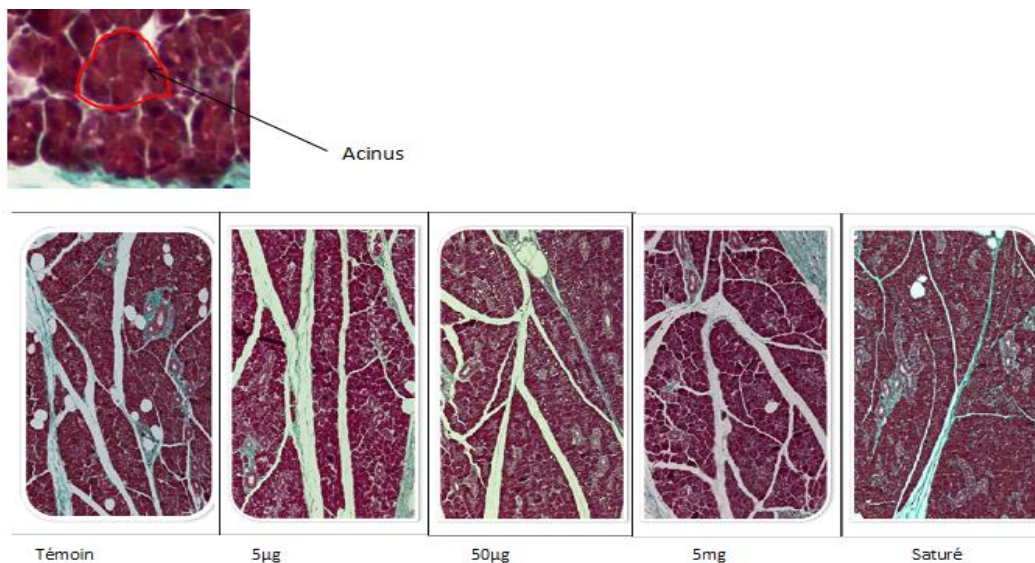


Photo13 : effet de l'exposition au BPA sur l'histologie des glandes parotides (trichrome de Masson, grossissement x10)

Dans notre série, le nombre de canaux était de $9327 /\text{mm}^2 \pm 2$, le nombre d'acini était de $830/\text{mm}^2 \pm 100$. Quant aux surfaces moyenne, elle était de $9327\mu\text{m}^2 \pm 2000$ pour les canaux excréteurs et de $479/\mu\text{m}^2 \pm 38$ pour les acini.

Nous avons constaté qu'il n'y avait pas de modification significative de structure des canaux excréteurs. Par contre, il existe une diminution du nombre d'acini séreux ($p < 0.001$) avec une courbe en U centrée sur le lot 5mg/kg. Parallèlement, il existe une augmentation de la taille moyenne de ces acini ($p < 0.0001$) avec une courbe inversée centrée sur le 5mg (figure 41).

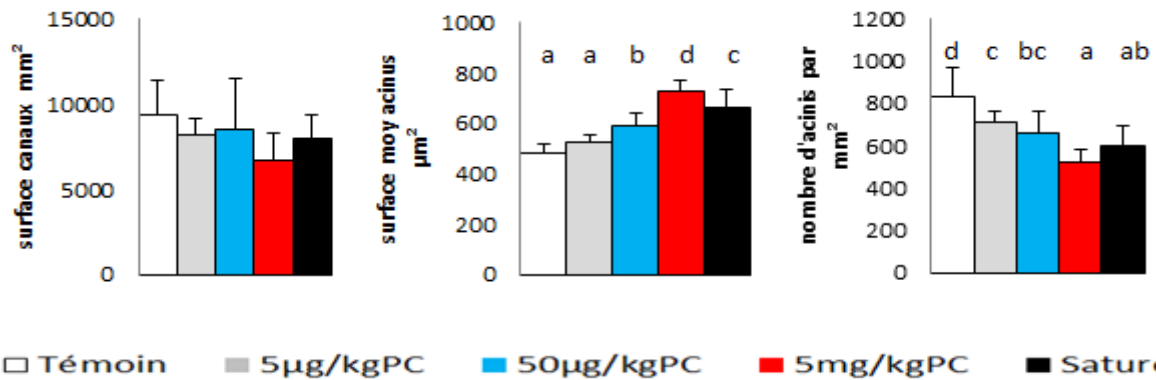


Figure 41: impact de l'exposition au BPA sur les structures histologiques de la glande parotite : (N=6/lot): sur le nombre et la surface des acini et sur la surface des canaux excréteurs. Les valeurs sont des moyennes \pm SD. Les lettres représentent la différence entre groupes (KW $p < 0.001$)

3.6.3.2. Etude de réversibilité

Lors de l'étude de réversibilité, il persistait un effet BPA avec toujours des acini moins nombreux et plus gros mais de façon moins significative et essentiellement sur le groupe 5mg ($p < 0.05$) (fig 42).

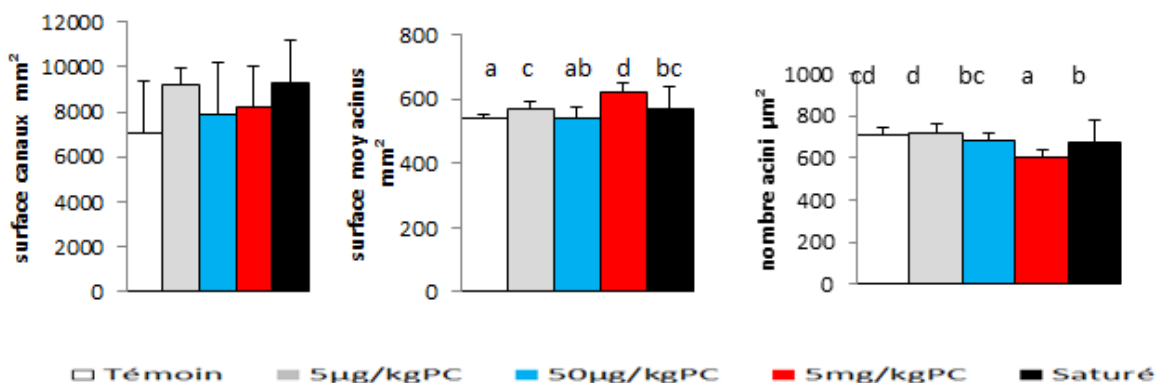


Figure 42: étude de réversibilité sur l'histologie de la glande parotite : (N=6/lot): sur le nombre et la surface des acini et sur la surface des canaux excréteurs. Les valeurs sont des moyennes \pm SD. (NS)

3.7. Expression des mRNA dans les glandes salivaires

3.7.1. Expression des mRNA dans la glande submandibulaire

3.7.1.1. Expression des mRNA pendant la phase d'exposition au BPA

Les résultats sont décrits dans la figure 42. Nous nous sommes intéressés aux récepteurs hormonaux de la glande, aux facteurs de croissance qu'elle synthétise, au *chmr3* impliqué dans la sécheresse buccale ainsi qu'aux protéines salivaires impliquées dans la gustation.

D'une manière générale, les récepteurs aux hormones sexuelles sont bien exprimés dans les glandes salivaires, cependant, l'analyse Q PCR donne un Ct élevé car leur expression est très localisée dans les épithéliums (pour notre étude on retrouvait des Ct moyens entre 26 et 30). Une analyse par immuno-histochimie permettrait d'en révéler la position spécifique. Toutefois, leur expression semble engendrer des modifications dans l'expression des mRNA de gènes associés aux fonctions endocrines (EGF dont la Ct moyenne était à 21) et exocrines (Ct des protéines salivaire en moyenne entre 15 et 17).

Concernant les récepteurs hormonaux, nous avons mis en évidence une différence significative quant à l'expression du récepteur $ER\alpha$ ($p < 0.01$) entre les rats témoins et les rats traités, notamment avec le groupe 5mg. De même, on a observé une différence d'expression (moins importante) du mRNA $ER\beta$ entre le témoin et les groupes traités à 5mg et 50 μ g (KW $p < 0.05$). Nous avons également constaté des modifications d'expression pour le récepteur des androgènes (ANOVA $p < 0.01$) mais uniquement dans le lot à 5mg. Il n'était pas mis en évidence de variation sur les récepteurs de la progestérone. De façon générale, la courbe dose-réponse était de type sinusoïdal. Comme il y a une relation entre $ER\alpha$ et PR et AR l'aspect identique des courbes n'est pas illogique.

Concernant les facteurs de croissance, nous n'avons pas trouvé de différence entre les différents groupes sur l'EGF ; par contre il existait des modifications d'expression sur le NGF avec aussi un aspect de courbe sinusoïdale avec une expression basse pour le lot à 5mg (KW $p < 0.01$). Ces 2 réponses ont un profil corrélé à l'expression d' $ER\alpha$ et AR.

La baisse d'expression du récepteur *Chrm3* (Cholinergic Receptor muscarinic 3) apparaissait significative pour le groupe 5mg par rapport aux autres groupes (KW $p < 0.001$) mais n'était pas parfaitement corrélée au profil de courbe d'ER et AR.

Comme le montre la figure 43, l'expression des ARN messagers correspondant aux protéines gustatives a été différemment modulée par le traitement. Pour des raisons techniques le groupe saturé n'a pas été fait. On retrouvait, là aussi un effet sinusoïde ($p < 0.05$) avec une prédominance de l'expression pour le 5mg pour la gustine, la kalllicréine et la mucine 10 et un

effet inverse pour l'amylase. L'expression de la cystatine était d'interprétation plus difficile avec une courbe en U centrée sur le 50µg. En tout état de cause on ne retrouvait pas de profil corrélé aux courbes ER et AR.

Les modifications biomoléculaires retrouvées semblaient donc essentiellement présentes pour le groupe 5mg.

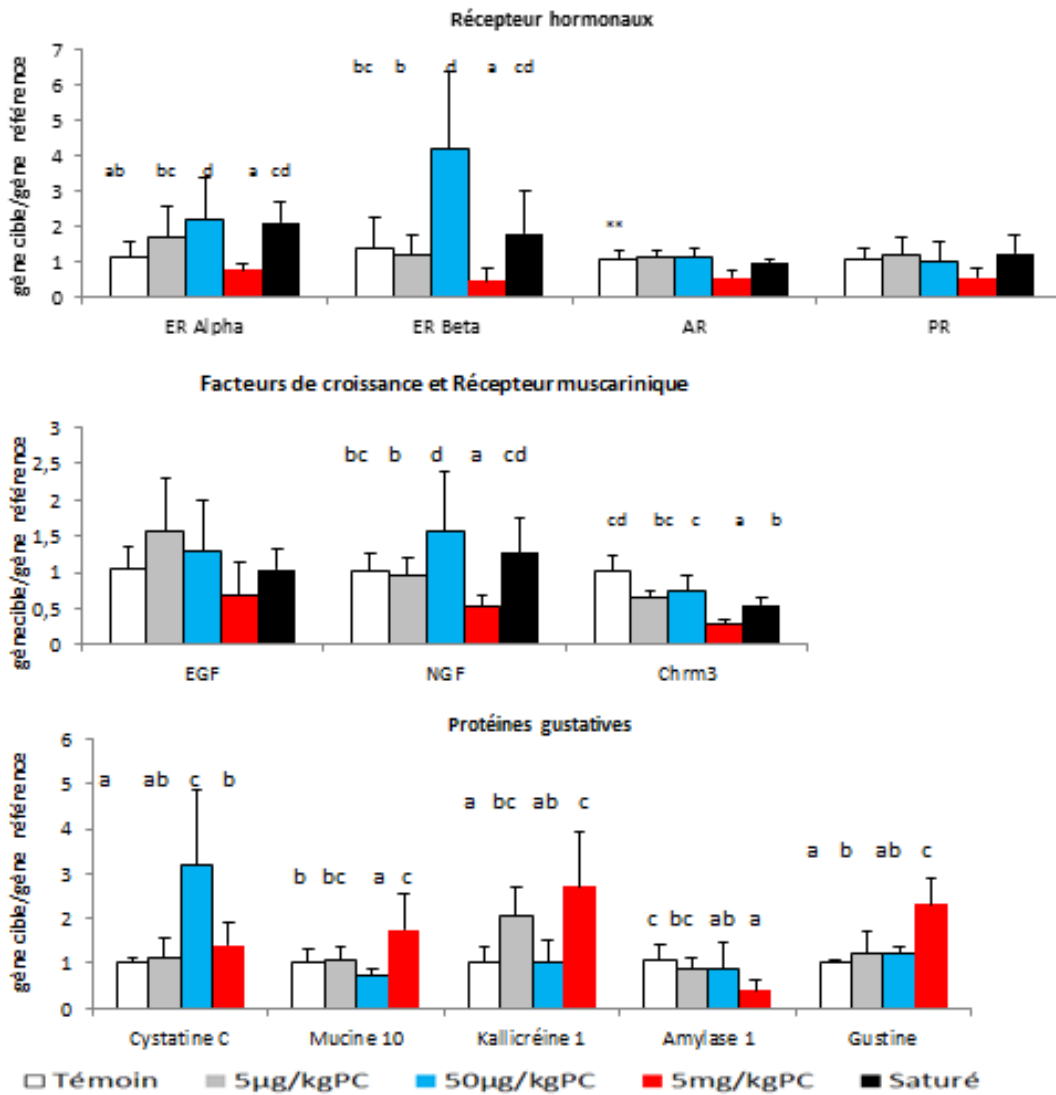


Figure 43 : glande salivaire submandibulaire : effets de l'exposition au BPA sur les ARNm des récepteurs hormonaux, sur les facteurs de croissance et le récepteur muscarinique et sur les ARNm des protéines gustatives hormono-dépendantes (N=6/lots), Les valeurs sont des moyennes +/- SD. Les lettres représentent la différence entre groupe (KW p<0.05 ; ANOVA p<0.01)

3.7.1.2. Etude de réversibilité

L'étude de réversibilité n'a été réalisée que sur les récepteurs hormonaux et les facteurs de croissance. On constatait une disparition de l'effet BPA (fig 44) même si on constatait une certaine similitude de courbe entre ER, AR et les facteurs de croissance.

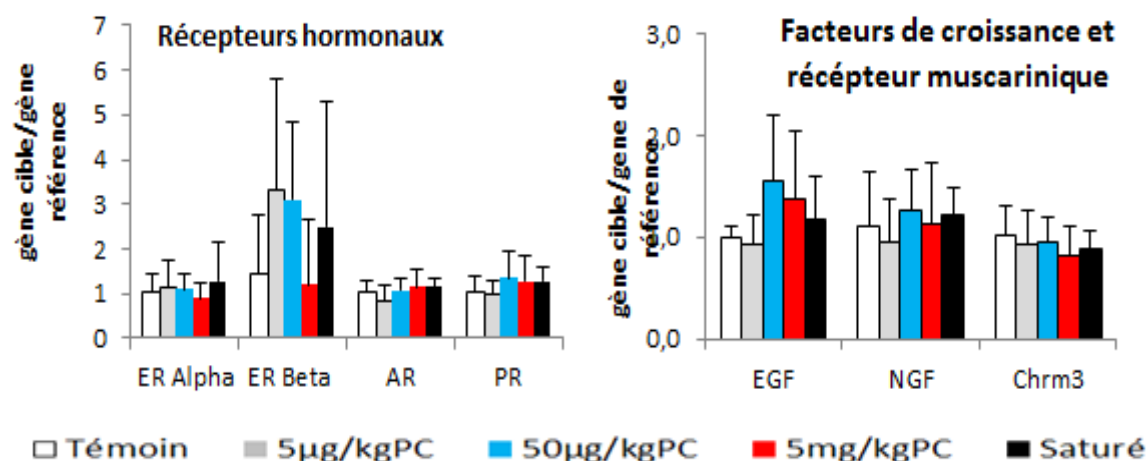


Figure 44: expression des ARNm après arrêt du traitement BPA sur les glandes submandibulaires (N=6/lots), Les valeurs sont des moyennes +/- SD.

3.7.2. Expression des ARNm dans la glande sublinguale (fig 45)

Nous nous sommes intéressés aux récepteurs hormonaux de la glande sublinguale, aux facteurs de croissance qu'elle synthétise, au chmr3 impliqué dans la sécheresse buccale, mais nous n'avons pas étudié l'expression des ARNm des protéines gustatives.

Nous avons retrouvé des Ct variables pour les récepteurs hormonaux (15 pour ER β à 33 pour ER α) et de même des Ct variables pour les facteurs de croissance (25 pour EGF et 31 pour NGF) alors que le RPS9, gène de référence était à 20.

Concernant les récepteurs hormonaux, il n'était pas mis en évidence de différence significative entre le groupe témoin et les groupes BPA même si on constatait une courbe en U inversé pour les récepteurs ER α , ER β , AR et PR. De même, il n'existait pas de différence significative sur le récepteur muscarinique.

Par contre, il existait un effet du BPA sur les facteurs de croissance hormono-dépendants avec là aussi une courbe en U inversé ($p < 0.01$). La majorité des effets semblait centrée sur le 50µg. Il y avait une certaine similitude de courbe entre les facteurs de croissance, AR et PR.

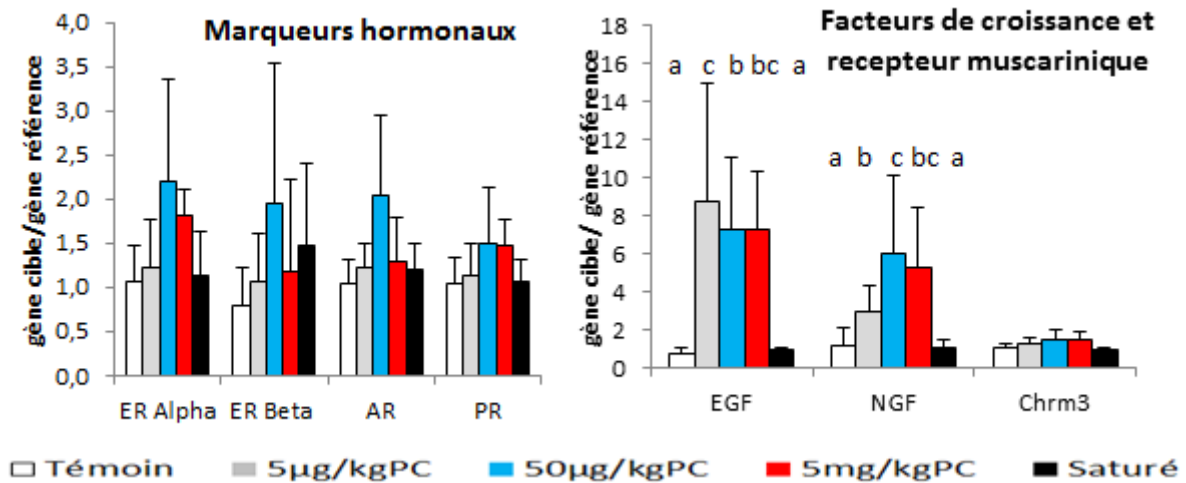


Figure 45: glande salivaire sublinguale : effets de l'exposition au BPA sur les ARNm des récepteurs hormonaux et sur les facteurs de croissance (N=6/lots), Les valeurs sont des moyennes +/- SD. Les lettres représentent la différence entre groupe (KW p<0.05)

4. Conclusion

En premier lieu, cette étude a identifié les effets sur la sècheresse buccale dont les origines restent à préciser. Elle a aussi permis de mettre en évidence un effet sélectif du BPA sur les préférences gustatives.

A l'image des œstrogènes, le BPA stimule la consommation de salé mais réduit celle du sucré et , à un moindre degré, semble aussi réduire la consommation de gras. Ces effets sont proportionnels à la dose de traitement et ont quasiment disparu 6 semaines après arrêt du traitement, démontrant ainsi le caractère réversible de l'effet et traduisant une plasticité des organes et mécanismes impliqués.

L'analyse histologique des glandes salivaires montre que le BPA a une action ciblée sur les structures acinaires quel que soit le type de glandes et cet effet semble disparaître à l'arrêt du traitement.

L'analyse moléculaire menée sur les glandes submandibulaires montre le caractère hormonal de l'action du BPA ciblée sur l'expression du ER α et β . Cet effet œstrogénique se répercute sur l'expression des facteurs de croissance mais pas du Chrm3 (connu pour être androgéno-régulé). Concernant les protéines gustatives, seule la cystatine C semble avoir un profil de régulation de type œstrogénique.

Nos résultats permettent de confirmer que le BPA perturbe l'homéostasie buccale et que les glandes salivaires sont une cible privilégiée de son action.

Enfin, les effets œstrogéniques du BPA justifient de porter une attention particulière à la composition du régime alimentaire ; objet de notre deuxième étude.

II. Etude de mélanges : Effets du régime sur les effets du BPA

1. Intérêt et problématique

L'influence du régime sur le comportement alimentaire et les préférences gustatives est un facteur qu'il ne faut pas négliger compte tenu de la présence de phyto-œstrogènes liés à l'apport de protéines de soja dans certains régimes proposés en expérimentation animale.

Le but de cette étude était d'identifier l'impact de la présence de phyto-œstrogènes dans le régime alimentaire sur l'effet du Bisphénol A. Il s'agit de comparer l'effet obtenu avec un régime semi-synthétique (L5), donc dépourvu de phyto-œstrogènes et de Xénohormones, avec l'effet d'un régime contenant des extraits végétaux (blé, soja) qui apportent des phyto-œstrogènes (comme la génistéine), lesquels sont susceptibles d'interagir avec les propriétés de contaminants alimentaires œstrogénique comme le BPA.

