



Effets d'une exposition chronique maternelle à un pesticide et un régime obésogène sur les fonctions physiologiques digestives : approches in vivo et in vitro

Marion Guibourdenche

► To cite this version:

Marion Guibourdenche. Effets d'une exposition chronique maternelle à un pesticide et un régime obésogène sur les fonctions physiologiques digestives : approches in vivo et in vitro. Médecine humaine et pathologie. Université de Picardie Jules Verne, 2021. Français. ⟨NNT : 2021AMIE0047⟩. ⟨tel-03828708⟩

HAL Id: tel-03828708

<https://theses.hal.science/tel-03828708v1>

Submitted on 25 Oct 2022

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.



HAL Authorization



Thèse de Doctorat

*Mention Biologie Santé
Spécialité Physiologie intégrée et Toxicologie*

présentée à l'Ecole Doctorale en Sciences Technologie et Santé (ED 585)

de l'Université de Picardie Jules Verne

par

Marion GUIBOURDENCHE

pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Picardie Jules Verne

***Effets d'une exposition chronique maternelle à un pesticide
et un régime obésogène sur les fonctions physiologiques
digestives : approches in vivo et in vitro***

Soutenue le 31 Mars 2021, après avis des rapporteurs, devant le jury d'examen :

M. Mathieu GAUTIER, Professeur des Universités, <i>LPCM, Université de Picardie Jules Verne, Amiens</i>	Président du jury
M^{me} Rachel MARION LETELLIER, Maître de Conférences des Universités, <i>INSERM UMR_1073, Université de Rouen, Rouen</i>	Rapporteuse
M. Stéphane JAISSON, Maître de Conférences des Universités – PH <i>MEDyC UMR CNRS 7369, Université de Reims-Champagne-Ardenne, Reims</i>	Rapporteur
M. Laurent BRONDEL, Professeur des Universités – PH <i>CSGA, UMR6265/UMR A1324 uB – CNRS – INRA, Dijon</i>	Examineur
M^{me} Marie Chantal CANIVENC-LAVIER, Chargée de Recherches, <i>CSGA, UMR6265/UMR A1324 uB – CNRS – INRA, Dijon</i>	Examinatrice
M. Xavier COUMOUL, Professeur des Universités, <i>MetaTox INSERM UMR-S1124 - T3S, Université Paris Descartes, Paris</i>	Examineur
M. Eric NGUYEN-KHAC, Professeur des Universités – PH <i>GRAP INSERM UMR_1247, Université de Picardie Jules Verne, Amiens</i>	Examineur
M. Jérôme GAY-QUEHEILLARD, Maître de Conférences des Universités, <i>PériTox UMR_101, Université de Picardie Jules Verne, Amiens</i>	Directeur de thèse
M^{me} Pauline ANTON, Enseignant-chercheur, <i>Unité Transformations & Agroressources (EA 7519), Institut Polytechnique UniLaSalle, Beauvais</i>	Co-Directrice de thèse



ptéce

*La vie est comme un arc en ciel :
il lui faut de la pluie et du soleil pour que ses couleurs apparaissent.*

A. Ramaiya

*A toute ma famille et mes amis,
A mes parents, Jean & Sylvie,
A mon frère et ma sœur, Vincent & Lucie,
A mon fiancé, Thibaut.*

REMERCIEMENTS

La thèse de doctorant représente trois années d'investissement personnel dans un projet de recherche au sein d'un environnement professionnel. Ainsi, de nombreuses personnes se retrouvent, entre le doctorant et son doctorat, j'aimerais les remercier ci après.

Je remercie Madame et Messieurs, **les membres du jury** pour avoir évalué mon travail de thèse. J'adresse mes plus profonds remerciements à Monsieur le **Pr. Mathieu Gautier** qui m'a fait l'honneur d'être le président de ce jury. Je remercie également Madame le **Dr. Marion Rachel Letellier** ainsi que Monsieur le **Dr Stéphane Jaisson** qui m'ont fait l'honneur de juger mon travail de thèse en tant que rapporteurs. Je remercie également Monsieur le **Pr. Laurent Brondel**, Madame le **Dr. Marie Chantal Canivenc-Lavier**, Monsieur le **Pr. Xavier Coumoul**, ainsi que Monsieur le **Pr. Eric Nguyen-Khac** d'avoir accepté d'évaluer mon travail en tant qu'examineurs.