2. Matériel et méthodes

2.1. Produits chimiques:

Le BPA, la saccharine, le NaCl et le xanthane ont été obtenus auprès de Sigma-Aldrich (pureté de 98%>). L'huile de maïs a été achetée dans une grande surface (Système U (Rungis, France). L'isoflurane était à 2.5%.

Tous les autres produits chimiques étaient des standards de sources commerciales et étaient de la plus haute qualité disponible.

2.2. Rats et procédures expérimentales:

La procédure expérimentale a été approuvée par le comité d'éthique local de l'Université de Bourgogne. Un total de 40 rats mâles Wistar nés au sein de l'animalerie de l'INRA (parents originaires de Harlan France SARL, Gannat, France) ont été acclimatés dans l'animalerie dans des conditions contrôlées (22 ° C, 55% d'humidité relative, alternance jour nuit de 12h). Pour éviter la contamination par l'exposition œstrogénique de l'environnement et de la nourriture, les rats ont été logés dans des cages en polypropylène (3 à 4 par cage) et ont été autorisés à avoir accès ad libitum à de l'eau filtrée sur charbon actif. L'alimentation était constituée par des croquettes dépourvues en phyto-œstrogène (INRA, Jouy-en- Josas, France, Stroheker et al, 2003) jusqu'à l'âge adulte.

Phase 1 : Lorsque les rats ont été âgés de 3 mois (357 à 509 g), ils ont été assignés au hasard à 2 groupes l'un sous régime L5 (sans phyto-œstrogènes, 3,8 kcal/g) et l'autre sous un régime riche en phyto-œstrogènes (A03, SAFE, Auggy, 3kcal/g) (fig 46). Ils ont été logés individuellement dans des cages en polypropylène avec un biberon d'eau. La consommation d'eau et d'aliments et le poids des animaux ont été mesurées 1 à 2 fois par semaine pendant 6 semaines.

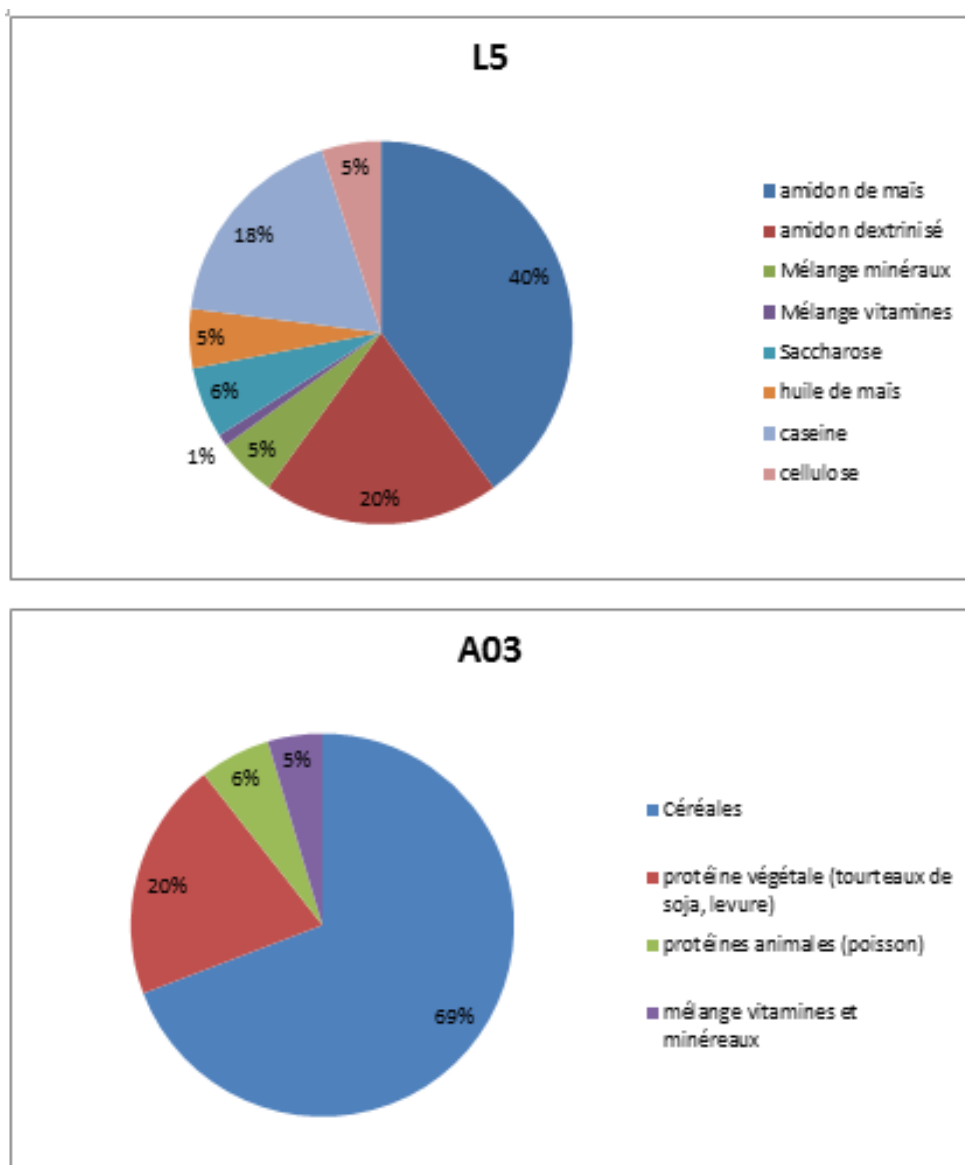


Figure 46 : composition du régime alimentaire L5 et du régime alimentaire A03

Phase 2 : A la fin de cette période chaque groupe d'animaux a été séparé en 2 groupes afin d'obtenir 4 groupes : un groupe régime (L5), un régime L5 BPA (L5PA), un régime A03 (A03) et un régime A03 BPA (A03BPA). Les 2 groupes exposés au BPA l'étaient à une dose de 5mg/kg/j. Nous avons choisi cette dose car c'est la dose où nous avons le plus d'effets lors

de la première étude (effets à la fois sur le sucré, le salé et les glandes salivaires). Le BPA a été ajouté dans l'eau potable. Les biberons ont été pesés et complétés 2 fois par semaine avec le BPA pendant 6 semaines consécutives.

À la fin de cette période, les animaux ont été sacrifiés pour étude histologique.

Lors des phases 1 et 2 outre l'étude du poids, de la consommation d'eau et d'alimentation étaient étudiées les préférences gustatives. Ces tests étaient réalisés les 2 dernières semaines de chaque phase.

2.3. Etude du comportement gustatif

Les consommations de solutions et les préférences gustatives ont été évaluées en utilisant le test de deux biberons pendant trois jours consécutifs. Les rats ont été familiarisés avant le début de chaque test à la présence de deux biberons pendant 3 jours. Pour les tests, un biberon a été rempli par la solution de contrôle (eau ou émulsion) et l'autre a été rempli avec la solution test. Le placement gauche / droite des biberons a été inversé chaque jour et chaque test de saveur a été séparé par une journée sans choix. Les biberons ont été pesés une fois par jour à la même heure et le montant consommé en g par jour a été divisé par le poids du corps pour exprimer les résultats en des g consommé / jour / 100g de poids corporel. Les préférences au sucré, salé et gras ont été successivement mesurées suivant la procédure en utilisant respectivement 0,3% saccharine, le chlorure de sodium à 1,0% et 1% d'huile de maïs. La consommation de matières grasses a été mesurée en plaçant l'huile de maïs diluée dans une émulsion de xanthane à 0,3%. La préférence a été exprimée par le rapport entre la consommation de la solution test et la consommation totale (solutions contrôle et test).

2.4. Sacrifices

Les animaux ont été pesés, puis, ils ont été anesthésiés avec de l'isoflurane (2,5%) et sacrifiés par exsanguination à l'aorte abdominale. Le sang a été prélevé, le plasma a été conservé à -20 ° C. En outre, la langue et les glandes salivaires ont été retirées, pesées et stockées pour histologie et analyses biochimiques. Les rats sacrifiés ont bénéficié d'un prélèvement de muqueuse buccale jugale droite. Ce prélèvement était réalisé au moyen d'un scalpel après luxation de la mâchoire inférieure. Enfin le tissu adipeux dorsal a été prélevé.

2.5. Etude statistique

L'étude statistique était faite à partir du fichier Excel de recueil de données. Les données représentaient la valeur moyenne obtenue dans chaque groupe (moyenne +/- écart type, n=20/groupe pour l'étude de l'effet régime (2 groupes); N=10 pour l'effet du BPA sur les

régimes (4 groupes). L'analyse des données était basée sur un test de Student dans la première phase. Dans la deuxième phase on a également utilisé un test de Student en prenant le régime L5 sans BPA comme « Témoin » et en comparant l'effet régime (A03), l'effet BPA (L5BPA) et l'effet mélange (A03-BPA) à ce groupe témoin. Il existait une différence significative si $p < 0.05$.

3. Résultats

3.1. Influence du régime alimentaire

3.1.1. Prise alimentaire et poids corporel

Nous avons constaté qu'il n'existait pas de différence significative sur le poids au cours de cette première phase entre les rats A03 et L5 (418 +/-19g). De même, la consommation de croquettes était équivalente en valeur énergétique (331 +/-15Kcal). Il existait, par contre une modification de la consommation d'eau entre les 2 groupes qui était fortement supérieure dans le groupe recevant le régime riche en phyto-œstrogènes ($p < 10^{-5}$) (fig 47).

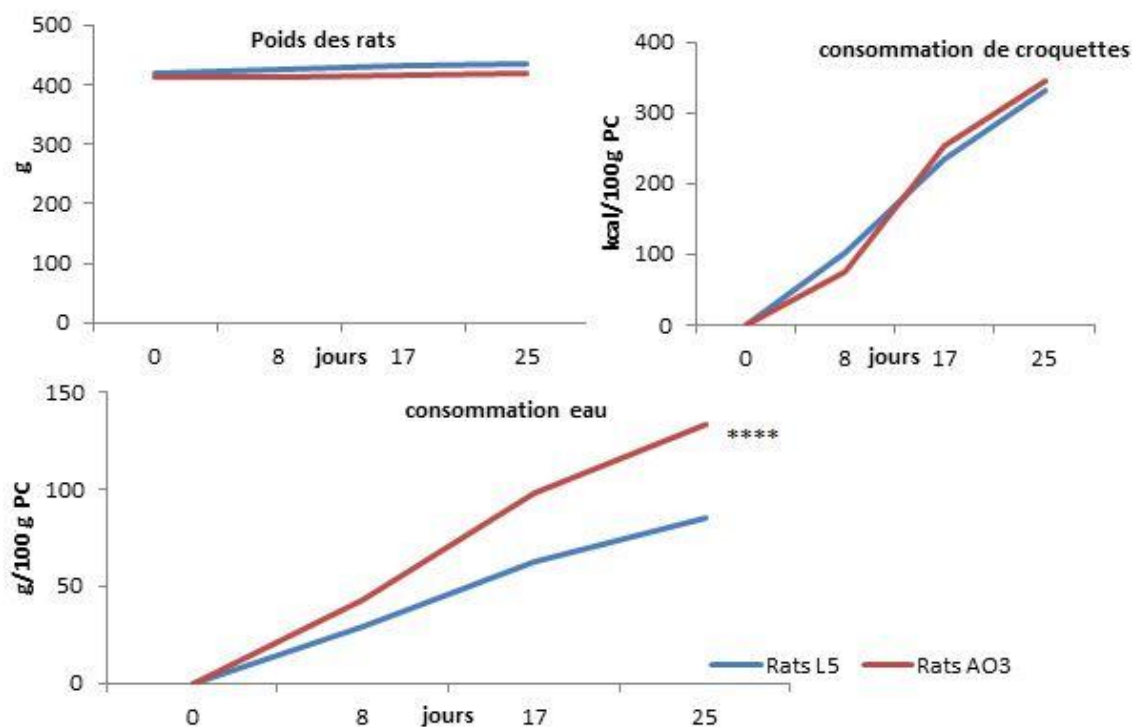


Figure 47 : effet du régime alimentaire sur le poids des rats et la consommation d'eau et de nourriture. Les valeurs sont des moyennes +/- SD. (student, **** $p < 0.0001$, N=20/lot).

3.1.2. Préférences gustatives (fig48)

Les préférences gustatives ont été étudiées avec la notion que les rats aiment le sucré (préférence supérieure à 90%), le gras dans une moindre mesure (préférence supérieure à 60%) et ont une indifférence au sel (préférence entre 40 et 60%) : même si on sait que certains rat peuvent avoir un comportement « aberrant ».

3.1.2.1. Sucré

L'ingestion d'un régime contenant des phyto-œstrogènes augmentait la consommation de saccharine de manière significative ($p < 0.05$). Même si elle n'était pas significative, il existait aussi une augmentation de la consommation d'eau en rapport avec ce qui avait été observé pendant les 28 premiers jours. Il en résultait une absence de différence sur la préférence au sucré par rapport au régime synthétique.

3.1.2.2. Salé

L'ingestion de croquettes A03 n'affectait pas la consommation d'eau salée alors qu'il existait toujours une plus grande consommation d'eau qu'avec le régime L5 ($p < 0.0001$). Il en résultait une moindre préférence au salé ($p < 0.5$).

3.1.2.3. Gras

Concernant le gras, on constatait qu'il y avait une plus grande consommation de gras ($p < 0.0001$) et de solution de xanthane sous régime A03 ($p < 0.01$). Il en résultait une absence de différence par rapport au L5 sur la préférence au gras.

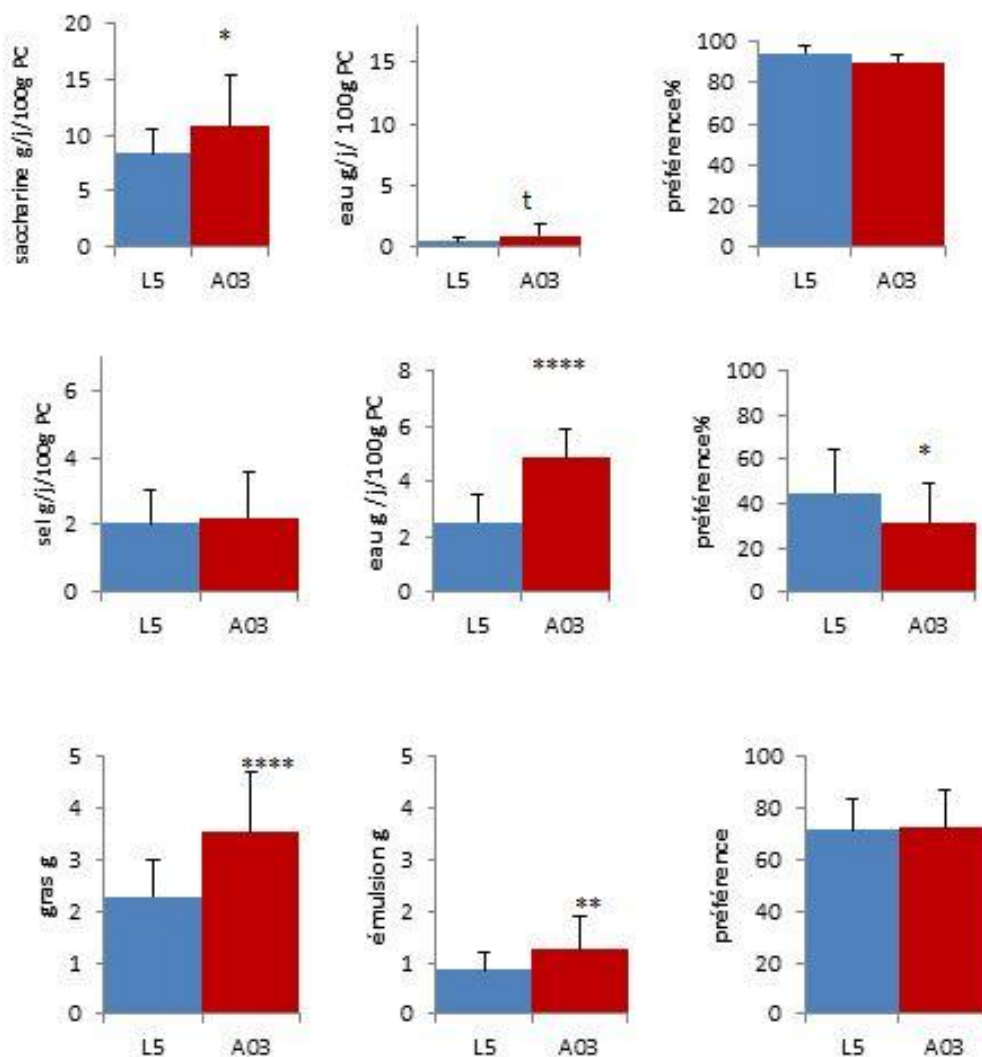


Figure 48: impact du régime riche en phyto-œstrogènes sur la préférence au sucré, au salé et au gras. Les valeurs sont des moyennes +/- SD. (Student : t tendance, * $p < 0.05$, **** $p < 0.00001$), N=20/lots

3.2. Influence du BPA selon la composition du régime alimentaire

3.2.1. Prise alimentaire et poids corporel

On ne trouvait pas de modification du poids (441g +/- 18g) ou de la consommation de croquettes. La consommation d'eau était significativement plus élevée chez les rats A03 (6,6g/100gPC /j +/- 0,6 pour A03 versus 3,5g/100g/j +/- 0,4 ; $p < 10^{-6}$). Le BPA était responsable d'une moindre consommation d'eau tant pour les rats consommant du L5 (3g/100g/j +/- 0,6) ou de l'A03 (4,3 g/100g/j +/- 0,5) comme retrouvé lors de notre première

étude même si cette différence n'était pas significative et son effet restait inférieur à celui du régime alimentaire correspondant (fig 49).

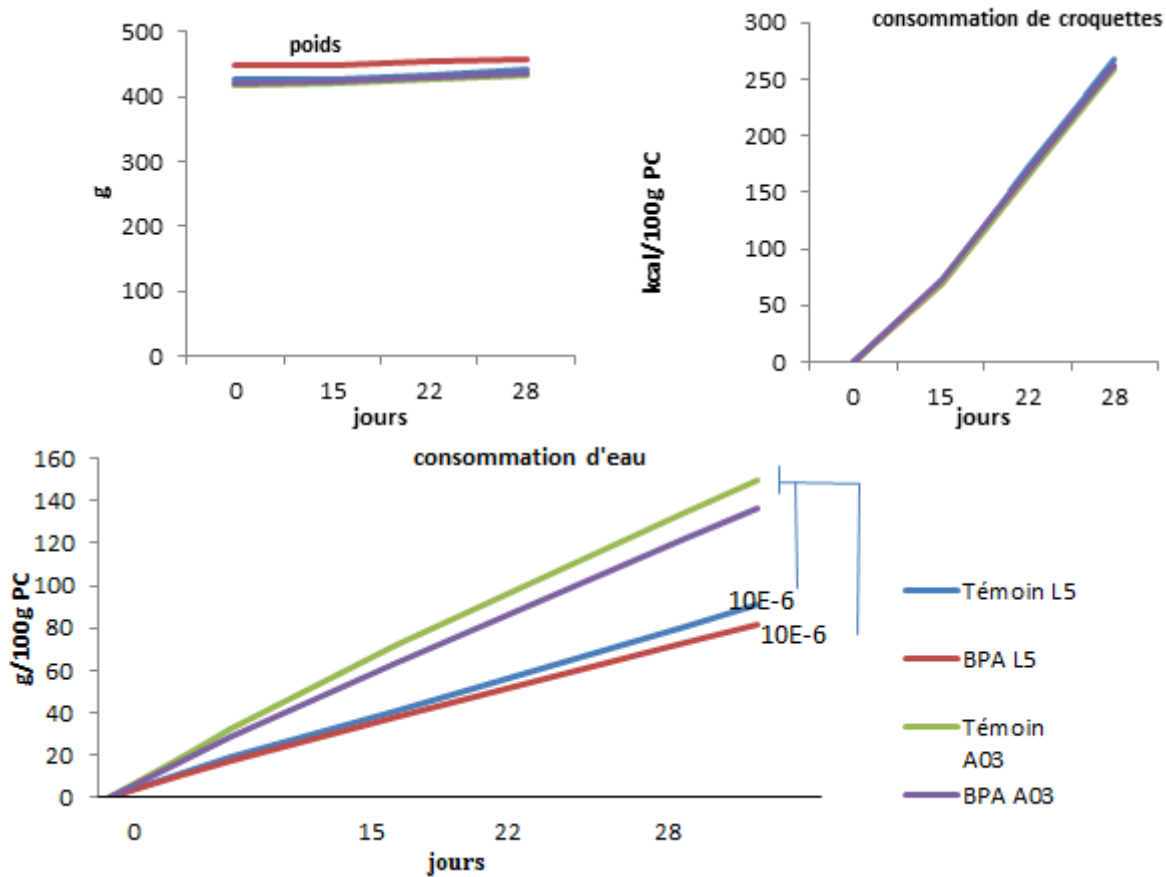


Figure 49: effet d'une exposition au BPA à la dose de 5mg/kg/j et du régime alimentaire sur le poids et la consommation d'eau et de croquettes. Les valeurs sont des moyennes +/- SD ; N=10/lot

3.2.2. Préférences gustatives (fig 50)

3.2.2.1. Préférence au Sucré

L'ingestion de saccharine était significativement inférieure dans le groupe L5BPA ($p < 0.05$) alors qu'il n'existait pas de différence entre les groupe L5, A03 et A03BPA ce qui signifie qu'il existait un effet BPA à l'ingestion de saccharine mais pas d'effet régime et pas d'effet mélange.

On retrouvait une plus grande consommation d'eau lors du régime A03 mais de façon non significative ($p < 0.06$).

Il en résultait une absence de différence sur la préférence au sucré entre les 4 groupes signifiant qu'il n'y avait pas d'effet BPA ni régime ni mélange sur les préférences ; même si on constatait que les lots L5BPA et A03 préféraient moins le sucré alors que le régime associant les 2 avait des effets comparables au témoin L5 signifiant qu'il n'y avait pas d'addition des effets.

3.2.2.2. Préférence au salé

Concernant l'eau salée, il existait une plus grande consommation pour les lots L5BPA, A03 et A03BPA avec une différence significative pour le lot A03BPA (effet mélange $p < 0.05$).

On retrouvait toujours une plus grande consommation d'eau pour le régime A03 ($p < 0.05$) avec une consommation diminuée sous l'effet du BPA mais de façon non statistiquement significative.

Même si la préférence au salé semblait supérieure lors de la présence de BPA cet effet n'était pas statistiquement significatif. Nous n'avons pas pu confirmer les résultats de notre première étude sur l'effet du BPA sur le salé probablement à cause d'écart type trop important compte tenu du faible nombre de rats.

3.2.2.3. Gras

La consommation de gras était diminuée lors de l'exposition au BPA ($p < 0.05$) comme cela avait bien été mis en évidence lors de la première étude; alors qu'elle était augmentée sous l'effet régime ($p < 0.01$). L'effet mélange ne présentait pas de différence par rapport au témoin (L5) montrant un effet antagoniste entre phytoestrogène et BPA.

Il n'existait aucune différence de consommation de solution de xanthane.

Il en résultait une moindre préférence au gras pour le lot BPA et le lot mélange montrant l'importance de l'effet BPA et l'absence de l'effet régime, même si , toujours à cause d'écart type important cela n'était statistiquement pas significatif.

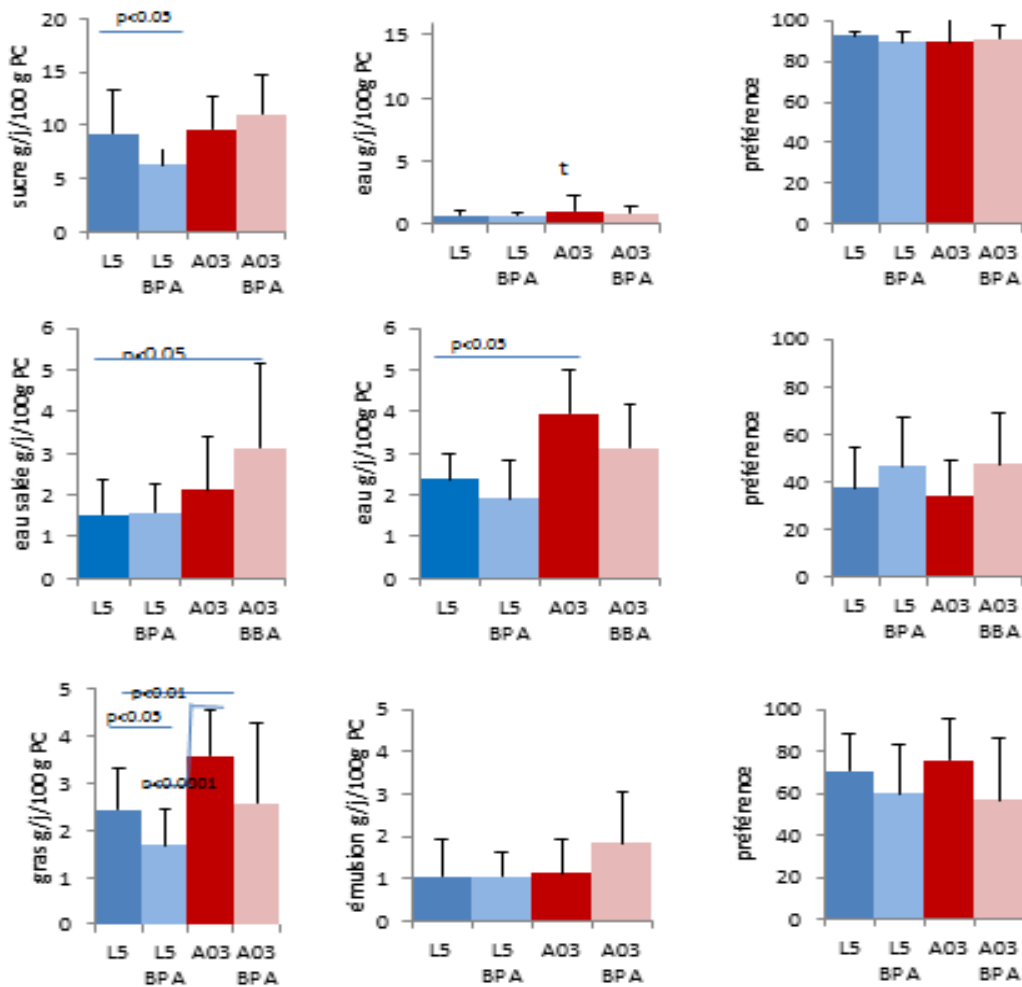


Figure 50: effets de l'exposition au BPA à la dose de 5mg/kg/j, des phyto-œstrogènes et du mélange (BPA-Phyto-œstrogènes) sur la préférence au sucré ,au salé et au gras. Les valeurs sont des moyennes +/-SD ; N=10/lot

3.3. Constatations lors des sacrifices

Il n'existait pas d'effet BPA, phyto-œstrogène ou mélange sur la glycémie (moyenne 111 mmol/l +/- 11). De même, il n'existait pas de différence entre le poids des différents organes en fonction du type de mélange ou de l'exposition au BPA (fig 51) ; même s'il existait une tendance à une différence sur le poids des glandes submandibulaires plus grosses pour les rats sous régime A03 (0,0095g/100gPC versus 0,0085 g/100g PC pour L5) inverse au poids des glandes submandibulaires. On retrouvait également un tissu adipeux plus important dans le lot L5BPA (1.6g/100gPC) alors qu'il existait plutôt moins de gras dans les lots A03 (1,1g/100gPC) et mélange (1,2g/100gPC) comparable au témoin L5 (1,3g/100g PC). Ces résultats n'étaient pas statistiquement significatifs mais on retrouvait que l'effet BPA disparaissait quasiment lors d'un mélange BPA/phyto-œstrogènes.

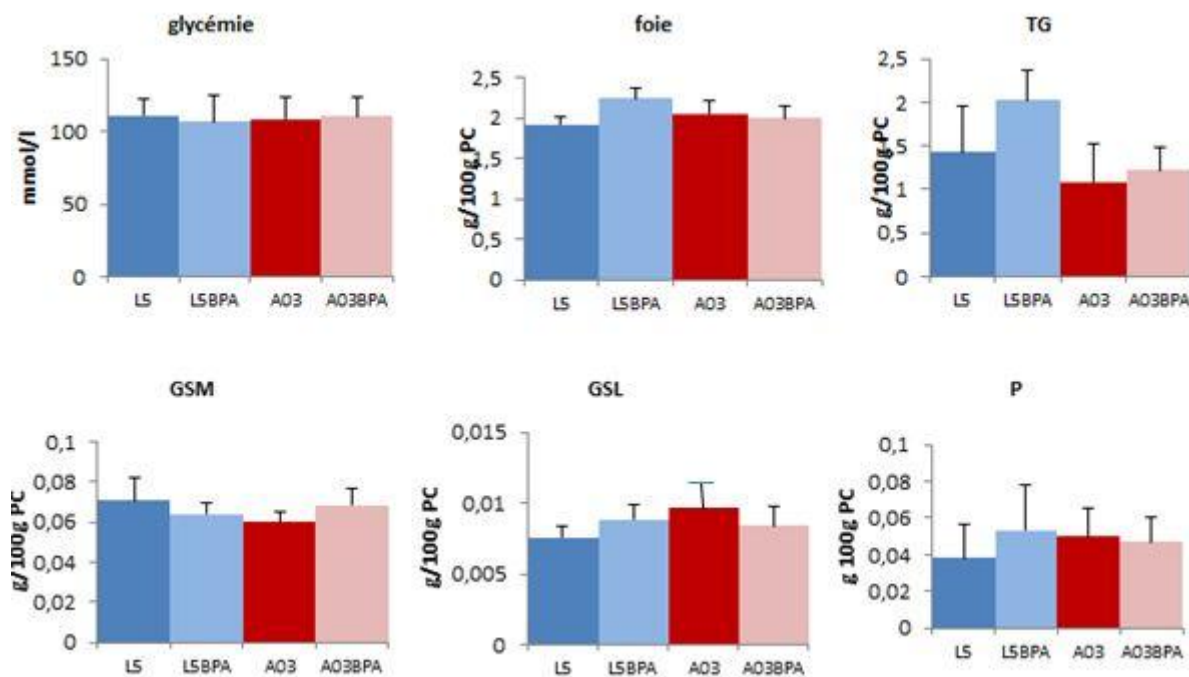


Figure 51 : effets de l'exposition au BPA à la dose de 5mg/kg/j, des phyto-œstrogènes et du mélange sur le poids des organes et la glycémie. Les valeurs sont des moyennes +/-SD ; N=10/lot

4. Conclusion

Cette étude nous a permis de mettre en évidence les mêmes effets ou tendances que nous avons vu lors de notre première étude sur l'effet du BPA, à savoir une moindre préférence pour les goûts sucré et gras et une plus grande préférence au goût salé.

Cette étude nous a permis de voir combien le régime alimentaire est important lors de l'expérimentation. En effet nous avons constaté de grandes différences sur la consommation d'eau (plus importante) mais aussi sur la préférence au salé (moindre) par rapport à un régime synthétique.

Ainsi, nous avons pu mettre en évidence que le régime peut « fausser » les résultats d'une expérimentation ; par exemple ici, faire disparaître l'effet de la préférence au salé et de la moindre préférence au sucré.

Concernant le retentissement sur les organes, nous prévoyons d'étudier les modifications histologiques apportées par le régime riche en phyto-œstrogène. Ainsi il sera intéressant de savoir si ce régime joue lui aussi essentiellement sur les acini ou s'il intervient sur les

structures œstrogène-dépendantes que sont les GCT. De même il sera intéressant d'étudier l'expression des ARNm dans les glandes salivaires afin de préciser les effets agoniste, antagoniste ou différent par rapport au BPA.

Troisième partie : Discussion

Ce travail de thèse a servi à identifier l'action du Bisphénol A sur les préférences gustatives et la sphère buccale chez le rat adulte et de préciser la nature de ces effets.

Notre première étude identifie pour la première fois une action du BPA sur la sécheresse buccale et permet de corréliser une altération des sécrétions salivaires avec des modifications simultanées de préférences gustatives, en particulier au goût salé. De plus, elle a permis d'identifier un effet délétère du BPA sur la consommation d'eau.

La deuxième étude révèle qu'un régime contenant du soja, donc des phytoestrogènes, peut avoir des effets opposés (consommation d'eau et préférences au salé), identiques (sucré) ou encore totalement différents (gras) à ceux du BPA. Ces deux études permettent de voir que le BPA et les phyto-œstrogènes bien qu'étant des œstrogène-mimétiques, peuvent avoir des effets agonistes ou antagonistes en fonction de la cible biologique considérée, et qu'un régime à base de soja semble gommer la plupart des effets observés.

Les données de la littérature nous éclairent sur les mécanismes sous-jacents à nos observations et nous invitent à certaines perspectives d'extension de ce programme. Ce chapitre présente les différents éléments qui ont conduit notre réflexion.

1. Préférences gustatives

1.1. Préférence pour le gras et tissu adipeux

Lors de l'étude effet-dose BPA, nous avons constaté que les rats recevant une forte dose de BPA préféraient moins le gras. A contrario il n'a pas été trouvé d'effet régime (phyto-œstrogènes et notamment génisteine) sur la préférence pour le gras et l'effet mélange (BPA associé au régime A03 riche en phyto-œstrogènes) ne diminuait pas cette préférence de façon significative. Dans la littérature, une consommation plus faible de graisse est associée à une diminution du taux sérique d'œstradiol [381]. Il n'a pas encore été montré qu'une modification du taux d'œstrogène modifiait le comportement alimentaire vis-à-vis du gras. Par contre il est bien décrit une association entre taux d'œstrogène et diminution de la prise de poids [382]. Il est possible que le BPA ait un effet œstrogène-mimétique par diminution du taux de leptine entraînant une moindre consommation de gras comme cela a déjà été montré pour le Tamoxifen [383]. Il est aussi possible que cette préférence pour le gras ne soit pas d'origine endocrinienne car il n'a pas été constaté d'effet lors de l'utilisation d'un régime à base de phyto-œstrogènes sur cette préférence.

Si la relation entre taux d'œstrogène et préférence pour le gras n'est pas établie, il existe par contre un lien entre les hormones sexuelles et l'adiposité [384,385,386]. Nous n'avons pas étudié les tissus gras dans l'expérimentation effet-dose, et nous n'avons étudié que la graisse sous-cutanée dorsale dans l'étude sur les mélanges. Il a été montré que la consommation d'isoflavonoïdes diminuait la masse corporelle et celle du tissu adipeux [387]. Cette baisse de la masse grasse est probablement due à la capacité des isoflavonoïdes (génistéine) à inhiber la lipogénèse et à stimuler la lipolyse [388,389]. Cependant nos résultats ont montré qu'il n'y avait aucun effet du régime sur les préférences gustatives au gras quel que soit le régime suivi.

L'expérience a aussi montré que le BPA a des effets sur le métabolisme des rats en favorisant l'augmentation du poids du tissu adipeux d'animaux déjà soumis à un régime légèrement obésogène (L5) même si cela n'était statistiquement pas significatif. Cet effet pro-obésogène d'un régime BPA est confirmé dans la littérature [390,391]. Cependant nos résultats ont montré qu'en présence des phyto-œstrogènes (A03), les effets produits par le BPA sur la masse adipeuse ne s'observaient plus. On peut formuler l'hypothèse suivante les deux xeno-hormones suivent la même voie pour réguler le métabolisme et dans ce cas, les isoflavonoïdes auraient plus affinité pour cette voie ; ce qui paraît logique si on considère que les phyto-œstrogènes ont une affinité supérieure au BPA pour les ER.

1.2. Préférence au sucré et glycémie

Nos études identifient une action du BPA (et de façon non significative des phyto-œstrogènes) sur la préférence pour le goût sucré. On constate par ailleurs une absence d'addition des deux effets avec une préférence quasi identique entre les témoins (L5) et les animaux recevant le mélange BPA Phyto-œstrogènes.

Dans notre étude, les effets observés sur les préférences au sucré traduisent un effet de type œstrogénique ; plusieurs études expérimentales montrent l'influence d'œstrogènes de synthèse sur les préférences au sucré [148, 392]. Chez les rongeurs, une exposition chronique de ces œstrogènes de synthèse chez l'adulte provoque une diminution de la consommation de sucre [148] à l'image de ce qui est observé chez la femme pendant la phase œstrogénique du cycle menstruel ou pendant la gestation. Ce phénomène, s'il est plus accentué chez le mâle, traduit une féminisation du comportement alimentaire qui aplanit le dimorphisme sexuel des préférences gustatives. Par contre, lorsque l'exposition est réalisée pendant la période utérine, les jeunes nourrissons présentent une plus forte préférence au goût sucré [393], alors que cet

effet s'estompe à l'âge adulte [394]. Nos résultats identifient des effets du BPA (et dans une moindre mesure des phyto-œstrogènes) sur la préférence au goût sucré comparables à ceux de l'œstradiol lors d'une exposition adulte [392]. A l'inverse, l'exposition néonatale en BPA réalisée par Xu et son équipe [230] entraîne une surconsommation de « sucre » accentuée chez le mâle, à l'image de ce qui est observé avec d'autres produits œstrogéniques ou anti-androgéniques [395-397].

A côté de cette moindre préférence au goût sucré, une étude de la glycémie a été réalisée dans nos deux études. L'administration de BPA, de phyto-œstrogènes ou de leurs mélanges ne produit pas d'effet. Alors que la résistance périphérique à l'insuline est fréquente au cours de l'obésité et du vieillissement, la progression vers le diabète de type 2 est largement due à la perte de la masse des cellules β par apoptose. Il a été rapporté que la génisteine peut améliorer le contrôle glycémique et la fonction des cellules β chez des souris diabétiques insulino-dépendantes [398]. Chez la souris, la même équipe a montré qu'un apport alimentaire en génisteine pouvait empêcher le développement d'un diabète de type 2 par une action directe de protection des cellules β , et ne modifie pas la sensibilité périphérique à l'insuline [399]. A contrario, selon la littérature, il semble que le BPA ait un effet inverse. Le BPA produit une résistance à l'insuline et des altérations de la fonction des cellules β du pancréas. Il a été suggéré que conjointement à d'autres produits chimiques perturbateurs du système endocrinien, le BPA constitue un facteur de risque de diabète de type 2 mais aussi d'autres troubles métaboliques [400,401]. Cette hypothèse a été confirmée sur les cellules β du pancréas chez l'homme [402]. Nous n'avons pas mis en évidence de trouble de la glycémie mais peut être l'exposition n'a-t-elle pas été assez longue ou les concentrations inadaptées à montrer cet effet.

1.3. Préférence au salé et consommation d'eau

Notre étude effets-dose a identifié une induction de la sécheresse buccale consécutive à l'ingestion orale de BPA. Cette sécheresse buccale s'accompagne d'une action sur la préférence au goût salé et d'une modification des structures sécrétrices des glandes submandibulaires chez le rat mâle adulte. Par ailleurs, la prise de phyto-œstrogènes a entraîné une surconsommation d'eau avec une prépondérance de l'effet phyto-œstrogène dans le groupe soumis au mélange. Prises dans leur globalité, ces études sont en faveur d'action du

BPA et des phyto-œstrogènes sur l'homéostasie buccale conforme à un effet de type hormonal déjà décrit dans la littérature sur d'autres organes [403].

Selon les données de la littérature, le BPA est capable d'exercer des effets hormonaux en lien avec une perturbation de type œstrogénique ou anti-œstrogénique, mais aussi des effets anti-androgéniques et antithyroïdiens; il est également capable d'interagir avec les récepteurs aux glucocorticoïdes [404, 405]. Quant aux phyto-œstrogènes, il semble que la consommation d'isoflavonoïdes augmente de manière significative la prise de nourriture (en grammes mais pas en calories) et d'eau bien que les mêmes sujets présentent une diminution de la masse corporelle et du tissu adipeux [387].

Dans nos études le BPA conduit à une prise d'eau plus faible, associée à une préférence pour le salé et à une sécheresse buccale ; alors qu'on constate l'effet inverse avec les phyto-œstrogènes dont l'effet est prépondérant en cas de mélange. Les résultats obtenus avec le BPA pourraient s'expliquer par une déshydratation chronique ; alors qu'il pourrait s'agir d'un effet neurologique pour les phyto-œstrogènes [387].

Deux systèmes interviennent dans la déshydratation : le système rénine-angiotensine-aldostérone et le système vasopressine. Le système rénine-angiotensine-aldostérone est en partie sous la dépendance des œstrogènes ; les œstrogènes entraînant une diminution de la sécrétion d'angiotensine II, une augmentation de la rénine et de l'angiotensine I. La conséquence de cet apport en œstrogènes peut être une absence de sensation de soif conduisant à une baisse des apports hydriques [31]. Nous n'avons cependant pas retenu cette hypothèse car si ce système était concerné il devrait y avoir une moindre préférence pour le goût salé.

Il a été démontré que les œstrogènes, par l'intermédiaire de leurs récepteurs bêta au niveau des noyaux supra-optiques et paraventriculaires, pouvaient être responsables d'une augmentation de vasopressine favorisant alors une rétention hydrique permettant de diminuer l'ingestion d'eau [406]. Cette augmentation du taux de vasopressine serait due à un abaissement du seuil osmotique de déclenchement de la vasopressine [407]. Ce phénomène pourrait également intervenir dans l'absence de sensation de soif comme c'est le cas chez la personne âgée. Ainsi la déshydratation relative de nos rats expliquerait leur « préférence » pour le goût salé lors du test gustatif. Nos résultats suggèrent donc que le BPA puisse avoir un effet sur la sensation de soif via un effet de type œstrogène-mimétique.

Devant la modification de la préférence pour le goût salé et la sécheresse buccale pourrait être évoqué un dysfonctionnement salivaire. Deux réflexions vont dans ce sens.