Merci à mes directeurs de thèse :

Merci au **Dr. Pauline Anton**, pour votre précieuse aide tout au long de cette thèse, votre soutien et votre pédagogie. Merci de m'avoir transmis votre énergie et votre passion pour la recherche, nécessaires pour mener à bien cette thèse. Merci de m'avoir fait confiance durant ces trois ans, et pour votre enseignement les années précédentes.

Merci au **Dr. Jérôme Gay-Queheillard**, pour vos nombreux conseils, votre partage de connaissances ainsi que votre délégation de responsabilités. Je vous remercie pour l'implication que vous m'avez offerte dans le co-encadrement des stagiaires, de l'opportunité d'enseigner certains de vos travaux dirigés et pratiques à la faculté. Merci pour le suivi de mes travaux et pour m'avoir fait confiance lors de ce projet de recherche.

Ce travail n'aurait pu être mené à bien sans la disponibilité, la bienveillance et le bel accueil que m'a témoigné la **Pr. Véronique Bach**. Merci pour ton soutien quotidien. Un immense merci de m'avoir encouragée, soutenue et épaulée. Merci pour tes conseils précieux, ton partage d'expériences, ta grande disponibilité et ton écoute. Un sincère et grand merci pour tout.

De nombreuses personnes ont eu un rôle très important dans cette thèse, je tiens à remercier dans un premier temps les personnes ayant travaillé **sur le projet de recherche** dans lequel s'inscrit ma thèse :

Au sein du laboratoire PériTox :

Les deux doctorantes, **Dr. Hiba El Khayat El Sabbouri**, merci de m'avoir épaulée sur l'expérimentation animale, pour sa bonne réalisation et pour les week-ends passés auprès de nos rats, merci pour ton calme, qui m'a sauvé plus d'une fois, et **Narimane Djekkoun**, merci pour ta participation à cette expérimentation également et pour les moments partagés.

Mme Aurélie Corona, merci pour ton aide précieuse, pour nos partages de paillasses : je te remercie particulièrement pour ta précision, tes rires, tes musiques qui ont rendues ces temps de laboratoire encore plus agréables. Au-delà du projet, tu as été pour moi un très grand soutien au quotidien et je t'en suis très reconnaissante.

Dr. Hafida Khorsi Cauet, merci pour ton implication sur le projet et ta bienveillance.

M. Stéphane Delanaud, pour tes aides multiples quotidiennes et pour ton écoute. Merci d'être autant présent pour les doctorants. Merci d'avoir donné crédit à mes nombreuses idées de médiations scientifiques et pour avoir donné vie au mannequin.

Dr. Amandine Pelletier, merci pour ta bonne humeur et pour nos différents échanges.

Mme Julie Le Ber, ainsi que **les animalières de la plateforme PlatAnn** pour votre aide sur le projet et pour la bonne réalisation de l'expérimentation animale.

Les différents stagiaires qui ont travaillé sur mon projet de thèse, Ashley, Délice, Zouhair, Sadanti et Ambre.

Et de l'équipe PETALES :

Dr. Nicolas Barbezier, merci pour votre expertise scientifique, pour votre aide et pour tous les coups de pouces.

Mme Johanna Haug, ma stagiaire de folie, merci pour ta « zen-attitude » mais également pour la confiance que j'ai pu t'accorder et pour tout le travail que tu as fourni.

Merci aux stagiaires **Mme Noëllie Chevalier** et **Mme Madeleine Spatz** pour leurs travaux de recherche.

Les responsables de plateformes, **Mme Anne Laure Bodard** et **Mme Cécile Leridon**, pour le bon déroulé de mon étude, mais également aux différents membres des plateformes de microbiologie et de pathologie végétale, pour les aides et leur bon accueil.

Au sein du service de Biologie hormonale du CHU Cochin de Paris, je souhaite remercier **Mme Fidéline Bonnet**, pour son aide technique et linguiste, **Pr. Jean Guibourdenche**, pour son soutien, son aide rédactionnelle et sa relecture bienveillante, et enfin les techniciennes impliquées dans l'analyse de mes données.

Un sincère merci aux différentes personnes ayant joué un rôle dans la relecture bienveillante de ce manuscrit.