- Nous avons constaté une moindre expression du récepteur muscarinique dans les glandes submandibulaires des rats exposés au BPA. Il a été signalé que la stimulation des *chrn3* pouvait permettre d'augmenter l'Aquaporin (PAQ), une protéine impliquée dans le transport rapide de l'eau à travers la membrane cellulaire, et qui joue également un rôle dans la sécrétion salivaire [408]. Cette protéine est diminuée en cas de syndrome de Gougerot-Sjögren où il est évoqué la présence d'anticorps anti-*chrn3* [409]. Lors de ce syndrome, l'entretien des cellules acineuses est altéré, et il existe également de faibles niveaux d'androgènes sériques et salivaires [410]. Nous savons que le BPA est un oestrogénomimétique mais également un anti-androgène. La baisse du taux du récepteur muscarinique ne paraît donc pas illogique et pourrait participer à la diminution de la filtration de l'eau à travers les cellules canalaire et acineuses et ainsi expliquer la bouche sèche de nos rats.

- Nous avons constaté lors de la dissection de nos rats une diminution des sécrétions de salive (frottis buccaux secs), chez les animaux traités. Celle-ci est susceptible d'entraîner une modification de la concentration en électrolytes par rapport aux témoins. Or, il a été montré que la préférence pour le goût salé était aussi sous la dépendance de la concentration en sodium de la salive [157] et qu'une plus grande concentration salivaire en sel entraînait une moins grande sensibilité au goût salé. On sait que les traitements hormonaux peuvent modifier le seuil de détection au salé : Curtis *et al* ont montré sur des rates ovariectomisées et recevant un traitement de substitution que ces dernières avaient un seuil de détection du goût salé supérieur à celles ne recevant pas de traitement substitutif [148,411].

L'effet du BPA ou des phyto-œstrogènes sur les glandes salivaires et leur sécrétion pourrait donc être aussi incriminé.

2. Effets du BPA sur les glandes salivaires

L'étude effets-dose réalisée chez le rat nous a permis de constater une absence d'effet sur les structures GCT mais une modification de la taille et du nombre des acini. Cet effet est probablement moins marqué sur les glandes sublinguales car les surfaces d'acini n'ont pas été modifiées, alors que nous avons constaté dans notre étude qu'il y avait moins d'acini dans les glandes submandibulaires et parotides, mais qu'ils étaient plus grands.

Nous avons vu que les glandes salivaires étaient des glandes sensibles aux hormones sexuelles lors de la première partie. Concernant les récepteurs hormonaux dans la glande submandibulaire, notre étude a mis en évidence une courbe sinusoïdale avec une moindre expression pour le 5mg. Il a été démontré que les ER β étaient plus exprimés dans les tissus salivaires tumoraux, qu'il s'agisse de tumeurs bénignes comme l'adénome pleiomorphe [412] ou malignes comme le carcinome adénoïde kystique [413]. Ainsi, la surexpression de l'ER β pourrait faciliter la croissance des tumeurs salivaires et certains auteurs évoquent la possibilité de traitements anti-œstrogéniques pour lutter contre la prolifération tumorale [412,413]. On retrouve également un effet pro-tumoral de la progestérone [414] et il semble également que les récepteurs aux androgènes soient essentiellement trouvés dans les tumeurs salivaires de haut grade [415]. Dans la littérature il n'y a pas d'étude sur la relation entre le BPA et les cancers des glandes salivaires mais, il pourrait être intéressant de doser les xénohormones sanguines et salivaires et notamment le BPA afin de voir s'il existe ou pas un lien de causalité. En effet, nos études permettent de penser qu'en agissant notamment au niveau des récepteurs hormonaux de l'œstrogène, le BPA modifie l'histologie et le fonctionnement de la glande salivaire.

Chez le rongeur, les GCT sont des structures sécrétrices particulièrement sensibles aux hormones sexuelles [416]. Celles-ci induisent une hypertrophie structurale et stimulent la sécrétion notamment des facteurs de croissance EGF [417], NGF, TGF dont on sait qu'ils sont impliqués dans le maintien de l'épithélium buccal [418] et de l'intégrité des bourgeons gustatifs [35]. Il en est de même des acini séreux, qui sont surtout responsables des sécrétions exocrines des protéines salivaires [419].

Les rongeurs présentent un dimorphisme très prononcé des glandes salivaires, comme la plupart de mammifères [420], qui traduit l'action des hormones stéroïdiennes dans la morphogénèse des glandes salivaires, mais aussi dans les processus sécrétoires. Ainsi, la synthèse de polypeptides (comme l'EGF et le NGF) par les GCT est essentiellement androgène-dépendante, même chez la femelle [50,421,422], tandis que le flux salivaire est aussi régulé par les œstrogènes [66,81].

Dans notre étude, l'exposition au BPA affecte peu la morphométrie des GCT, même à forte dose, expliquant probablement le faible retentissement sur l'épithélium buccal. A l'inverse, elle induit une hypertrophie significative des acini. Cet effet significatif qui apparaît dès la

plus faible dose tout comme la sécheresse buccale, laisse penser qu'une modification histologique des glandes parotides et submandibulaires est associée à une modification qualitative et/ou quantitative de la salive, et que ces effets sont déjà maxima aux plus faibles doses d'exposition utilisées dans notre étude.

Or, nous avons vu que l'amylase et la gustine étaient principalement sécrétés par les acini. Leur expression dans la glande submandibulaire a été modifiée.

- L'amylase salivaire participe notamment à la dégradation de l'amidon (de l'amylose et de l'amylopectine) pour donner des sucres disaccharidiques (comme le maltose). L'amylase de la salive peut donc donner un goût sucré (dû à l'apparition de disaccharides) à des aliments qui ne le sont généralement pas (comme le riz qui comporte de l'amidon, au pouvoir sucrant très faible). La modification de son taux peut donc être responsable d'une modification du seuil de perception au sucré qui peut, peut-être, expliquer la moindre préférence au sucre dans notre étude. L'alpha amylase est essentiellement sous contrôle androgénique. Ainsi, il n'est pas illogique de penser qu'une molécule comme le BPA qui est également anti-androgénique soit responsable d'une baisse de l'expression de cette protéine.

- La gustine (ou anhydrase carbonique VI), protéine Zinc dépendante est impliquée dans la différenciation, la croissance et l'intégrité architecturale et fonctionnelle des papilles gustatives et de leurs récepteurs [423]. Dans notre étude son expression dans la glande submandibulaire a été soit égale soit supérieure à celle du témoin et inversement proportionnelle à l'expression des récepteurs AR et ER. Il peut paraître surprenant de constater que l'expression de son ARNm a augmenté alors que sa diminution dans la salive est associée à une diminution de la sécrétion salivaire et également à des modifications du goût [424]. Il a été démontré que les supergouteurs avec un seuil de détection de l'amer bas avaient plus de récepteurs à la gustine que les autres. Or la saccharine si elle a un goût sucrant bien supérieur au saccharose est également connue pour avoir un goût amer. Peut-être que la moindre préférence au goût sucré est la conséquence d'un seuil de détection de l'amer plus bas.

Ainsi, un effet du BPA sur les glandes salivaires et leur sécrétion pourrait expliquer l'effet du BPA sur les préférences gustatives.

Dans ce contexte le BPA pourrait, par modification des acini, augmenter le seuil de détection du salé expliquant une augmentation de consommation d'eau salée et donc de la préférence au goût salé et une diminution de la préférence au goût sucré.

3. **Épithélium buccal et BPA**

Nous avons constaté lors de l'étude effets-dose que les rats recevant du BPA avaient la bouche sèche... Nous pensions donc retrouver des anomalies de l'épithélium.

Nous avons constaté une variation de l'épaisseur de l'épithélium selon une courbe sinusoïdale ; la variation maximale étant centrée sur la dose de 5mg. Il existait à la fois à cette concentration un épithélium pavimenteux et une couche cornée plus épaisse. Deux explications sont possibles :

- soit il y a eu un biais de coupe des lames ce qui expliquerait que le rapport cc/cc+ce ne soit pas modifié dans les différents groupes.
- soit on est en présence d'un vrai effet BPA.

Nous savons que les œstrogènes sont responsables d'une maturation et d'une kératinisation de l'épithélium [425, 426] et qu'il existe essentiellement à ce niveau des récepteurs ER de type β [60] même si ce dernier est très difficile à mettre en évidence sur frottis. Nous n'avons malheureusement pas pu réaliser de frottis buccaux, ce qui ne permet pas de pouvoir conclure sur les modifications histologiques de l'épithélium.

Nos résultats concernant l'EGF sanguin sont peu concluants, par contre nous avons constaté une modification de son expression dans les glandes sublinguales (courbe en U inversé). Il existe des récepteurs à l'EGF dans l'épithélium buccal à proximité de la membrane basale. Leur position leur permet d'interagir avec le mésenchyme sous-jacent, pouvant peut être avoir un effet paracrine [427]. L'EGF est abondant dans la salive (environ 1 μg / ml), dans laquelle baigne en permanence la langue [428] ; il a un rôle important de maintien de l'intégrité de la papille fongiforme adulte [35]. L'EGF sanguin a lui un rôle prépondérant dans la survie, la prolifération et la différenciation cellulaire [429,430]. Il semble que les EGF endogènes (sanguin) et exogènes (salive) aient un effet, médié par les EGFR, différent sur le développement des papilles fongiformes. L'EGF endogène agit à maintenir l'intégrité de l'épithélium inter-papilles; l'EGF exogène diminue le nombre de papilles et favorise l'épithélium inter-papille [431]. Il pourrait donc y avoir un effet local sans modification du taux sanguin.

L'expression du NGF dans les glandes salivaires sublinguales et submandibulaires a été modifiée par le BPA avec une courbe en U inversée dans la glande sublinguale et une courbe sinusoïde pour la glande submandibulaire en rapport avec l'expression ER. Dans la littérature, il semble que le NGF favorise pendant l'embryogénèse la formation des papilles caliciformes et agirait en tant que facteur trophique local pour induire la croissance de fibre nerveuse et la différenciation des bourgeons du goût [432]. Il semble qu'à l'âge adulte chez la souris les cellules basales à proximité des bourgeons du goût contiennent du NGF afin de permettre le développement et le renouvellement des papilles caliciformes [433]. Enfin, il semble qu'une section nerveuse (nerf glossopharyngien) entraîne une baisse des récepteurs au NGF [434]. Le NGF intervenant surtout dans les papilles caliciformes nous aurions peut-être pu observer des modifications plus importantes pour l'amer. En tout état de cause il n'existe rien dans la littérature sur le goût du BPA. Le NGF qui est produit dans les glandes submandibulaires et sublinguales est sous la dépendance de l'œstradiol [63].

Groschl *et al* ont étudié l'influence de la leptine salivaire, sur la prolifération des kératinocytes humains, par voie orale et il a montré un rôle physiologique de la leptine salivaire comme facteur de croissance pour la prolifération des kératinocytes dans la cavité buccale de même que son influence sur la production de facteurs de croissance [435]. Il a été démontré *in vitro* que le BPA peut potentialiser l'effet de la leptine [436] sans qu'il y ait modification de son taux *in vivo* [437].

Ainsi, il serait intéressant de réaliser une étude immuno-histochimique de l'épithélium afin de savoir s'il existe une modification des récepteurs hormonaux ou des récepteurs aux facteurs de croissance. Il serait également intéressant d'étudier si le BPA, comme au niveau intestinal [340], modifie la perméabilité au niveau de l'épithélium buccal et peut jouer aussi sur l'inflammation locale.

4. Effets et réversibilité

Nous avons constaté qu'il existait une réversibilité des effets du BPA tant au niveau des préférences gustatives qu'au niveau de la glande submandibulaire (au niveau histologique et au niveau de l'expression des ARNm); la réversibilité étant partielle pour l'histologie des parotides. Il est admis que le BPA a une demi-vie de 5 heures [321]. Il ne paraît pas anormal qu'il y ait donc une disparition des effets gustatifs du BPA sachant que l'épithélium buccal spécialisé se renouvelle en 10 jours [106,107], s'il y a une altération des bourgeons celle-ci ne

devrait donc plus exister. La réversibilité mis en évidence sur l'histologie de la glande submandibulaire montre que les modifications histologiques observées étaient bien en rapport avec des modifications d'expression des récepteurs hormonaux laissant bien supposer la relation entre l'altération de la glande et l'exposition au BPA. La réversibilité n'a été que partielle au niveau de la glande parotide et nous n'avons pas étudié l'expression des ARNm dans cette glande. Il y a peu d'étude sur la durée de vie des cellules des glandes salivaires. Les données de la glande submandibulaire retrouve un renouvellement glandulaire en 62 jours [438], la durée de vie des cellules acineuses de la parotide du rat est elle de 200 jours[439]. De plus, il existe dans le renouvellement des épithéliums des glandes salivaires une maturation progressive des acini mais également des GCT. Il est donc possible qu'en plus d'une modification de l'histologie des glandes salivaires observée au microscope optique, il existe également une modification d'action des acini et GCT en fonction de leur maturation. Ces différents éléments nous permettent de penser qu'il n'est pas illogique de retrouver un effet partiel de l'exposition au BPA 45 jours après son arrêt sur les parotides et la disparition d'effets histologiques sur la glande submandibulaire.

5. Effets du mélange BPA/génistéine

Le BPA et la génistéine bien qu'étant 2 oestrogéno-mimétiques ont présenté des effets agonistes mais aussi antagonistes. Le mélange des 2 composants n'a pas forcément conduit à une addition des effets.

JL Coughlin *et al* [440] ont montré que le BPA in vitro que le BPA avait un effet antagoniste à celui de la génistéine.

Ceci semble être confirmé par la littérature. Il a été démontré que les phyto-œstrogènes peuvent modifier l'action du BPA. Par exemple Dolinoy DC *et al* [441] ont montré que l'exposition précoce du BPA pendant la gestation pouvait altérer de façon stable l'épigénome. Cet effet a pu être contrecarré par la prise de compléments alimentaires à base de phyto-œstrogènes par la mère. Il a également été démontré que le BPA pouvait chez l'adolescent être responsable d'un effet anxiogène et de modification du noyau amygdalien ; cet effet étant contrecarré par un régime alimentaire riche en génistéine [442]. Enfin, Vom Saal [228] a montré que les études ne retrouvant pas d'effets du BPA à faible doses avaient été réalisées avec un régime contenant des phyto-œstrogènes et donc un groupe controle non valable pour l'étude de perturbateurs endocriniens.

Nous confirmons par notre deuxième étude l'importance du rôle du régime alimentaire contenant des phyto-œstrogènes sur les effets possibles d'un perturbateur endocrinien comme

le BPA. Il serait intéressant de tester l'effet du BPA (à des doses inférieures à le DJA) dans des conditions « normales » d'exposition aux phyto-œstrogènes pour des populations européennes ou asiatiques ; ainsi on pourrait mieux évaluer le risque réel du BPA.

6. Conséquences dans le domaine médical

Selon les agences d'évaluation du risque [296], la voie orale est l'une des voies principales d'exposition au BPA pour la population. Chez l'adulte, l'exposition moyenne au BPA via l'alimentation serait voisine de 0,033 µg/kg de poids corporel /j [443]. Cette dose reste très inférieure à la dose journalière admissible établie pour l'homme (50 µg/kg/j). Cependant, selon les travaux de Joskow [305], la concentration salivaire en BPA est plus élevée chez les individus possédant des composites dentaires; elle varie selon la stabilité des composites dans des proportions allant de 5,5 à 110 µg/ml de salive. Par conséquent, les pansements dentaires et les consommables plastiques à usages médicaux ou alimentaires peuvent être une source d'exposition continue à de faibles doses de BPA qui, sur la base de notre étude chez le rat adulte, pourrait altérer l'homéostasie salivaire chez l'homme.

Il est cependant intéressant de noter qu'il existe une plasticité des glandes salivaires au moins partielle avec un retour à « la normale » sur l'expression des ARNm.

Cette étude soulève des questions quant à l'utilisation systématique des plastiques jetables dans les appareils médicaux et / ou l'emballage des aliments dans les établissements de santé, en particulier lorsque les personnes vulnérables sont concernés, comme les personnes âgées (exacerbation de la sécheresse buccale et disgeusie). Cependant, une enquête plus approfondie est nécessaire pour parvenir à une conclusion appropriée.

Quantième Partie : Conclusion

L'objectif de cette thèse était de mesurer chez le rat l'impact de xéno-hormones sur l'homéostasie buccale en s'intéressant principalement aux préférences gustatives et aux glandes salivaires.

Les molécules choisies ne l'ont pas été au hasard :

- . Le BPA par son implication dans l'alimentation mais aussi dans les matériaux dentaires et médicaux s'est révélé être une évidence pour l'ORL que je suis.
- . Quant aux phyto-œstrogènes, leur importance dans l'alimentation et dans les compléments alimentaires ne cesse de croître.

Nous avons prévu de réaliser cette thèse sur la personne âgée et de tester l'impact de la génisteine sur la sécrétion salivaire mais nos études bibliographiques et statistiques nous ont conduits à constater qu'en l'état actuel de nos connaissances nous ne pourrions pas avoir une cible facile à suivre pour évaluer cet effet. Nous nous sommes tout naturellement tourné vers le rat afin d'approfondir nos connaissances.

Nos résultats démontrent que les xéno-hormones modifient l'homéostasie buccale :

- . Le BPA et les phyto-œstrogènes, dans une moindre mesure, ont modifié les préférences gustatives pour le sucré, le salé et, pour le BPA, peut être aussi pour le gras.
- . Les modifications de l'homéostasie hydrique n'étaient pas attendues mais cela nous a permis de voir qu'il existait des liaisons entre l'homéostasie buccale et le fonctionnement neuronal par la régulation ER dépendante.
- . L'histologie et le fonctionnement des glandes salivaires ont été également modifiés de façon variable selon la glande salivaire concernée.
- . Un article sur les modifications de la préférence au goût salé et de la consommation en eau a été accepté dans la revue « The laryngoscope ».

L'étude effets-dose soulève la question de l'utilisation pertinente et systématique de consommables en plastiques à usages médicaux et/ou alimentaires dans les centres de soins, en particulier chez les personnes fragiles : personne âgée (aggravant la sécheresse buccale, les infections buccales et la dysgueusie), femme enceinte (exposition fœtale par concentration placentaire du BPA) ou petit enfant.

L'étude des mélanges BPA et phyto-oestrogènes nous permet cependant de constater que les phyto-œstrogènes peuvent modérer l'effet du BPA et qu'il faut donc tenir compte de la composition du régime donné lors de l'étude de perturbateurs endocriniens.

En tout état de cause si notre travail permet d'affirmer l'impact des xéno-hormones sur l'homéostasie buccale, il ne permet pas encore d'en connaître les mécanismes et l'implication neurologique centrale.

Une meilleure connaissance des effets sur le protéome salivaire des xéno-hormones nous permettrait d'avancer sur les possibilités de traitement de l'hyposialie qui se révèle être un vrai problème de santé publique.

A distance de ces études on pourrait envisager des développements chez l'homme :

. Reprendre l'étude des effets de la génisteine sur l'hyposialie de la personne âgée

.Elucider les modifications du comportement alimentaire avant et après mise d'appareils et de composites dentaires ;

.Mener une étude épidémiologique chez l'enfant hospitalisé de 0 à 2 ans qui est soumis à un taux de BPA plus élevé. Ceci permettrait de savoir si un un taux de BPA important peut modifier les préférences gustatives à long terme et peut être favoriser l'obésité.

Bibliographie

1. Vidailhet B, Robin O, Polo A et al. Salivation. *Encycl Méd Chir (Paris), Stomatologie et odontologie*, 22008 A05, 2000, 7.
2. Diaz-Arnold AM, Marek CA. The impact of saliva on patient care: A literature review. *J Prosthet Dent* 2002;88:337-343.
3. Deville De Periere D, Arancibia S. Aspects histophysiologiques et physiopathologiques de la sénescence des glandes sous-maxillaires. *Actual Odontostomatol* 1988 ; 163 : 603-617
4. Azerad J. Physiologie de la manducation. Edition Masson: Paris, 1992.
5. De Almeida Pdel V, Gregio AM, Machado MA, de Lima AA, Azevedo LR. Saliva composition and functions: a comprehensive review. *J Contemp Dent Pract* 2008;9:72-80.
6. Cohen IK, Schechter PJ, Henkin RI. Hypogeusia, anorexia, and altered zinc metabolism following thermal burn. *JAMA* 1973;223:914-916.
7. Laudenbach P. Glandes salivaires: notion fondamentales et exploration des glandes salivaires. *Encycl Méd Chir (Paris), Odontologie*, 22057A10, 1987a, 7.
8. Loty S, LotY C, Hue O. Les substituts salivaires. *Cah Prothèse* 1998; 101:19-26.
9. Tortora GJ, Grabowski SR. *Principes d'anatomie et de physiologie*. 3e ed. Bruxelles: De Boeck, 2001.
10. Mandel ID. Sialochemistry in diseases and clinical situations affecting salivary glands. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1980;12:321-366.
11. Mukherjee S, Ericsson Y. A radiometric method of studying the rate of phosphate precipitation in saliva and other fluids. *J Periodontal Res* 1968;3:36-47.
12. Odman ML. Influence de l'alimentation dans l'émergence de la lithiase salivaire. *Université de Genève*, 2005.
13. Dadoune JP, Hadjiisky P, Siffroi JP. *Histologie*. 2e ed. Paris: Médecine -science Flammarion, 2000:191-193.
14. Clements JA, Matheson BA, MacDonald RJ, Funder JW. Oestrogen administration and the expression of the kallikrein gene family in the rat submandibular gland. *J Steroid Biochem* 1990;35:55-60.
15. Mehansho H, Carlson DM. Induction of protein and glycoprotein synthesis in rat submandibular glands by isoproterenol. *J Biol Chem* 1983;258:6616-6620.
16. Kousvelari E, Tabak LA. Genetic regulation of salivary proteins in rodents. *Crit Rev Oral Biol Med* 1991;2:139-151.
17. Marchese S, Pes D, Scaloni A, Carbone V, Pelosi P. Lipocalins of boar salivary glands binding odours and pheromones. *Eur J Biochem* 1998;252:563-568.
18. Kock K, Blaker M, Schmale H. Postnatal development of von Ebner's glands: accumulation of a protein of the lipocalin superfamily in taste papillae of rat tongue. *Cell Tissue Res* 1992;267:313-320.
19. Fabian TK, Hermann P, Beck A, Fejerdy P, Fabian G. Salivary defense proteins: their network and role in innate and acquired oral immunity. *Int J Mol Sci* 2012;13:4295-4320.
20. Byyny RL, Orth DN, Cohen S. Radioimmunoassay of epidermal growth factor. *Endocrinology* 1972;90:1261-1266.
21. Arancibia S, Assenmecher I. Submaxillary glands in an endocrine context. *J Biol Buccale* 1985;Sep;13(3):185-203.
22. Mogi M, Matsuura S, Suzuki K et al. Differential expression of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor during postnatal development of rat submandibular gland. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;217:271-277.

23. Deville De Periere D. Contrôle neuro-endocrinien des glandes salivaires. *Tissus non minéralisés et milieu buccal*. Paris: Edition Masson, 1993:101-117.
24. Amerongen AV, Veerman EC. Saliva the defender of the oral cavity. *Oral Dis* 2002;8:12-22.
25. Parret J, Bobillon G, Lissac M. Milieu Buccal. *Encycl Méd Chir (Paris), Stomatologie*, 22008 A10, 1982,10.
26. Bardow A, Madsen J, Nauntofte B. The bicarbonate concentration in human saliva does not exceed the plasma level under normal physiological conditions. *Clin Oral Investig* 2000;4:245-253.
27. Shatzman AR, Henkin RI. Gustin concentration changes relative to salivary zinc and taste in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981;78:3867-3871.
28. Werner H, Katz J. The emerging role of the insulin-like growth factors in oral biology. *J Dent Res* 2004;83:832-836.
29. Sciubba JJ. Sjogren's syndrome: pathology, oral presentation, and dental management. *Compendium* 1994;15:1084, 1086, 1088 passim; quiz 1096.
30. Vissink A, Spijkervet FK, Van Nieuw Amerongen A. Aging and saliva: a review of the literature. *Spec Care Dentist* 1996;16:95-103.
31. Fitzsimons JT. Angiotensin, thirst, and sodium appetite. *Physiol Rev* 1998;78:583-686.
32. Matsuo R, Garrett JR, Proctor GB, Carpenter GH. Reflex secretion of proteins into submandibular saliva in conscious rats, before and after preganglionic sympathectomy. *J Physiol* 2000;527 Pt 1:175-184.
33. Li XJ, Snyder SH. Molecular cloning of Ebnerin, a von Ebner's gland protein associated with taste buds. *J Biol Chem* 1995;270:17674-17679.
34. Suzuki Y, Mizoguchi I, Uchida N. Detection of neurotrophic factors in taste buds by laser capture microdissection, immunohistochemistry, and in situ hybridization. *Arch Histol Cytol* 2007;70:117-126.
35. Morris-Wiman J, Segó R, Brinkley L, Dolce C. The effects of sialoadenectomy and exogenous EGF on taste bud morphology and maintenance. *Chem Senses* 2000;25:9-19.
36. Lazarus JH, Shepherd JB. The influence of parotin on serum calcium in rabbits. *Arch Oral Biol* 1969;14:87-90.
37. Tsutsumi O, Kurachi H, Oka T. A physiological role of epidermal growth factor in male reproductive function. *Science* 1986;233:975-977.
38. Rongo C. Epidermal growth factor and aging: a signaling molecule reveals a new eye opening function. *Aging (Albany NY)* 2011; 3:896-905.
39. Murphy RA, Saide JD, Blanchard MH, Young M. Nerve growth factor in mouse serum and saliva: role of the submandibular gland. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74:2330-2333.
40. Rougeot C, Rosinski-Chupin I, Mathison R, Rougeon F. Rodent submandibular gland peptide hormones and other biologically active peptides. *Peptides* 2000;21:443-455.
41. Mitsui R, Fujita-Yoshigaki J, Narita T et al. Maintenance of paracellular barrier function by insulin-like growth factor-I in submandibular gland cells. *Arch Oral Biol* 2010;55:963-969.
42. Kamina P. *Tête et cou: muscles, vaisseaux, nerfs et viscères*. Paris: Maloine, 1996.
43. Piette E, Reychler H. *Traité de pathologies buccales et maxillo-faciales*. Bruxelles: De Boeck, 1991.
44. Rouviere H. *Anatomie descriptive, topographique et fonctionnelle. Tomme 1. 14e ed.* Paris: Masson. 1997.
45. Putz R, Pabst R. *Atlas d'Anatomie humaine. Tome I: tête, cou, membre supérieur.* Sobotta Paris: Lavoisier, 1994.

46. Coudert JL, Parret J. Les troubles salivaires sécrétoires. *Inf Dent* 1983;6:469-474.
47. Maillet M, Chiarasini D, Lable S. *Histologie. 2e ed.* Piccin: Rome,2001:311-315.
48. André JM, Catala MG, Poirier J. « Appareil digestif, dans l'histologie : Organes, systèmes et appareils ». Cours . Cours PCM1-PCM2 - Université de Jussieu. 2007. Chapitre 1. <http://www.chups.jussieu.fr/polys/histo/histoP2/appdigest.html>.
49. Young JA, Van Lennep EW. Morphology and physiology of salivary myoepithelial cells. *Int Rev Physiol* 1977;12:105-125.
50. Barka T. Biologically active polypeptides in submandibular glands. *J Histochem Cytochem* 1980;28:836-859.
51. Mori M, Takai Y, Naito R, Hosaka M, Murase N. Immunohistochemical demonstration of epidermal growth factor and nerve growth factor in experimental carcinogenesis in the mouse submandibular gland. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1984;45:431-441.
52. Parret J, Bobillon G, Lissac M. Milieu buccal. *Encycl Méd Chir (Paris), stomatologie*, 22008 A05,1992,5.
53. Morrell JI, Gresik EW, Barka T. Autoradiographic localization of dihydrotestosterone binding in the major salivary glands and other androgen-responsive organs of the mouse. *J Histochem Cytochem* 1987;35:1053-1058.
54. Laine M, Blauer M, Ylikomi Tet al. Immunohistochemical demonstration of androgen receptors in human salivary glands. *Arch Oral Biol* 1993;38:299-302.
55. Vadlamudi RK, Balasenthil S, Sahin AA et al. Novel estrogen receptor coactivator PELP1/MNAR gene and ERbeta expression in salivary duct adenocarcinoma: potential therapeutic targets. *Hum Pathol* 2005;36:670-675.
56. Ohshiro K, Rayala SK, Williams MD, Kumar R, El-Naggar AK. Biological role of estrogen receptor beta in salivary gland adenocarcinoma cells. *Clin Cancer Res* 2006;12:5994-5999.
57. Williams MD, Roberts D, Blumenschein GR, Jr. et al. Differential expression of hormonal and growth factor receptors in salivary duct carcinomas: biologic significance and potential role in therapeutic stratification of patients. *Am J Surg Pathol* 2007;31:1645-1652.
58. Weinreb I, Seethala RR, Hunt JL, Chetty R, Dardick I, Perez-Ordóñez B. Intercalated duct lesions of salivary gland: a morphologic spectrum from hyperplasia to adenoma. *Am J Surg Pathol* 2009;33:1322-1329.
59. Ozono S, Onozuka M, Sato K, Ito Y. Immunohistochemical localization of estradiol, progesterone, and progesterone receptor in human salivary glands and salivary adenoid cystic carcinomas. *Cell Struct Funct* 1992;17:169-175.
60. Valimaa H, Savolainen S, Soukka T et al. Estrogen receptor-beta is the predominant estrogen receptor subtype in human oral epithelium and salivary glands. *J Endocrinol* 2004;180:55-62.
61. Gomez E, Ortiz V, Saint-Martin B, Boeck L, Diaz-Sanchez V, Bourges H. Hormonal regulation of the secretory IgA (sIgA) system: estradiol- and progesterone-induced changes in sIgA in parotid saliva along the menstrual cycle. *Am J Reprod Immunol* 1993;29:219-223.
62. Choi HJ, Chung YS, Kim HJ et al. Signal pathway of 17beta-estradiol-induced MUC5B expression in human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2009;40:168-178.
63. Kurabuchi S, Gresik EW. Ultrastructural study of hormonally responsive striated duct cells in the mouse sublingual gland. *Odontology* 2001;89:34-40.
64. Ship JA, Patton LL, Tylenda CA. An assessment of salivary function in healthy premenopausal and postmenopausal females. *J Gerontol* 1991;46:M11-15.

65. Hietala EL, Heikkinen J, Vaananen HK, Larmas M. Effect of postmenopausal estrogen treatment on some diagnostic salivary variables. *Ann N Y Acad Sci* 1993;694:286-288.
66. Laine M, Leimola-Virtanen R. Effect of hormone replacement therapy on salivary flow rate, buffer effect and pH on perimenopausal and postmenopausal women. *Arch Oral Biol* 1996;41:91-96.
67. Eliasson L, Carlen A, Laine M, Birkhed D. Minor gland and whole saliva in postmenopausal women using a low potency oestrogen (oestriol). *Arch Oral Biol* 2003;48:511-517.
68. Yalcin F, Gurgan S, Gurgan T. The effect of menopause, hormone replacement therapy (HRT), alendronate (ALN), and calcium supplements on saliva. *J Contemp Dent Pract* 2005;6:10-17.
69. Evio S, Tarkkila L, Sorsa T et al. Effects of alendronate and hormone replacement therapy, alone and in combination, on saliva, periodontal conditions and gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase-8 levels in women with osteoporosis. *Oral Dis* 2006;12:187-193.
70. Leimola-Virtanen R, Helenius H, Laine M. Hormone replacement therapy and some salivary antimicrobial factors in post- and perimenopausal women. *Maturitas* 1997;27:145-151.
71. Sewon L, Laine M, Karjalainen S, Leimola-Virtanen R, Hiidenkari T, Helenius H. The effect of hormone replacement therapy on salivary calcium concentrations in menopausal women. *Arch Oral Biol* 2000;45:201-206.
72. Konttinen YT, Stegaev V, Mackiewicz Z, Porola P, Hanninen A, Szodoray P. Salivary glands - "an unisex organ"? *Oral Dis* 2010;16:577-585.
73. Kurabuchi S, Gresik EW, Yao C, Hosoi K. Hypophysectomy and hormonal therapy modulate mK1-immunoreactive duct cells in the mice sublingual glands. *J Mol Histol* 2008;39:499-507.
74. Cabras T, Pisano E, Boi R et al. Age-dependent modifications of the human salivary secretory protein complex. *J Proteome Res* 2009;8:4126-4134.
75. Ostuni MA, Houssay AB, Tumilasci OR. Modulation by thyroid hormones of rat parotid amylase secretion stimulated by 5-hydroxytryptamine. *Eur J Oral Sci* 2003;111:492-496.
76. coudert JL, Lair JM, Metrop D et al. Xerostomie due aux médicaments sialoprives. *Encycl Méd Chir (Paris), Stomatologie et Odontologie*, 22057 B10,1992,3.
77. Moore PA, Guggenheimer J, Etzel KR, Weyant RJ, Orchard T. Type 1 diabetes mellitus, xerostomia, and salivary flow rates. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001;92:281-291.
78. Mata AD, Marques D, Rocha Set al. Effects of diabetes mellitus on salivary secretion and its composition in the human. *Mol Cell Biochem* 2004;261:137-142.
79. Pannunzio E, Amancio OM, Vitalle MS, Souza DN, Mendes FM, Nicolau J. Analysis of the stimulated whole saliva in overweight and obese school children. *Rev Assoc Med Bras* 2010;56:32-36.
80. Bray GA, Shimomura Y, Ohtake M, Walker P. Salivary gland weight and nerve growth factor in the genetically obese (ob/ob) mouse. *Endocrinology* 1982;110:47-50.
81. Laine M, Pienihakkinen K, Ojanotko-Harri A, Tenovuo J. Effects of low-dose oral contraceptives on female whole saliva. *Arch Oral Biol* 1991;36:549-552.
82. Ionescu O, Sonnet E, Roudaut N, Predine-Hug F, Kerlan V. [Oral manifestations of endocrine dysfunction]. *Ann Endocrinol (Paris)* 2004;65:459-465.
83. Meurman JH, Tarkkila L, Tiitinen A. The menopause and oral health. *Maturitas* 2009;63:56-62.

84. Kim SK, Allen ED. Structural and functional changes in salivary glands during aging. *Microsc Res Tech* 1994 ; 28 :243-253
85. Culp DJ, Richardson LA. Regulation of mucous acinar exocrine secretion with age. *J Dent Res* 1996 ; 75 : 575-580
86. Nebot D, Pellet B. Salive et sénescence. *Chir Dent Fr* 1997; 861:73-78.
87. Atkinson JC, Wu AJ. Salivary gland dysfunction: causes, symptoms, treatment. *J Am Dent Assoc* 1994;125:409-416.
88. Daniels TE, Fox PC. Salivary and oral components of Sjogren's syndrome. *Rheum Dis Clin North Am* 1992;18:571-589.
89. Escande JP. syndrome de Gougerot-Sjögren. *Expansion Scientifique Française*: Paris,1970.
90. Axell T. The oral mucosa as a mirror of general health or disease. *Scand J Dent Res* 1992;100:9-16.
91. Sciubba JJ, Mandel ID. Sjogren's syndrome. *Dent J* 1992;61:579-581.
92. Waal van-der I. Diseases of salivary glands including dry mouth and Sjögren's syndrome: diagnosis and treatment. *Springer Verlag*: Berlin, 1996.
93. Jacquemart P, Allain F. Alvéolite et bouche sèche. *Inf Dent* 1999;80:1343.
94. Schoendorff R, Millet C. Rétention en prothèse complète. *Encycl Méd Chir (Paris), Stomatologie*, 23325 B05, 1995,6.
95. Schoendorff R, Millet C. Insertion d'une prothèse complète. Conseils au patient et soins ultérieurs. *Encycl Méd Chir (Paris), Odontologie*,23325 G15, 1998,8.
96. Auriol MM et Le Charpentier Y. Histologie de la muqueuse buccale et des maxillaires. *Encycl Méd Chir (Paris), Stomatologie*, 22-007-M-10, 1998, 9 p.
97. Hill MW. Cell renewal in oral epithelia. In : Meyer J, Squier CA, Gerson SJ eds. *The structure and function of oral mucosa*. Oxford : Pergamon Press, 1984
98. Squier CA. Structure of normal mucosa. *Mackenzie IC, Dabelsteen E, Squier CA eds. Oral premalignancy. Proceedings of the first Down Symposium*. Iowa : University of Iowa Press, 1980
99. Squier CA, Johnson NW, Hackemann M. Structure and function of normal human oral mucosa. *Dolby HE ed. Oral mucosa in health and disease*. Oxford : Blackwell Scientific,1975
100. Ten Cate AR. Oral histology. *Development, structure and fonction (3rd ed)*. Saint-Louis : CV Mosby, 1989 : 341-381.
101. Cleaton Jones P. Surface characteristics of cells from different layers of keratinized and non keratinized oral epithelia. *J Periodont Res* 1975 ; 10 : 79-87
102. Dummet CO, Barends G. Oromucosal pigmentation: an updated literary review. *J Periodontol* 1971 ; 42 : 726
103. Rowden G. The Langerhans cell. *Crit Rev Immunol* 1981 ;3 : 95-100
104. Hashimoto K. Fine structure of Merkel cell in human oral mucosa. *J Invest Dermatol* 1972 ; 58 : 381
105. Purves D, Coquery JM. *Neurosciences* , Paris , Mason 2004, 359-367
106. Beidler LM, Stallman RL. Renewal of cells within taste buds. *J. Cell Biol.* 1965;27:263-272. .
107. Farbman AI. Renewal of taste bud cells in rat circumvallate papillae. *Cell Tissue Kinet.* 1980;13:349-357.
108. Nosrat CA, Blomlöf J, ElShamy WM, Ernfors P, Olson L. Lingual deficits in BDNF and NT3 mutant mice leading to gustatory and somatosensory disturbances, respectively. *Development*. 1997;124:1333-1342.
109. Roper SD. Cell communication in taste buds. *Cell Mol. Life Sci.* 2006; 63:1494-1500

110. Behrens M, Foerster S, Staehler F, Raguse JD, Meyerhof W. Gustatory expression pattern of the human TAS2R bitter receptor gene family reveals a heterogenous population of bitter responsive taste receptor cells. *J. Neurosci.* 2007;27:12630-12640.
111. Boughter JD, Pumplun DW, Yu C, Christy RC, Smith DV. Differential expression of alpha-gustducin in taste bud populations of the rat and hamster. *J. Neurosci.* 1997;17:2852-2858
112. Yang R, Tabata S, Crowley HH, Margolskee RF, Kinnamon JC. Ultrastructural localization of gustducin immunoreactivity in microvilli of type II taste cells in the rat. *J. Comp. Neurol.* 2000;425:139-151.
113. Ganong W. *physiologie médicale*. Bruxelles, 2005.
114. Mc Cormack DN, Clyburn VL, Pittman DW. Detection of free fatty acids following a conditioned taste aversion in rats. *PhysiolBehav* 2006 ; 87 : 582-94.
115. Kawai T, Fushiki T. Importance of lipolysis in oral cavity for orosensory detection of fat. *Am J Physiol* 2003 ; 285 : R447-R454.
116. Dany Gaillard, Patricia Passilly-Degrace, Fabienne Laugerette, Philippe Besnard. Sur la piste du « goût du gras » Oléagineux, Corps Gras, Lipides. *Nutrition - Santé*. 2006 Volume 13, Numéro 5, 309-14
117. Chandrashekar J, Kuhn C, Oka Y, Yarmolinsky et al. The cells and peripheral representation of sodium taste in mice. *Nature*. 2010 Mar 11;464(7286):297-301.
118. Purves D, Coquery JM. *Neurosciences* , Paris , Mason 2004, 359-367 2004.
119. King LE Jr, Gates RE, Stoscheck CM, Nanney LB. The EGF/TGF alpha receptor in skin. *J Invest Dermatol.* 1990 Jun;94(6 Suppl):164S-170S
120. Dominey AM, Wang XJ, King LE Jr, et al. Targeted overexpression of transforming growth factor alpha in the epidermis of transgenic mice elicits hyperplasia, hyperkeratosis, and spontaneous, squamous papillomas. *Cell Growth Differ.* 1993 Dec;4(12):1071-82.
121. Wahl M, Carpenter G. Selective phospholipase C activation. *Bioessays* 1991;13:107-113.
122. Sakai Y, Nelson KG, Snedeker S et al. Expression of epidermal growth factor in suprabasal cells of stratified squamous epithelia: implications for a role in differentiation. *Cell Growth Differ* 1994;5:527-535.
123. Kale AD, Mane DR, Shukla D. Expression of transforming growth factor beta and its correlation with lipodystrophy in oral submucous fibrosis: An immunohistochemical study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2012 Aug 28.
124. Martin B, Maudsley S, White CM, Egan JM. Hormones in the naso-oropharynx: endocrine modulation of taste and smell. *Trends Endocrinol Metab.* 2009 May;20(4):163-70.
125. Morris-Wiman J, Segó R, Brinkley L, Dolce C. The effects of sialoadenectomy and exogenous EGF on taste bud morphology and maintenance. *Chem Senses.* 2000 Feb;25(1):9-19.
126. Egan JM, Meneilly GS, Habener JF, Elahi D. Glucagon-like peptide-1 augments insulin-mediated glucose uptake in the obese state. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002;87:3768-3773
127. Drucker DJ. Enhancing the action of incretin hormones: a new way forward? *Endocrinology.* 2006;147:3171-3172
128. Shin YK, Martin B, Golden E et al. Modulation of taste sensitivity by GLP-1 signaling. *J. Neurochem.* 2008;106:455-463
129. Feng XH, Liu XM, Zhou LH, Wang J, Liu GD. Expression of glucagon-like peptide-1 in the taste buds of rat circumvallate papillae. *Acta. Histochem.* 2008;110:151-154