Mon expérience de doctorat se nourrit également de l'expérience et de l'expertise professionnelle de la recherche de **l'ensemble des membres des deux laboratoires** de recherche, je souhaite ainsi les remercier :

Au sein d'UniLaSalle,

Je souhaite remercier **Dr. Carine Delayre**, pour votre soutien pour cette thèse. **Dr. Maxime Perrot**, merci pour ces nombreux cafés réconfortants, pour ton aide et ton soutien, j'en profite pour remercier **Dr. Indoumady Baskara**, qui m'a donné le goût de la science et de la rigueur. Ainsi que **l'ensemble des membres du département Santé**, pour l'enseignement dont j'ai bénéficié au sein d'UniLaSalle, mais également pour votre bonne humeur et mon intégration au sein de l'équipe. Je remercie également **Dr. Virginie Cendret**, pour le dynamisme et le rayonnement de la science au sein d'UniLaSalle, merci pour nos échanges.

Au sein du laboratoire PériTox,

Pr. Karen Chardon, merci pour les responsabilités que tu m'as déléguées lors de ma mission d'enseignement, qui se sont révélées très formatrices et m'ont ouvert les yeux sur mon attrait pour la prévention santé. Merci pour les nombreux partages que nous avons eus, pour ton soutien, ton intérêt, ton temps et ta bienveillance. Un très grand merci.

Ainsi que **Dr. Erwan Stephan Blanchard**, merci pour tes nombreux conseils, notamment autour de ma mission d'enseignement, ton partage d'expériences, ton recul, tes blagues et ta bonne humeur quotidienne.

Pr. Pierre Tournoux, merci pour tes conseils et nos échanges et **Dr. Estelle Durand**, merci pour ton soutien et ton oreille attentive.

Pr. Jean Daniel Lalau, merci pour nos échanges, pour votre intérêt et votre bienveillance, ainsi que la **Pr. Rachel Desailoud** et **Dr. Al-Salameh Abdallah** pour votre confiance, au plaisir de travailler avec vous par la suite.

Merci à **Mme Dorothée Makarewicz**, pour ton aide administrative et pour la bonne prise en charge de mes nombreuses commandes, merci à **Mme Emmanuelle Boyeldieu**, pour ton sourire, et le vent de bonne humeur que tu as apporté au laboratoire.

Dr. Christelle Kouakam, merci pour ta fidèle amitié et tes nombreux conseils. Merci de m'avoir accueillie au sein du laboratoire, cela a été précieux pour mon intégration. Je remercie également **Dr. Walaa Darwiche** pour son aide précieuse et ses encouragements, mais aussi le **Dr. Stéphane Personne** pour son soutien et nos échanges.

Je finirai par remercier mes compères doctorants, qui ont partagé ce fameux open-space. Vous avez contribué à ma motivation tout au long de cette thèse ainsi qu'à son bon déroulement.

Dimitri Besset, merci pour ton recul, tes conseils et ton soutien. Merci pour ce chouette été de rédaction sous la « canicule » amiénoise, à bientôt lors de tes prochains rares passages dans « le grand nord ».

Dr. Fatima Chahin Yassin, merci pour ton soutien sans faille, pour ces nombreux sushis de réconfort, pour notre amitié au-delà de cette relation de collègues, je te souhaite beaucoup de réussite à la hauteur de tes ambitions.

Je tiens également à remercier de nombreuses personnes rencontrées lors de **mes deux missions doctorales élargies** :

Lors de ma deuxième année de thèse, j'ai eu l'occasion de réaliser une mission de médiation scientifique au sein d'Ombelliscience, ainsi je souhaite remercier ses membres : **M. Raphaël Degenne**, merci de m'avoir intégrée au sein de votre équipe, merci pour vos nombreux conseils et discussions. **M. Nicolas Brazier**, merci pour ton enthousiasme et pour mon intégration au sein de l'équipe, **Mme. Amanda Dacorreggio**, **Mme. Lucie Damelincourt**, **Mme. Aurélie Fouré**, **Mme. Laurence Lanvin-Lavaquerie**, **Mme. Marie Lemay**, **M. Arnaud Lecroix**, merci de m'avoir donné l'opportunité de partager les sciences avec les scolaires, et **M. Bertrand Prevost**, pour nos nombreux échanges et pour la création du mannequin. J'espère avoir la chance de travailler de près ou de loin avec votre équipe.

Lors de ma troisième année de thèse j'ai eu l'opportunité de réaliser une **mission d'enseignement au sein de l'Institut de l'Ingénierie de la Santé**, je souhaite ainsi remercier les différents membres l'équipe : **Pr. Frédéric Telliez**, merci de m'avoir accueillie lors de ma mission d'enseignement et de m'avoir permis de la réaliser dans les meilleures conditions possibles, merci pour ta bienveillance, ainsi que **Mme Caroline Moreau**, pour ton soutien administratif et ton sourire, et enfin plus généralement **l'ensemble des membres de l'institut**.