130. Martin B, Dotson CD, Shin YK et al. Modulation of taste sensitivity by GLP-1 signaling in taste buds. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2008
131. Said SI. Vasoactive intestinal peptide in the gut. Physiology and pathology. *Acta. Gastroenterol. Belg.* 1982;45:310–313
132. Herness MS. Vasoactive intestinal peptide-like immunoreactivity in rodent taste cells. *Neuroscience.* 1989;33:411–419
133. Witt M. Distribution of vasoactive intestinal peptide-like immunoreactivity in the taste organs of teleost fish and frog. *Histochemical J.* 1995;27:161–165
134. Kusakabe T, Matsuda H, Gono Y et al. Immunohistochemical localisation of regulatory neuropeptides in human circumvallate papillae. *J. Anat.* 1998;192:557–564
135. Shen T, Kaya N, Zhao FL, Lu SG, Cao Y, Herness S. et al. Co-expression patterns of the neuropeptides vasoactive intestinal peptide and cholecystokinin with the transduction molecules α -gustducin and T1R2 in rat taste receptor cells. *Neuroscience.* 2005;130:229–238
136. Zhao H, Simasko SM. Role of transient receptor potential channels in cholecystokinin-induced activation of cultured vagal afferent neurons. *Endocrinology* 2010;151:5237–5246.
137. Kawai K, Sugimoto K, Nakashima K, Miura H, Ninomiya Y. Leptin as a modulator of sweet taste sensitivities in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:11044-11049.
138. Kalra SP, Kalra PS. NPY: a novel on/off switch for control of appetite and reproduction. Michel MC, editor. Neuropeptide Y and related peptides. *Springer; Berlin, New York:* 2004. pp. 221–249
139. Zhao FI, et al. Expression, physiological action, and coexpression patterns of neuropeptide Y . Rat taste-bud cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2005;102:11100–11105
140. Zaletaeva TA, Kaniuka VK, Golovchanskii OV, Ershikova Iu E. [Specific variability in the number of cells with X-chromatin in short-term buccal epithelium cultures from women following exposure to hormones at different phases in their individual diurnal biorhythm]. *Biull Eksp Biol Med* 1978;86:374-378.
141. Ashcroft GS, Dodsworth J, van Boxtel E, et al T. Estrogen accelerates cutaneous wound healing associated with an increase in TGF-beta1 levels. *Nat. Med.* 1997;3:1209-1215
142. Ashcroft GS, Mills SJ. Androgen receptor-mediated inhibition of cutaneous wound healing. *J. Clin. Invest.* 2002;110:615-624.
143. Gilliver SC, Ashworth JJ, Ashcroft GS. The hormonal regulation of cutaneous wound healing. *Clin. Dermatol.* 2007;25:56-62
144. Gilliver SC, Ruckshanthi JPD, Hardman MJ, Zeef LAH, Ashcroft GS. 5 α -Dihydrotestosterone (DHT) retards wound closure by inhibiting re-epithelialization. *J Pathol.* 2009 Jan;217(1):73-82.
145. Engeland CG, Bosch JA, Cacioppo JT, Marucha PT. Mucosal wound healing: the roles of age and sex. *Arch. Surg.* 2006;141:1193-1197
146. Marucha PT, Engeland CG. Stress, neuroendocrine hormones, and wound healing: Human models. In: Ader R, editor. *Psychoneuroimmunology.* Elsevier Inc.; San Diego: 2007: 825-835.
147. Zalewski AA. Combined effects of testosterone and motor, sensory, or gustatory nerve reinnervation on the regeneration of taste buds. *Exp Neurol* 1969;24:285-297.
148. Curtis KS, Davis LM, Johnson AL, Therrien KL, Contreras RJ. Sex differences in behavioral taste responses to and ingestion of sucrose and NaCl solutions by rats. *Physiol Behav* 2004;80:657-664.

149. Curtis KS, Davis LM, Johnson AL, Therrien KL, Contreras RJ. Sex differences in behavioral taste responses to and ingestion of sucrose and NaCl solutions by rats. *Physiol Behav* 2004; 80: 657-64.
150. Leimola-Virtanen R, Salo T, Toikkanen S, Pulkkinen J, Syrjanen S. Expression of estrogen receptor (ER) in oral mucosa and salivary glands. *Maturitas* 2000;36:131-137.
151. Ashcroft GS, Ashworth JJ. Potential role of estrogens in wound healing. *Am J Clin Dermatol* 2003;4:737-743.
152. Ashcroft GS, Greenwell-Wild T, Horan MA, Wahl SM, Ferguson MW. Topical estrogen accelerates cutaneous wound healing in aged humans associated with an altered inflammatory response. *Am. J. Pathol.* 1999;155:1137-1146
153. Mascarenhas P, Gapski R, Al Shammari K, Wang HL. Influence of sex hormones on the periodontium. *J. Clin. Periodontol.* 2003;30:671-681.
154. Lee HG, Eun HC. Differences between fibroblasts cultured from oral mucosa and normal skin: implication to wound healing. *J. Dermatol. Sci.* 1999;21:176-182.
155. Szpaderska AM, Zuckerman JD, DiPietro LA. Differential injury responses in oral mucosal and cutaneous wounds. *J. Dent. Res.* 2003;82:621-626.
156. Heikkinen J. Hormone therapy: maximizing the benefits. *Gynecol. Endocrinol.* 2006;22:160-162.
157. Delwiche J, O'Mahony M. Changes in secreted salivary sodium are sufficient to alter salt taste sensitivity: use of signal detection measures with continuous monitoring of the oral environment. *Physiol Behav* 1996;59:605-611.
158. Kochli A, Tenenbaum-Rakover Y, Leshem M. Increased salt appetite in patients with congenital adrenal hyperplasia 21-hydroxylase deficiency. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005;288:R1673-1681.
159. Verma P, Mittal S, Ghildiyal A, Chaudhary L, Mahajan KK. Salt preference: age and sex related variability. *Indian J Physiol Pharmacol* 2007;51:91-95.
160. Frye CA, Demolar GL. Menstrual cycle and sex differences influence salt preference. *Physiol Behav* 1994;55:193-197.
161. Delilbasi C, Cehiz T, Akal UK, Yilmaz T. Evaluation of gustatory function in postmenopausal women. *Br Dent J* 2003;194:447-449; discussion 441.
162. Toyoshima K, Seta Y, Toyono T, Kataoka S. Immunohistochemical identification of cells expressing steroidogenic enzymes cytochrome P450_{scc} and P450 aromatase in taste buds of rat circumvallate papillae. *Arch Histol Cytol* 2007;70:215-224.
163. Hornstein OP, Schell H. Comparative study on the 3H-thymidine index of dorsal epidermis, buccal mucosa, and seminal vesicles in senile male rats. *Arch Dermatol Res* 1975;254:37-41.
164. Giglio T, Imro M, Filaci G, et al. Immune cell circulating subsets are affected by gonadal function. *Life Sci.* 1994;54:1305-1312.
165. Wichmann MW, Ayala A, Chaudry IH. Male sex steroids are responsible for depressing macrophage immune function after trauma-hemorrhage. *Am. J. Physiol.* 1997;273:C1335-C1340
166. Savita, Rai U. Sex steroid hormones modulate the activation of murine peritoneal macrophages: receptor mediated modulation. *Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 1998;119:199-204
167. Engeland CG, Sabzehei B, Marucha PT. Sex hormones and mucosal wound healing. *Brain Behav Immun* 2009;23:629-635.
168. Cannon JG. Adaptive interactions between cytokines and the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1998;856:234-242.
169. Cannon JG, Pierre BA. Gender differences in host defense mechanisms. *J. Psychiatr. Res.* 1997;31:99-113.

170. Dechaume M, Grellet M, Laudenbach P et al. *Precis de stomatologie 5e ed.* Paris: Masson, 1980.
171. Laudenbach P. Glandes salivaires: notions fondamentales et exploration des glandes salivaires. *Encycl Méd Chir (Paris), Stomatologie*, 22057 B10, 1987b,7.
172. Bonnefoy C. Les xerostomies: approche clinique et thérapeutique. *Actual Odontostomatol (Paris)* 1994;185:91-105.
173. Martel J, Gagnon J, Altération du goût d'origine médicamenteuse. *Pharmactuel* 2002 Vol. 35 No 3: 122-7
174. Cullen M, Leopold DA. Disorders of smell and taste. *Med Clin North Am* 1999; 83(1): 57-74.
175. Schiffman SS. Taste and smell in disease (first of two parts). *New Engl J Med* 1983; 308(21):1275-1279
176. Weiffenbach JM, Fox PC, Baum BJ. Taste and salivary function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83:6103-6106.
177. Kalmus H, Farnsworth D. Impairment and recovery of taste following irradiation of the oropharynx. *J Laryngol Otol* 1959;73:180-182.
178. Byyny RL, Orth DN, Cohen S, Doynne ES. Epidermal growth factor: effects of androgens and adrenergic agents. *Endocrinology* 1974;95:776-782.
179. Henkin RI. Drug-induced taste and smell disorders. *Drug safety* 1994; 11(5) : 318-77.
180. Ratrema M, Guy C, Nelva A, et al. Troubles du goût d'origine médicamenteuse: analyse de la Banque Nationale de Pharmacovigilance et revue de la littérature. *Thérapie* 2001; 56 : 41-50.
181. Ackerman BH, Ksbekar N. Disturbances of taste and smell induced by drugs. *Pharmacotherapy* 1997; 17(3) : 482-96.
182. Smith RG, Burtner AP. Oral side-effects of the most frequently prescribed drugs. *Special Care in Dentistry* 1994; 14(3): 96-102.
183. Atkinson JC, Travis WD, Pillemer SR, Bermudez D, Wolff A, Fox PC. Major salivary gland function in primary Sjogren's syndrome and its relationship to clinical features. *J Rheumatol* 1990;17:318-322.
184. Stephens LC, Ang KK, Schultheiss TE, King GK, Brock WA, Peters LJ. Target cell and mode of radiation injury in rhesus salivary glands. *Radiother Oncol* 1986;7:165-174.
185. Franzen L, Funegard U, Ericson T, Henriksson R. Parotid gland function during and following radiotherapy of malignancies in the head and neck. A consecutive study of salivary flow and patient discomfort. *Eur J Cancer* 1992;28:457-462.
186. Bornstein M, Buser D, Filippi A. [Concepts of prevention and therapy of radiation-induced side effects]. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 2001;111:962-977.
187. Ghezzi EM, Ship JA. Systemic diseases and their treatments in the elderly: impact on oral health. *J Public Health Dent*. 2000 Fall;60(4):289-96.
188. Fontijn-Tekamp FA, van 't Hof MA, Slagter AP, van Waas MA. The state of dentition in relation to nutrition in elderly Europeans in the SENECA Study of 1993. *Eur J Clin Nutr*. 1996 Jul;50 Suppl 2:S117-22.
189. Samnieng P, Ueno M, Shinada K, Zaitso T, Wright FA, Kawaguchi Y. Association of hyposalivation with oral function, nutrition and oral health in community-dwelling elderly Thai. *Community Dent Health*. 2012 Mar;29(1):117-23
190. Cowart BJ. Relationships between taste and smell across the adult life span. *Ann N Y Acad Sci* 1989;561:39-55.
191. Murphy C, Gilmore MM. Quality-specific effects of aging on the human taste system. *Percept Psychophys* 1989;45:121-128.

192. Cowart BJ, Yokomukai Y, Beauchamp GK. Bitter taste in aging: compound-specific decline in sensitivity. *Physiol Behav* 1994;56:1237-1241.
193. Weiffenbach JM, Baum BJ, Burghauer R. Taste thresholds: quality specific variation with human aging. *J Gerontol* 1982;37:372-377.
194. Cowart BJ, Young IM, Feldman RS, Lowry LD. Clinical disorders of smell and taste. *Occup Med* 1997;12:465-483.
195. Shin YK, Cong WN, Cai H et al. Age-related changes in mouse taste bud morphology, hormone expression, and taste responsiveness. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2011;67:336-344.
196. Hiller-Sturmhofel S, Bartke A. The endocrine system: an overview. *Alcohol Health Res World* 1998;22:153-164.
197. Nussey S, Whitehead S. *Endocrinology: An Integrated Approach*. Oxford: BIOS Scientific Publishers; 2001 .
198. Tortora GJ, Grabowski SR. *Principles of Anatomy and Physiology, De Boeck* . 2003.
199. Ritzen EM. Prenatal treatment of congenital adrenal hyperplasia: a commentary. *Trends Endocrinol Metab* 1998;9:293-295.
200. Akingbemi BT. Estrogen regulation of testicular function. *Reprod Biol Endocrinol* 2005;3:51.
201. Simpson ER. Biology of aromatase in the mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2000;5:251-258.
202. Graham JD, Clarke CL. Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr Rev* 1997;18:502-519.
203. McPhaul MJ, Young M. Complexities of androgen action. *J Am Acad Dermatol* 2001;45:S87-94.
204. Pelletier G, Luu-The V, Li S, Labrie F. Localization and estrogenic regulation of androgen receptor mRNA expression in the mouse uterus and vagina. *J Endocrinol* 2004;180:77-85.
205. Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K et al. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 1997;138:863-870.
206. Dahlman-Wright K, Cavailles V, Fuqua SA et al. International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen receptors. *Pharmacol Rev* 2006;58:773-781.
207. Pfaffl MW, Lange IG, Daxenberger A, Meyer HH. Tissue-specific expression pattern of estrogen receptors (ER): quantification of ER alpha and ER beta mRNA with real-time RT-PCR. *APMIS* 2001;109:345-355.
208. Gustafsson JA, Warner M. Estrogen receptor beta in the breast: role in estrogen responsiveness and development of breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2000;74:245-248.
209. Barkhem T, Carlsson B, Nilsson Y, Enmark E, Gustafsson J, Nilsson S. Differential response of estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta to partial estrogen agonists/antagonists. *Mol Pharmacol* 1998;54:105-112.
210. Kuiper GG, Gustafsson JA. The novel estrogen receptor-beta subtype: potential role in the cell- and promoter-specific actions of estrogens and anti-estrogens. *FEBS Lett* 1997;410:87-90.
211. Ramamoorthy S, Nawaz Z. E6-associated protein (E6-AP) is a dual function coactivator of steroid hormone receptors. *Nucl Recept Signal* 2008;6:e006.
212. Swedenborg E, Pongratz I, Gustafsson JA. Endocrine disruptors targeting ERbeta function. *Int J Androl*;33:288-297.

213. Booth C, Hargreaves DF, Hadfield JA, McGown AT, Potten CS. Isoflavones inhibit intestinal epithelial cell proliferation and induce apoptosis in vitro. *Br J Cancer* 1999;80:1550-1557.
214. Bourguet W, Germain P, Gronemeyer H. Nuclear receptor ligand-binding domains: three-dimensional structures, molecular interactions and pharmacological implications. *Trends Pharmacol Sci* 2000;21:381-388.
215. Baldi E, Luconi M, Muratori M, Marchiani S, Tamburrino L, Forti G. Nongenomic activation of spermatozoa by steroid hormones: facts and fictions. *Mol Cell Endocrinol* 2009;308:39-46.
216. Watson CS, Alyea RA, Jeng YJ, Kochukov MY. Nongenomic actions of low concentration estrogens and xenoestrogens on multiple tissues. *Mol Cell Endocrinol* 2007;274:1-7.
217. Dalu A, Haskell JF, Coward L, Lamartiniere CA. Genistein, a component of soy, inhibits the expression of the EGF and ErbB2/Neu receptors in the rat dorsolateral prostate. *Prostate* 1998;37:36-43.
218. Bjornstrom L, Sjoberg M. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol Endocrinol* 2005;19:833-842.
219. Uotinen N, Puustinen R, Pasanen S et al. Distribution of progesterone receptor in female mouse tissues. *Gen Comp Endocrinol* 1999;115:429-441.
220. Pelletier G, El-Alfy M. Immunocytochemical localization of estrogen receptors alpha and beta in the human reproductive organs. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:4835-4840.
221. Morrison AJ, Herrera RE, Heinsohn EC, Schiff R, Osborne CK. Dominant-negative nuclear receptor corepressor relieves transcriptional inhibition of retinoic acid receptor but does not alter the agonist/antagonist activities of the tamoxifen-bound estrogen receptor. *Mol Endocrinol* 2003;17:1543-1554.
222. Pang S, Cao JQ, Katz BH, Hayes CL, Sutter TR, Spink DC. Inductive and inhibitory effects of non-ortho-substituted polychlorinated biphenyls on estrogen metabolism and human cytochromes P450 1A1 and 1B1. *Biochem Pharmacol* 1999;58:29-38.
223. Makela S, Poutanen M, Lehtimaki J, Kostian ML, Santti R, Vihko R. Estrogen-specific 17 beta-hydroxysteroid oxidoreductase type 1 (E.C. 1.1.1.62) as a possible target for the action of phytoestrogens. *Proc Soc Exp Biol Med* 1995;208:51-59.
224. Gallo MA. History and scope of toxicology. *Klaassen CD, editor. Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons. 5th ed. New York: McGraw-Hill; 1996. pp. 3-10.*
225. White RH, Cote I, Zeise L et al. State-of-the-science workshop report: issues and approaches in low-dose-response extrapolation for environmental health risk assessment. *Environ Health Perspect* 2009;117:283-287.
226. Colborn T. <http://www.ourstolenfuture.org/consensus/wingspread1.htm>.
227. Soto AM, Sonnenschein C. Cell proliferation of estrogen-sensitive cells: the case for negative control. *Endocr Rev* 1987;8:44-52.
228. vom Saal FS, Welshons WV. Large effects from small exposures. II. The importance of positive controls in low-dose research on bisphenol A. *Environ Res* 2006;100:50-76.
229. Gupta C. Reproductive malformation of the male offspring following maternal exposure to estrogenic chemicals. *Proc Soc Exp Biol Med* 2000;224:61-68.
230. Xu X, Tan L, Himi T et al. Changed preference for sweet taste in adulthood induced by perinatal exposure to bisphenol A-A probable link to overweight and obesity. *Neurotoxicol Teratol* 2011;33:458-463.
231. Kouidhi W, Desmetz C, Nahdi A et al. In utero and lactational exposure to low-dose genistein-vinclozolin mixture affects the development and growth factor mRNA

- expression of the submandibular salivary gland in immature female rats. *Toxicol Pathol* 2012;40:593-604.
232. Barbier G. Rapport sur les perturbateurs endocriniens, le temps de la précaution, 2011.
233. Catherine Bennetau-Pelissero C. Phyto-oestrogènes et santé : bénéfiques et inconvénients. *Lettre scientifique IFN* n° 143 - avril 2010.
234. Afssaps. Sécurité et bénéfices des phyto-estrogènes apportés par l'alimentation - Recommandations, 2005.
235. Cornwell T, Cohick W, Raskin I. Dietary phytoestrogens and health. *Phytochemistry* 2004;65:995-1016.
236. Thompson LU, Boucher BA, Liu Z, Cotterchio M, Kreiger N. Phytoestrogen content of foods consumed in Canada, including isoflavones, lignans, and coumestrol. *Nutr Cancer* 2006;54:184-201.
237. Antignac J-P, Cariou R, Bizec B, F. A. New data regarding phytoestrogens content in bovine milk. *Food Chemistry*. 2004 sept;87(2):275-281. 2004.
238. Bemraw-Aouachria, N., Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (2004) Evaluation de l'apport en phyto-estrogènes dans la population française (données INCA 1999) OCA/NB/2004-141. *Maisons-Alfort, AFSSA-OCA*.
239. van Erp-Baart MA, Brants HA, Kiely M et al. Isoflavone intake in four different European countries: the VENUS approach. *Br J Nutr* 2003;89 Suppl 1:S25-30.
240. Setchell KD, Zimmer-Nechemias L, Cai J, Heubi JE. Isoflavone content of infant formulas and the metabolic fate of these phytoestrogens in early life. *Am J Clin Nutr* 1998;68:1453S-1461S.
241. Franke AA, Halm BM, Custer LJ, Tatsumura Y, Hebshi S. Isoflavones in breastfed infants after mothers consume soy. *Am J Clin Nutr* 2006;84:406-413.
242. de Kleijn MJ, van der Schouw YT, Wilson PW et al. Intake of dietary phytoestrogens is low in postmenopausal women in the United States: the Framingham study(1-4). *J Nutr* 2001;131:1826-1832.
243. Keinan BL, Peeters PH, Mulligan AA, Navarro C, Slimani N. Consumption of soy products among European consumers of a health-conscious diet. *IARC Sci Publ* 2002;156:109-112.
244. Linseisen J, Piller R, Hermann S, Chang-Claude J. Dietary phytoestrogen intake and premenopausal breast cancer risk in a German case-control study. *Int J Cancer* 2004;110:284-290.
245. Kim J, Kwon C. Estimated dietary isoflavone intake of Korean population based on National Nutrition Survey. *Nutr Res* 2001;21:947-953.
246. Dai Q, Shu XO, Jin F et al. Population-based case-control study of soyfood intake and breast cancer risk in Shanghai. *Br J Cancer* 2001;85:372-378.
247. Yamamoto S, Sobue T, Kobayashi M, Sasaki S, Tsugane S. Soy, isoflavones, and breast cancer risk in Japan. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:906-913.
248. Irvine CH, Shand N, Fitzpatrick MG, Alexander SL. Daily intake and urinary excretion of genistein and daidzein by infants fed soy- or dairy-based infant formulas. *Am J Clin Nutr* 1998;68:1462S-1465S.
249. Cao Y, Calafat AM, Doerge DR et al. Isoflavones in urine, saliva, and blood of infants: data from a pilot study on the estrogenic activity of soy formula. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 2009;19:223-234.
250. Manach C, Donovan JL. Pharmacokinetics and metabolism of dietary flavonoids in humans. *Free Radic Res* 2004;38:771-785.
251. de Cremoux P, This P, Leclercq G, Jacquot Y. Controversies concerning the use of phytoestrogens in menopause management: bioavailability and metabolism. *Maturitas* 2010;65:334-339.