Cette thèse a été réalisée au sein de l'**Université Picardie Jules Verne (UPJV)**, en collaboration entre le **Laboratoire PériTox UMR_I 01 - Unité mixte INERIS – Périnatalité & Risques Toxiques**, Centre Universitaire de Recherche en Santé (CURS), CHU Amiens-Picardie Hôpital Sud, Avenue Laënnec, 80000 Amiens, et l'**équipe Procédés Et Transformations Alimentaires et Effets sur la Santé (PETALES)** de l'**ULR 7519 Transformations et Agroressources** de l'**Institut Polytechnique UniLaSalle, Université d'Artois**, 19 Rue Pierre Waguët, 60000 Beauvais.

Ce projet de recherche a été financé par une allocation de recherche accordée par le **Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche**, ainsi que la **région des Hauts de France**. Deux appels à projet ont financé les différentes analyses de ce travail, à savoir la **Collaboration Artois-ULCO-UPJV** et la **Fédération Hospitalo Universitaire « 1000 jours pour la santé »**. De plus, une prolongation de thèse liée au contexte de la crise sanitaire du COVID-19 a été accordée par l'Université Picardie Jules Verne pour une durée de 3 mois en Octobre 2020.



RESUME

L'exposition maternelle aux résidus de pesticides alimentaires et/ou à une alimentation déséquilibrée induirait des risques pour la descendance à l'âge adulte à développer une obésité et des troubles métaboliques. Une perturbation associée de la fonction hépatique et/ou de l'homéostasie intestinale engendrerait de graves problèmes de santé.

Nous avons évalué les conséquences d'une exposition de rates de 4 mois avant la conception jusqu'à la fin de la lactation à un pesticide organophosphoré, le chlorpyrifos (CPF) et à un régime obésogène (HFD) sur la descendance mâle. Nous avons observé à l'âge adulte (60 jours) des perturbations de la mise en place de la barrière intestinale et des fonctions métaboliques hépatiques. En parallèle, nous avons développé un modèle de co-culture de cellules épithéliales intestinales humaines (Caco-2/TC7 & HT29-MTX), afin de mimer les effets du CPF sur la barrière muqueuse intestinale humaine.

Une exposition péri-gestationnelle au CPF induit des altérations de la barrière épithéliale intestinale et une diminution de la néoglucogénèse et de la lipogénèse *de novo* hépatiques chez la descendance à l'âge adulte. Le HFD entraîne les mêmes effets sans les aggraver. Le CPF augmente l'expression des gènes des protéines des jonctions serrées mais n'induit ni réponse inflammatoire ni augmentation de la perméabilité intestinale *in vitro*.

L'exposition *in utero* au pesticide ou à un régime déséquilibré modifie donc le métabolisme des nouveau-nés qui pourraient, à l'âge adulte, développer des complications métaboliques et/ou avoir des répercussions sur d'autres fonctions physiologiques à l'origine de maladies chroniques non communicables.

Mots clés : pesticides – obésité – barrière intestinale - troubles métaboliques - métabolisme hépatique – périnatalité

ENGLISH TITLE

Effects of chronic maternal exposure to a pesticide and an obesogenic diet on physiological digestive functions: *in vivo* and *in vitro* approaches

ABSTRACT

Maternal exposure to food pesticide residues and/or an obesogenic diet could be at the origin of obesity and metabolic disorders in progeny at adulthood. Disturbances of liver metabolism and/or of intestinal homeostasis may predispose to serious problems in overall health.

We have, on one hand, evaluated the consequences of exposure of dams to chlorpyrifos (CPF) or to an obesogenic diet (HFD) from 4 months before conception to the end of lactation on their male rat offspring. We have observed in the offspring at adulthood (60 days) alterations of the intestinal barrier and of hepatic metabolic functions. We have concomitantly developed a co-culture model of human intestinal epithelial cells (Caco-2/TC7 & HT29-MTX), in order to mimic the effects of CPF on human intestinal barrier.

Perigestational exposure to CPF induces deleterious effects in the offspring at adulthood, especially in terms of the epithelial barrier settlement but also a decrease in gluconeogenesis and *de novo* lipogenesis in the liver. The obesogenic diet has the same consequences without increasing them. The pesticide increases gene expression of tight-junction proteins but does not induce any inflammatory response nor intestinal permeability alterations.