252. Setchell KD. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. *Am J Clin Nutr* 1998;68:1333S-1346S.
253. Busby MG, Jeffcoat AR, Bloedon LT et al. Clinical characteristics and pharmacokinetics of purified soy isoflavones: single-dose administration to healthy men. *Am J Clin Nutr* 2002;75:126-136.
254. de Vargas BA, Bidone J, Oliveira LK, Koester LS, Bassani VL, Teixeira HF. Development of topical hydrogels containing genistein-loaded nanoemulsions. *J Biomed Nanotechnol* 2012;8:330-336.
255. Bartholomew RM, Ryan DS. Lack of mutagenicity of some phytoestrogens in the salmonella/mammalian microsome assay. *Mutat Res* 1980;78:317-321.
256. Anderson D, Dobrzynska MM, Basaran N. Effect of various genotoxins and reproductive toxins in human lymphocytes and sperm in the Comet assay. *Teratog Carcinog Mutagen* 1997;17:29-43.
257. Kulling SE, Rosenberg B, Jacobs E, Metzler M. The phytoestrogens coumestrol and genistein induce structural chromosomal aberrations in cultured human peripheral blood lymphocytes. *Arch Toxicol* 1999;73:50-54.
258. Lewis RW, Brooks N, Milburn GM, Soames A, Stone S, Hall M, Ashby J. The effects of the phytoestrogen genistein on the postnatal development of the rat. *Toxicol Sci.* 2003 Jan;71(1):74-83.
259. Messina M, McCaskill-Stevens W, Lampe JW. Addressing the soy and breast cancer relationship: review, commentary, and workshop proceedings. *J Natl Cancer Inst* 2006;98:1275-1284.
260. North K, Golding J. A maternal vegetarian diet in pregnancy is associated with hypospadias. The ALSPAC Study Team. Avon Longitudinal Study of Pregnancy and Childhood. *BJU Int* 2000;85:107-113.
261. Akre O, Boyd HA, Ahlgren M et al. Maternal and gestational risk factors for hypospadias. *Environ Health Perspect* 2008;116:1071-1076.
262. Rozman KK, Bhatia J, Calafat AM et al. NTP-CERHR expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of soy formula. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 2006;77:280-397.
263. Adgent MA, Daniels JL, Rogan WJ et al. Early-life soy exposure and age at menarche. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2012;26:163-175.
264. Kim J, Kim S, Huh K, Kim Y, Joung H, Park M. High serum isoflavone concentrations are associated with the risk of precocious puberty in Korean girls. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2011;75:831-835.
265. Fort P, Moses N, Fasano M, Goldberg T, Lifshitz F. Breast and soy-formula feedings in early infancy and the prevalence of autoimmune thyroid disease in children. *J Am Coll Nutr* 1990;9:164-167.
266. Awoniyi CA, Roberts D, Veeramachaneni DN, Hurst BS, Tucker KE, Schlaff WD. Reproductive sequelae in female rats after in utero and neonatal exposure to the phytoestrogen genistein. *Fertil Steril* 1998;70:440-447.
267. Kang KS, Che JH, Lee YS. Lack of adverse effects in the F1 offspring maternally exposed to genistein at human intake dose level. *Food Chem Toxicol* 2002;40:43-51.
268. Strom BL, Schinnar R, Ziegler EE et al. Exposure to soy-based formula in infancy and endocrinological and reproductive outcomes in young adulthood. *JAMA* 2001;286:807-814.
269. D'Aloisio AA, Baird DD, DeRoo LA, Sandler DP. Association of intrauterine and early-life exposures with diagnosis of uterine leiomyomata by 35 years of age in the Sister Study. *Environ Health Perspect* 2010;118:375-381.

270. Eustache F, Mondon F, Canivenc-Lavier MC et al. Chronic dietary exposure to a low-dose mixture of genistein and vinclozolin modifies the reproductive axis, testis transcriptome, and fertility. *Environ Health Perspect* 2009;117:1272-1279.
271. Fisch H, Ikeguchi EF, Goluboff ET. Worldwide variations in sperm counts. *Urology* 1996;48:909-911.
272. Chavarro JE, Toth TL, Sadio SM, Hauser R. Soy food and isoflavone intake in relation to semen quality parameters among men from an infertility clinic. *Hum Reprod* 2008;23:2584-2590.
273. Gao YH, Yamaguchi M. Suppressive effect of genistein on rat bone osteoclasts: involvement of protein kinase inhibition and protein tyrosine phosphatase activation. *Int J Mol Med* 2000;5:261-267.
274. Tham DM, Gardner CD, Haskell WL. Clinical review 97: Potential health benefits of dietary phytoestrogens: a review of the clinical, epidemiological, and mechanistic evidence. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:2223-2235.
275. Thompson LU, Robb P, Serraino M, Cheung F. Mammalian lignan production from various foods. *Nutr Cancer* 1991;16:43-52.
276. Wu AH, Wan P, Hankin J, Tseng CC, Yu MC, Pike MC. Adolescent and adult soy intake and risk of breast cancer in Asian-Americans. *Carcinogenesis* 2002;23:1491-1496.
277. Horn-Ross PL, John EM, Lee M et al. Phytoestrogen consumption and breast cancer risk in a multiethnic population: the Bay Area Breast Cancer Study. *Am J Epidemiol* 2001;154:434-441.
278. Fritz WA, Wang J, Eltoum IE, Lamartiniere CA. Dietary genistein down-regulates androgen and estrogen receptor expression in the rat prostate. *Mol Cell Endocrinol* 2002;186:89-99.
279. Hwang YW, Kim SY, Jee SH, Kim YN, Nam CM. Soy food consumption and risk of prostate cancer: a meta-analysis of observational studies. *Nutr Cancer* 2009;61:598-606.
280. Odum J, Tinwell H, Jones K et al. Effect of rodent diets on the sexual development of the rat. *Toxicol Sci* 2001;61:115-127.
281. McCarrison R. The goitrogenic action of soybean and ground-nut. *Indian J Med Res.* 1933, 21:179.
282. Bitto A, Polito F, Squadrito F et al. Genistein aglycone: a dual mode of action anti-osteoporotic soy isoflavone rebalancing bone turnover towards bone formation. *Curr Med Chem* 2010;17:3007-3018.
283. Wu J, Wang XX, Takasaki M, Ohta A, Higuchi M, Ishimi Y. Cooperative effects of exercise training and genistein administration on bone mass in ovariectomized mice. *J Bone Miner Res* 2001;16:1829-1836.
284. Ishimi Y, Arai N, Wang X et al. Difference in effective dosage of genistein on bone and uterus in ovariectomized mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;274:697-701.
285. Horiuchi T, Onouchi T, Takahashi M, Ito H, Orimo H. Effect of soy protein on bone metabolism in postmenopausal Japanese women. *Osteoporos Int* 2000;11:721-724.
286. Somekawa Y, Chiguchi M, Ishibashi T, Aso T. Soy intake related to menopausal symptoms, serum lipids, and bone mineral density in postmenopausal Japanese women. *Obstet Gynecol* 2001;97:109-115.
287. Ross PD, Huang C, Davis JW, Wasnich RD. Vertebral dimension measurements improve prediction of vertebral fracture incidence. *Bone* 1995;16:257S-262S.
288. Coxam V. Phyto-oestrogens and bone health. *Proc Nutr Soc* 2008;67:184-195.

289. Legette LL, Lee WH, Martin BR et al. Genistein, a phytoestrogen, improves total cholesterol, and Synergy, a prebiotic, improves calcium utilization, but there were no synergistic effects. *Menopause* 2011;18:923-931.
290. Ridges L, Sunderland R, Moerman K, Meyer B, Astheimer L, Howe P. Cholesterol lowering benefits of soy and linseed enriched foods. *Asia Pac J Clin Nutr* 2001;10:204-211.
291. Ling WH, Jones PJ. Dietary phytosterols: a review of metabolism, benefits and side effects. *Life Sci* 1995;57:195-206.
292. Hartley DE, Edwards JE, Spiller CE et al. The soya isoflavone content of rat diet can increase anxiety and stress hormone release in the male rat. *Psychopharmacology (Berl)* 2003;167:46-53.
293. Bang OY, Hong HS, Kim DH et al. Neuroprotective effect of genistein against beta amyloid-induced neurotoxicity. *Neurobiol Dis* 2004;16:21-28.
294. Flynn KM, Ferguson SA, Delclos KB, Newbold RR. Multigenerational exposure to dietary genistein has no severe effects on nursing behavior in rats. *Neurotoxicology* 2000;21:997-1001.
295. Ben-Jonathan N, Steinmetz R. Xenoestrogens: the emerging story of bisphenol a. *Trends Endocrinol. Metab.* 1998 avr;9(3):124-128.
296. EFSA. Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food on a request from the Commission related to 2,2-BIS(4-HYDROXYPHENYL)PROPANE (Bisphenol A) Question number EFSA-Q-2005-100. Adopted on 29 November 2006. *The EFSA Journal* 2006;428:1-75.
297. Matsumoto A, Kunugita N, Kitagawa K et al. Bisphenol A levels in human urine. *Environ Health Perspect* 2003;111:101-104.
298. Richter CA, Birnbaum LS, Farabollini F et al. In vivo effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. *Reprod Toxicol* 2007;24:199-224.
299. Belfroid A, van Velzen M, van der Horst B, Vethaak D. Occurrence of bisphenol A in surface water and uptake in fish: evaluation of field measurements. *Chemosphere* 2002;49:97-103.
300. Kang JH, Kondo F, Katayama Y. Human exposure to bisphenol A. *Toxicology* 2006;226:79-89.
301. Rudel RA, Brody JG, Spengler JD et al. Identification of selected hormonally active agents and animal mammary carcinogens in commercial and residential air and dust samples. *J Air Waste Manag Assoc* 2001;51:499-513.
302. Volkel W, Colnot T, Csanady GA, Filser JG, Dekant W. Metabolism and kinetics of bisphenol a in humans at low doses following oral administration. *Chem Res Toxicol* 2002;15:1281-1287.
303. Vandenberg LN, Hauser R, Marcus M, Olea N, Welshons WV. Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reprod Toxicol* 2007;24:139-177.
304. Olea N, Pulgar R, Perez P et al. Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. *Environ Health Perspect* 1996;104:298-305.
305. Joskow R, Barr DB, Barr JR, Calafat AM, Needham LL, Rubin C. Exposure to bisphenol A from bis-glycidyl dimethacrylate-based dental sealants. *J Am Dent Assoc* 2006;137:353-362.
306. Biedermann S, Tschudin P, Grob K. Transfer of bisphenol A from thermal printer paper to the skin. *Anal Bioanal Chem* 2010;398:571-576.
307. Zalko D, Jacques C, Duplan H, Bruel S, Perdu E. Viable skin efficiently absorbs and metabolizes bisphenol A. *Chemosphere* 2010;82:424-430.

308. Schonfelder G, Wittfoht W, Hopp H, Talsness CE, Paul M, Chahoud I. Parent bisphenol A accumulation in the human maternal-fetal-placental unit. *Environ Health Perspect* 2002;110:A703-707.
309. National Toxicology Program U.S. Department of Health and Human Services, NTP-CERHR Monograph on the Potential Human Reproductive and Developmental Effects of Bisphenol A. 2008, September, *NIH Publication* No. 08 - 5994.
310. Inoue K, Kato K, Yoshimura Y, Makino T, Nakazawa H. Determination of bisphenol A in human serum by high-performance liquid chromatography with multi-electrode electrochemical detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2000;749:17-23.
311. Ikezuki Y, Tsutsumi O, Takai Y, Kamei Y, Taketani Y. Determination of bisphenol A concentrations in human biological fluids reveals significant early prenatal exposure. *Hum Reprod* 2002;17:2839-2841.
312. Calafat AM, Ye X, Wong LY, Reidy JA, Needham LL. Exposure of the U.S. population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003-2004. *Environ Health Perspect* 2008;116:39-44.
313. Calafat AM, Weuve J, Ye X et al. Exposure to bisphenol A and other phenols in neonatal intensive care unit premature infants. *Environ Health Perspect* 2009;117:639-644.
314. Sun Y, Irie M, Kishikawa N, Wada M, Kuroda N, Nakashima K. Determination of bisphenol A in human breast milk by HPLC with column-switching and fluorescence detection. *Biomed Chromatogr* 2004;18:501-507.
315. Ye X, Kuklennyik Z, Needham LL, Calafat AM. Measuring environmental phenols and chlorinated organic chemicals in breast milk using automated on-line column-switching-high performance liquid chromatography-isotope dilution tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2006;831:110-115.
316. Engel SM, Levy B, Liu Z, Kaplan D, Wolff MS. Xenobiotic phenols in early pregnancy amniotic fluid. *Reprod Toxicol* 2006;21:110-112.
317. Arenholt-Bindslev D, Breinholt V, Preiss A, Schmalz G. Time-related bisphenol-A content and estrogenic activity in saliva samples collected in relation to placement of fissure sealants. *Clin Oral Investig* 1999;3:120-125.
318. Fung EY, Ewoldsen NO, St Germain HA, Jr. et al. Pharmacokinetics of bisphenol A released from a dental sealant. *J Am Dent Assoc* 2000;131:51-58.
319. Sasaki N, Okuda K, Kato T et al. Salivary bisphenol-A levels detected by ELISA after restoration with composite resin. *J Mater Sci Mater Med* 2005;16:297-300.
320. Zafra A, del Olmo M, Suarez B, Hontoria E, Navalon A, Vilchez JL. Gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of bisphenol A and its chlorinated derivatives in urban wastewater. *Water Res* 2003;37:735-742.
321. Report EURL. 4,4'-isopropylidenediphenol (Bisphenol A). (*ecb.jrc.it/esis/*). *ECB, ed.*, 2008.
322. Vom Saal FS. <http://endocrinedisruptors.missouri.edu/vomsaal/vomsaal.html>.
323. Naik P, Vijayalaxmi KK. Cytogenetic evaluation for genotoxicity of bisphenol-A in bone marrow cells of Swiss albino mice. *Mutat Res* 2009;676:106-112.
324. Audebert M, Dolo L, Perdu E, Cravedi JP, Zalko D. Use of the gammaH2AX assay for assessing the genotoxicity of bisphenol A and bisphenol F in human cell lines. *Arch Toxicol* 2011;85:1463-1473.
325. Wang L, Hao J, Hu J et al. Protective Effects of Ginsenosides against Bisphenol A-Induced Cytotoxicity in 15P-1 Sertoli Cells via Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 Signalling and Antioxidant Mechanisms. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2012;111:42-49.

326. Blasiak J, Synowiec E, Tarnawska J, Czarny P, Poplawski T, Reiter RJ. Dental methacrylates may exert genotoxic effects via the oxidative induction of DNA double strand breaks and the inhibition of their repair. *Mol Biol Rep* 2012;39:7487-7496.
327. Li YC, Kuan YH, Huang FM, Chang YC. The role of DNA damage and caspase activation in cytotoxicity and genotoxicity of macrophages induced by bisphenol-A-glycidyl dimethacrylate. *Int Endod J* 2012;45:499-507.
328. Kuan YH, Li YC, Huang FM, Chang YC. The upregulation of tumour necrosis factor- α and surface antigens expression on macrophages by bisphenol A-glycidyl-methacrylate. *Int Endod J* 2012;45:619-626.
329. Arossi GA, Dihl RR, Lehmann M, Cunha KS, Reguly ML, de Andrade HH. In vivo genotoxicity of dental bonding agents. *Mutagenesis* 2009;24:169-172.
330. Iso T, Watanabe T, Iwamoto T, Shimamoto A, Furuichi Y. DNA damage caused by bisphenol A and estradiol through estrogenic activity. *Biol Pharm Bull* 2006;29:206-210.
331. Zhou J, Zhu XS, Cai ZH. The impacts of bisphenol A (BPA) on abalone (*Haliotis diversicolor supertexta*) embryonic development. *Chemosphere* 2010;82:443-450.
332. Padmanabhan V, Sarma HN, Savabieasfahani M, Steckler TL, Veiga-Lopez A. Developmental reprogramming of reproductive and metabolic dysfunction in sheep: native steroids vs. environmental steroid receptor modulators. *Int J Androl* 2010;33:394-404.
333. Heimeier RA, Shi YB. Amphibian metamorphosis as a model for studying endocrine disruption on vertebrate development: effect of bisphenol A on thyroid hormone action. *Gen Comp Endocrinol* 2010;168:181-189.
334. Xi W, Lee CK, Yeung WS et al. Effect of perinatal and postnatal bisphenol A exposure to the regulatory circuits at the hypothalamus-pituitary-gonadal axis of CD-1 mice. *Reprod Toxicol* 2010;31:409-417.
335. Cardoso N, Pandolfi M, Ponzio O et al. Evidence to suggest glutamic acid involvement in Bisphenol A effect at the hypothalamic level in prepubertal male rats. *Neuro Endocrinol Lett* 2010;31:512-516.
336. Mendoza-Rodriguez CA, Garcia-Guzman M, Baranda-Avila N, Morimoto S, Perrot-Applanat M, Cerbon M. Administration of bisphenol A to dams during perinatal period modifies molecular and morphological reproductive parameters of the offspring. *Reprod Toxicol* 2010;31:177-183.
337. Rodriguez HA, Santambrosio N, Santamaria CG, Munoz-de-Toro M, Luque EH. Neonatal exposure to bisphenol A reduces the pool of primordial follicles in the rat ovary. *Reprod Toxicol* 2010;30:550-557.
338. Lawson C, Gieske M, Murdoch B et al. Gene expression in the fetal mouse ovary is altered by exposure to low doses of bisphenol A. *Biol Reprod* 2010;84:79-86.
339. Holladay SD, Xiao S, Diao H et al. Perinatal bisphenol A exposure in C57B6/129svj male mice: potential altered cytokine/chemokine production in adulthood. *Int J Environ Res Public Health* 2010;7:2845-2852.
340. Braniste V, Jouault A, Gaultier E. Impact of oral bisphenol A at reference doses on intestinal barrier function and sex differences after perinatal exposure in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Dec 14
341. Iwakura T, Iwafuchi M, Muraoka D et al. In vitro effects of bisphenol A on developing hypothalamic neurons. *Toxicology* 2010;272:52-58.
342. Matsuda S, Saika S, Amano K, Shimizu E, Sajiki J. Changes in brain monoamine levels in neonatal rats exposed to bisphenol A at low doses. *Chemosphere* 2009;78:894-906.

343. Poimenova A, Markaki E, Rahiotis C, Kittraki E. Corticosterone-regulated actions in the rat brain are affected by perinatal exposure to low dose of bisphenol A. *Neuroscience* 2010;167:741-749.
344. Martini M, Miceli D, Gotti S et al. Effects of perinatal administration of Bisphenol A on the neuronal nitric oxide synthase expressing system in the hypothalamus and limbic system of CD1 mice. *J Neuroendocrinol* 2010;22:1004-1012.
345. Kim K, Son TG, Park HR et al. Potencies of bisphenol A on the neuronal differentiation and hippocampal neurogenesis. *J Toxicol Environ Health A* 2009;72:1343-1351.
346. Betancourt AM, Eltoum IA, Desmond RA, Russo J, Lamartiniere CA. In utero exposure to bisphenol A shifts the window of susceptibility for mammary carcinogenesis in the rat. *Environ Health Perspect* 2010;118:1614-1619.
347. Grasselli F, Baratta L, Baioni L et al. Bisphenol A disrupts granulosa cell function. *Domest Anim Endocrinol* 2010;39:34-39.
348. Peretz J, Gupta RK, Singh J, Hernandez-Ochoa I, Flaws JA. Bisphenol A impairs follicle growth, inhibits steroidogenesis, and downregulates rate-limiting enzymes in the estradiol biosynthesis pathway. *Toxicol Sci* 2010;119:209-217.
349. Lemos MF, van Gestel CA, Soares AM. Reproductive toxicity of the endocrine disruptors vinclozolin and bisphenol A in the terrestrial isopod *Porcellio scaber* (Latreille, 1804). *Chemosphere* 2009;78:907-913.
350. Galloway T, Cipelli R, Guralnik J et al. Daily bisphenol A excretion and associations with sex hormone concentrations: results from the InCHIANTI adult population study. *Environ Health Perspect* 2010;118:1603-1608.
351. Mok-Lin E, Ehrlich S, Williams PL et al. Urinary bisphenol A concentrations and ovarian response among women undergoing IVF. *Int J Androl* 2009;33:385-393.
352. Cantonwine D, Meeker JD, Hu H et al. Bisphenol a exposure in Mexico City and risk of prematurity: a pilot nested case control study. *Environ Health* 2010;9:62.
353. Qiao L, Zheng L, Cai D. [Study on the levels of the bisphenol A, octylphenol, 4-nonylphenol in serum of precocious girls]. *Wei Sheng Yan Jiu* 2010;39:9-12.
354. Nakamura D, Yanagiba Y, Duan Z et al. Bisphenol A may cause testosterone reduction by adversely affecting both testis and pituitary systems similar to estradiol. *Toxicol Lett* 2010;194:16-25.
355. Wang Q, Zhao XF, Ji YL et al. Mitochondrial signaling pathway is also involved in bisphenol A induced germ cell apoptosis in testes. *Toxicol Lett* 2010;199:129-135.
356. Li DK, Zhou Z, Miao M et al. Urine bisphenol-A (BPA) level in relation to semen quality. *Fertil Steril* 2010;95:625-630 e621-624.
357. Xiao GB, Wang RY, Cai YZ, He GH, Zhou ZJ. [Effect of bisphenol A on semen quality of exposed workers: a pilot study]. *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi* 2009;27:741-743.
358. Meeker JD, Ehrlich S, Toth TL et al. Semen quality and sperm DNA damage in relation to urinary bisphenol A among men from an infertility clinic. *Reprod Toxicol* 2010;30:532-539.
359. Li D, Zhou Z, Qing D et al. Occupational exposure to bisphenol-A (BPA) and the risk of self-reported male sexual dysfunction. *Hum Reprod* 2009;25:519-527.
360. Mendiola J, Jorgensen N, Andersson AM et al. Are environmental levels of bisphenol a associated with reproductive function in fertile men? *Environ Health Perspect* 2010;118:1286-1291.
361. Meeker JD, Calafat AM, Hauser R. Urinary bisphenol A concentrations in relation to serum thyroid and reproductive hormone levels in men from an infertility clinic. *Environ Sci Technol* 2009;44:1458-1463.

362. Cavalieri EL, Rogan EG. Is bisphenol A a weak carcinogen like the natural estrogens and diethylstilbestrol? *IUBMB Life* 2010;62:746-751.
363. Fernandez SV, Russo J. Estrogen and xenoestrogens in breast cancer. *Toxicol Pathol* 2009;38:110-122.
364. Bolli A, Bulzomi P, Galluzzo P, Acconcia F, Marino M. Bisphenol A impairs estradiol-induced protective effects against DLD-1 colon cancer cell growth. *IUBMB Life*. 2010 Sep;62(9):684-7.
365. Zhu H, Zheng J, Xiao X et al. Environmental endocrine disruptors promote invasion and metastasis of SK-N-SH human neuroblastoma cells. *Oncol Rep* 2009;23:129-139.
366. Scoditti E, Massaro M, Carluccio MA, Distante A, Storelli C, De Caterina R. PPARgamma agonists inhibit angiogenesis by suppressing PKCalpha- and CREB-mediated COX-2 expression in the human endothelium. *Cardiovasc Res*;2009;86:302-310.
367. LaPensee EW, Ben-Jonathan N. Novel roles of prolactin and estrogens in breast cancer: resistance to chemotherapy. *Endocr Relat Cancer* 2010;17:R91-107.
368. Trentham-Dietz A, Sprague BL, Wang J, Hampton JM, Buist DSM, Aiello Bowles E. Phenol xenoestrogens and mammographic breast density. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2012 Mar;21(3):561-2. .
369. Jeng YJ, Kochukov M, Watson CS. Combinations of physiologic estrogens with xenoestrogens alter calcium and kinase responses, prolactin release, and membrane estrogen receptor trafficking in rat pituitary cells. *Environ Health* 2010;9:61.
370. Shankar A, Teppala S. Relationship between Urinary Bisphenol A Levels and Diabetes Mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011 Sep 28. .
371. Ning G, Bi Y, Wang T et al. Relationship of urinary bisphenol A concentration to risk for prevalent type 2 diabetes in Chinese adults: a cross-sectional analysis. *Ann Intern Med* 2011;155:368-374.
372. Shankar A, Teppala S. Urinary bisphenol A and hypertension in a multiethnic sample of US adults. *J Environ Public Health* 2012;;481641.
373. Melzer D, Osborne NJ, Henley WE et al. Urinary bisphenol A concentration and risk of future coronary artery disease in apparently healthy men and women. *Circulation* 2012;125:1482-1490.
374. Melzer D, Rice NE, Lewis C, Henley WE, Galloway TS. Association of urinary bisphenol a concentration with heart disease: evidence from NHANES 2003/06. *PLoS One* 2010;5:e8673.
375. Spanier AJ, Kahn RS, Kunselman AR et al. Prenatal exposure to bisphenol A and child wheeze from birth to 3 years of age. *Environ Health Perspect* 2012;120:916-920.
376. Wang KC, Lin YF, Qin CH, Chen TL, Chen CH. Bisphenol-A interferes with estradiol-mediated protection in osteoarthritic chondrocytes. *Toxicol Lett* 2010;198:127-133.
377. Clayton EM, Todd M, Dowd JB, Aiello AE. The impact of bisphenol A and triclosan on immune parameters in the U.S. population, NHANES 2003-2006. *Environ Health Perspect*;119:390-396.
378. Braun JM, Kalkbrenner AE, Calafat AM et al. Impact of early-life bisphenol A exposure on behavior and executive function in children. *Pediatrics* 2011;128:873-882.
379. Yolton K, Xu Y, Strauss D, Altaye M, Calafat AM, Khoury J. Prenatal exposure to bisphenol A and phthalates and infant neurobehavior. *Neurotoxicol Teratol* 2011;33:558-566.

380. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001;29:e45.
381. Bagga D, Ashley JM, Geffrey SP, Wang HJ, Barnard RJ, Korenman S, Heber D. Effects of a very low fat, high fiber diet on serum hormones and menstrual function. Implications for breast cancer prevention. *Cancer*. 1995 Dec 15;76(12):2491-6.
382. Bautista CJ, Martínez-Samayoá PM, Zambrano E. Sex steroids regulation of appetitive behavior. *Mini Rev Med Chem*. 2012 Jul 18
383. Hozumi Y, Hakamata Y, Nagai H. Plasma leptin concentration in tamoxifen-treated ovariectomized rats. *Gynecol Obstet Invest* 2005;59:70-74.
384. Mammi C, Calanchini M, Antelmi A, Cinti F, Rosano GM, Lenzi A, Caprio M, Fabbri A. Androgens and adipose tissue in males: a complex and reciprocal interplay. *Int J Endocrinol*.;2012:789653.
385. Yonezawa R, Wada T, Matsumoto N et al. Central versus peripheral impact of estradiol on the impaired glucose metabolism in ovariectomized mice on a high-fat diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab*.2012
386. Xu J, Xiang Q, Lin G et al. Estrogen improved metabolic syndrome through down-regulation of VEGF and HIF-1alpha to inhibit hypoxia of periaortic and intra-abdominal fat in ovariectomized female rats. *Mol Biol Rep* 2012;39:8177-8185.
387. Lephart ED, West TW, Weber KS et al. Neurobehavioral effects of dietary soy phytoestrogens. *Neurotoxicol Teratol* 2002;24:5-16.
388. Szkudelska K, Nogowski L, Szkudelski T. Genistein affects lipogenesis and lipolysis in isolated rat adipocytes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2000;75:265-271.
389. Naaz A, Yellayi S, Zakroczymski MA et al. The soy isoflavone genistein decreases adipose deposition in mice. *Endocrinology* 2003;144:3315-3320.
390. Nunez AA, Kannan K, Giesy JP, Fang J, Clemens LG. Effects of bisphenol A on energy balance and accumulation in brown adipose tissue in rats. *Chemosphere* 2001;42:917-922.
391. Rubin BS, Murray MK, Damassa DA, King JC, Soto AM. Perinatal exposure to low doses of bisphenol A affects body weight, patterns of estrous cyclicity, and plasma LH levels. *Environ Health Perspect* 2001;109:675-680.
392. Curtis KS, Stratford JM, Contreras RJ. Estrogen increases the taste threshold for sucrose in rats. *Physiol Behav* 2005;86:281-286.
393. Hany J, Lilienthal H, Sarasin A et al. Developmental exposure of rats to a reconstituted PCB mixture or aroclor 1254: effects on organ weights, aromatase activity, sex hormone levels, and sweet preference behavior. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999;158:231-243.
394. Ferguson SA, Delclos KB, Newbold RR, Flynn KM. Dietary ethinyl estradiol exposure during development causes increased voluntary sodium intake and mild maternal and offspring toxicity in rats. *Neurotoxicol Teratol* 2003;25:491-501.
395. Ferguson SA, Flynn KM, Delclos KB, Newbold RR. Maternal and offspring toxicity but few sexually dimorphic behavioral alterations result from nonylphenol exposure. *Neurotoxicol Teratol* 2000;22:583-591.
396. Flynn KM, Delclos KB, Newbold RR, Ferguson SA. Behavioral responses of rats exposed to long-term dietary vinclozolin. *J Agric Food Chem* 2001;49:1658-1665.
397. Vinggaard AM, Christiansen S, Laier P et al. Perinatal exposure to the fungicide prochloraz feminizes the male rat offspring. *Toxicol Sci* 2005;85:886-897.
398. Vinggaard AM, Christiansen S, Laier P, Poulsen ME, Breinholt V, et al. Perinatal exposure to the fungicide prochloraz feminizes the male rat offspring. *Toxicol Sci* 2005; 85: 886-97.

399. Fu Z, Gilbert ER, Pfeiffer L, Zhang Y, Fu Y, Liu D. Genistein ameliorates hyperglycemia in a mouse model of nongenetic type 2 diabetes. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2012 Jun;37(3):480-8.
400. Neel BA, Sargis RM. The paradox of progress: environmental disruption of metabolism and the diabetes epidemic. *Diabetes* 2011;60:1838-1848.
401. Hectors TL, Vanparys C, van der Ven K et al. Environmental pollutants and type 2 diabetes: a review of mechanisms that can disrupt beta cell function. *Diabetologia* 2011;54:1273-1290.
402. Soriano S, Alonso-Magdalena P, Garcia-Arevalo M et al. Rapid insulinotropic action of low doses of bisphenol-A on mouse and human islets of Langerhans: role of estrogen receptor beta. *PLoS One* 2012;7:e31109.
403. Kang YG, Kim JY, Kim J, Won PJ, Nam JH. Release of bisphenol A from resin composite used to bond orthodontic lingual retainers. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2011;140:779-789.
404. Stroheker T, Chagnon MC, Pinnert MF, Berges R, Canivenc-Lavier MC. Estrogenic effects of food wrap packaging xenoestrogens and flavonoids in female Wistar rats: a comparative study. *Reprod Toxicol* 2003;17:421-432.
405. Rubin BS. Bisphenol A: an endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2011;127:27-34.
406. Grassi D, Amorim MA, Garcia-Segura LM, Panzica G. Estrogen receptor alpha is involved in the estrogenic regulation of arginine vasopressin immunoreactivity in the supraoptic and paraventricular nuclei of ovariectomized rats. *Neurosci Lett* 2010;474:135-139.
407. Stachenfeld NS, Taylor HS. Sex hormone effects on body fluid and sodium regulation in women with and without exercise-associated hyponatremia. *J Appl Physiol* 2009;107:864-872.
408. Ishikawa Y, Skowronski MT, Ishida H. Persistent increase in the amount of aquaporin-5 in the apical plasma membrane of rat parotid acinar cells induced by a muscarinic agonist SNI-2011. *FEBS Lett* 2000;477:253-257.
409. Bacman S, Sterin-Borda L, Camusso JJ, Arana R, Hubscher O, Borda E. Circulating antibodies against rat parotid gland M3 muscarinic receptors in primary Sjogren's syndrome. *Clin Exp Immunol* 1996;104:454-459.
410. Porola P, Laine M, Virtanen I, Pollanen R, Przybyla BD, Kontinen YT. Androgens and integrins in salivary glands in Sjogren's syndrome. *J Rheumatol* 2010;37:1181-1187.
411. Curtis KS, Contreras RJ. Sex differences in electrophysiological and behavioral responses to NaCl taste. *Behav Neurosci* 2006;120:917-924.
412. Wong MH, Dobbins TA, Tseung J et al. Oestrogen receptor beta expression in pleomorphic adenomas of the parotid gland. *J Clin Pathol* 2009;62:789-793.
413. Marques YM, Giudice FS, Freitas VM et al. Oestrogen receptor beta in adenoid cystic carcinoma of salivary glands. *Histopathology* 2012;60:609-616.
414. Barrera JE, Shroyer KR, Said S et al. Estrogen and progesterone receptor and p53 gene expression in adenoid cystic cancer. *Head Neck Pathol* 2008;2:13-18.
415. Sygut D, Bien S, Ziolkowska M, Sporny S. Immunohistochemical expression of androgen receptor in salivary gland cancers. *Pol J Pathol* 2008;59:205-210.
416. Gresik EW, Hosoi K, Kurihara K, Maruyama S, Ueha T. The rodent granular convoluted tubule cell--an update. *Eur J Morphol* 1996;34:221-224.
417. Gresik EW, Wenk-Salamone K, Onetti-Muda A, Gubits RM, Shaw PA. Effect of advanced age on the induction by androgen or thyroid hormone of epidermal growth

- factor and epidermal growth factor mRNA in the submandibular glands of C57BL/6 male mice. *Mech Ageing Dev* 1986;34:175-189.
418. Egea JC, Hirtz C, Valcarcel J, Deville De Periere D. [Epidermal growth factor: a probable oral and digestive health protector]. *Pathol Biol (Paris)* 2002;50:608-612.
 419. Sawada K, Noumura T. Effects of castration and sex steroids on sexually dimorphic development of the mouse submandibular gland. *Acta Anat (Basel)* 1991;140:97-103.
 420. Jayasinghe NR, Cope GH, Jacob S. Morphometric studies on the development and sexual dimorphism of the submandibular gland of the mouse. *J Anat* 1990;172:115-127.
 421. Gresik EW, Barka T. Precocious development of granular convoluted tubules in the mouse submandibular gland induced by thyroxine or by thyroxine and testosterone. *Am J Anat* 1980;159:177-185.
 422. Barthe PL, Bullock LP, Mowszowicz I, Bardin CW, Orth DN. Submaxillary gland epidermal growth factor: a sensitive index of biologic androgen activity. *Endocrinology* 1974;95:1019-1025.
 423. Calo C, Padiglia A, Zonza A et al. Polymorphisms in TAS2R38 and the taste bud trophic factor, gustin gene co-operate in modulating PROP taste phenotype. *Physiol Behav* 2011;104:1065-1071.
 424. Henkin RI, Martin BM, Agarwal RP. Decreased parotid saliva gustin/carbonic anhydrase VI secretion: an enzyme disorder manifested by gustatory and olfactory dysfunction. *Am J Med Sci* 1999;318:380-391.
 425. Leimola-Virtanen R, Pennanen R, Syrjanen K, Syrjanen S. Estrogen response in buccal mucosa -- a cytological and immunohistological assay. *Maturitas* 1997;27:41-45.
 426. Croley TE, Miers C. Epithelial changes in the oral mucosa resulting from a variation in hormone stimulus. *J Oral Med* 1978;33:86-89.
 427. Whitcomb SS, Eversole LR, Lindemann RA. Immunohistochemical mapping of epidermal growth-factor receptors in normal human oral soft tissue. *Arch Oral Biol* 1993;38:823-826.
 428. Noguchi S, Ohba Y, Oka T. Effect of salivary epidermal growth factor on wound healing of tongue in mice. *Am J Physiol* 1991;260:E620-625.
 429. Woodburn JR. The epidermal growth factor receptor and its inhibition in cancer therapy. *Pharmacol Ther* 1999;82:241-250.
 430. Shilo BZ. Regulating the dynamics of EGF receptor signaling in space and time. *Development* 2005;132:4017-4027.
 431. Liu HX, Henson BS, Zhou Y, D'Silva NJ, Mistretta CM. Fungiform papilla pattern: EGF regulates inter-papilla lingual epithelium and decreases papilla number by means of PI3K/Akt, MEK/ERK, and p38 MAPK signaling. *Dev Dyn* 2008;237:2378-2393.
 432. Chou HC, Chien CL, Lu KS. The distribution of PGP9. 5, BDNF and NGF in the vallate papilla of adult and developing mice. *Anat Embryol* 2001;204:161-169.
 433. Takami S, Getchell ML, Albers KM, Getchell TV. An age-dependent novel hyperinnervation of circumvallate papillae by tyrosine hydroxylase-containing nerve fibers in NGF-overexpressing transgenic mice. *Brain Res* 1996;707:303-307.
 434. Yee C, Bartel DL, Finger TE. Effects of glossopharyngeal nerve section on the expression of neurotrophins and their receptors in lingual taste buds of adult mice. *J Comp Neurol* 2005;490:371-390.
 435. Groschl M, Topf HG, Kratzsch J, Dotsch J, Rascher W, Rauh M. Salivary leptin induces increased expression of growth factors in oral keratinocytes. *J Mol Endocrinol* 2005;34:353-366.

436. Ptak A, Gregoraszczyk EL. Bisphenol A induces leptin receptor expression, creating more binding sites for leptin, and activates the JAK/Stat, MAPK/ERK and PI3K/Akt signalling pathways in human ovarian cancer cell. *Toxicol Lett*;2010:332-337.
437. Ferguson SA, Law CD, Jr., Abshire JS. Developmental treatment with bisphenol A or ethinyl estradiol causes few alterations on early preweaning measures. *Toxicol Sci* 2011;124:149-160.
438. Zajicek G, Yagil C, Michaeli Y. The streaming submandibular gland. *Anat Rec* 1985;213:150-158.
439. Schwartz-Arad D, Arber L, Arber N, Zajicek G, Michaeli Y. The rat parotid gland--a renewing cell population. *J Anat* 1988;161:143-151.
440. Coughlin JL, Thomas PE, Buckley B. Inhibition of genistein glucuronidation by bisphenol A in human and rat liver microsomes. *Drug Metab Dispos* 2011;40:481-485.
441. Dolinoy DC, Huang D, Jirtle RL. Maternal nutrient supplementation counteracts bisphenol A-induced DNA hypomethylation in early development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:13056-13061.
442. Patisaul HB, Sullivan AW, Radford ME et al. Anxiogenic effects of developmental bisphenol a exposure are associated with gene expression changes in the juvenile rat amygdala and mitigated by soy. *PLoS One* 2012;7:e43890.
443. Lim DS, Kwack SJ, Kim KB, Kim HS, Lee BM. Potential risk of bisphenol A migration from polycarbonate containers after heating, boiling, and microwaving. *J Toxicol Environ Health A* 2009;72:1285-1291.

Publication d'un article dan The laryngoscope

Decision Letter (Iscope-12-1399.R1)

From: thelaryngoscope@gmail.com

To: mireille.foia@chu-dijon.fr

CC:

Subject: Decision: Oral homeostasis disruption by medical plasticizer component Bisphenol A in adult male rats Iscope-12-1399.R1 for The Laryngoscope

Body: @@date to be populated upon sending@@

Dear Dr. Foia:

After review of your revised manuscript titled "Oral Homeostasis Disruption by Medical Plasticizer Component Bisphenol A in Adult Male Rats," we are pleased to accept your manuscript for publication in The Laryngoscope.

We will be forwarding your files directly to the Publisher and you should be receiving copies of the proofs within 4 weeks. If there are any issues, please don't hesitate to contact the editorial office.

Thank you for submitting your work to The Laryngoscope.

Sincerely,

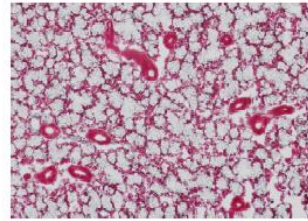
Michael G. Stewart, MD, MPH
Editor-in-Chief, The Laryngoscope

Date Sent: 19-Sep-2012

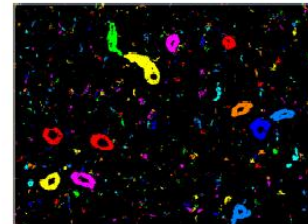
 Close Window

Annexe 1 : Utilisation du logiciel Visilog pour le calcul du nombre et de la surface des acini : exemple de la glande sublinguale

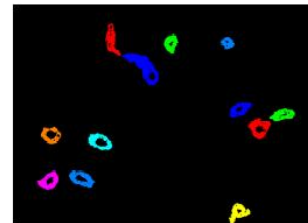
1-Sélection de photos des coupes histologiques
Sélectionnées dans la partie médiane de la glande salivaire



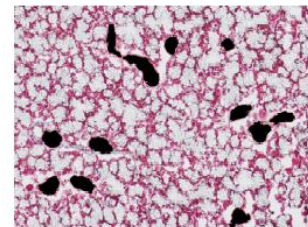
2-Sélection des premières structures d'intérêt : les canaux et attribution d'une couleur de référence



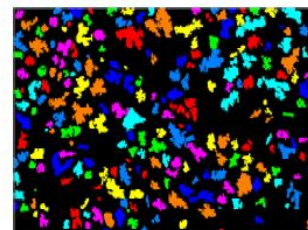
3-Comptage des canaux : nombre et surface



4-Retour à la photo initiale et sélection des secondes structures d'intérêt : les acini et attribution d'une couleur de référence



5-Comptage des acini : nombre et surface



6-Numérotation de chaque acinus