In utero exposure to a pesticide or to an unbalanced diet therefore disrupts the metabolism of newborns, which could, at adulthood, develop metabolic complications and repercussions on other physiological functions at the origin of non communicable chronic diseases.

Key words : pesticides – obesity – intestinal barrier - metabolic disorders – liver metabolism – perinatal

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS.....	8
RESUME.....	16
ABSTRACT.....	17
TABLE DES MATIERES.....	18
LISTE DES FIGURES.....	26
LISTE DES TABLEAUX.....	28
VALORISATION DES TRAVAUX DE THESE.....	30
1. Publications.....	32
2. Communications nationales et internationales.....	33
2.1. Communications orales.....	33
2.2. Communications affichées.....	34
3. Médiation scientifique.....	37
ABREVIATIONS.....	40
PREAMBULE.....	46
ETAT DE L'ART.....	52
EXPOSITION MATERNELLE AUX PESTICIDES : IMPACTS SUR LA SANTE.....	54
1. Généralités.....	54
2. Classifications des pesticides.....	55
2.1. Classement par cible.....	55
2.2. Classement par toxicité aiguë.....	55
2.3. Classement par structure chimique.....	56
3. Distribution et utilisation des pesticides.....	57
3.1. Distribution des pesticides pour des usages agricoles.....	57
3.1.1. Dans le monde et en Europe.....	57
3.1.2. En France.....	58
3.1.2.1. Utilisation agricole : généralités.....	58
3.1.2.2. Utilisation des OPs.....	60
3.2. Utilisation des pesticides non agricole.....	61
4. Exposition.....	62
4.1. Généralités.....	62
4.2. Exposition dans notre alimentation et boisson.....	64
4.3. Exposition dans l'environnement et résidentiel.....	65
5. Les organophosphorés.....	66
5.1. Présentation générale du chlorpyrifos (CPF).....	66

5.2.	Règlementation du CPF.....	66
5.3.	Mode d'action et toxicité des OPs	67
5.4.	Profil d'Absorption, de Distribution, Métabolisme et Excrétion (ADME) du CPF .	69
5.4.1.	Absorption orale du CPF.....	69
5.4.2.	Distribution du CPF.....	69
5.4.3.	Métabolisme du CPF.....	70
5.4.4.	Elimination du CPF.....	71
5.5.	Toxicité du CPF	71
5.5.1.	Toxicité aiguë.....	71
5.5.2.	Toxicité chronique	72
5.6.	Effets des OPs en périnatalité sur la santé	72
OBESITE ET DESEQUILIBRE ALIMENTAIRE MATERNELS : IMPACTS SUR LA SANTE		76
1.	Définition de l'obésité	76
2.	Prévalence de l'obésité.....	77
2.1.	Au niveau mondial	77
2.2.	En France.....	77
3.	Causes de l'obésité	78
3.1.	Déséquilibre alimentaire.....	78
3.2.	Pathogenèse de l'obésité.....	79
4.	Conséquences métaboliques et physiologiques.....	80
5.	L'obésité maternelle	82
5.1.	Les conséquences sur la santé	82
5.2.	Le High Fat Diet (HFD) comme modèle d'exposition <i>in vivo</i>	83
5.3.	Les impacts de l'exposition à des pesticides OPs sur la survenue de l'obésité et plus particulièrement lors de la période périnatale	84
5.3.1.	Les impacts de l'exposition des OPs sur la survenue de l'obésité.....	84
5.3.2.	Les impacts des OPs dont le CPF en périnatalité.....	85
L'HOMEOSTASIE INTESTINALE ET LES FACTEURS RESPONSABLES DE SA PERTURBATION ..		90
1.	Le système digestif	90
1.1.	L'embryogenèse.....	90
1.2.	La description du système digestif.....	91
2.	L'épithélium intestinal	92
2.1.	La morphogenèse et la description de l'épithélium intestinal	92
2.2.	Les fonctions de l'épithélium intestinal	94

2.2.1.	L'absorption des nutriments	94
2.2.2.	La barrière épithéliale intestinale.....	95
2.2.2.1.	Les jonctions cellulaires.....	95
2.2.2.2.	Le mucus.....	97
2.2.2.3.	L'immunité digestive	98
2.2.2.4.	Le microbiote intestinal.....	101
2.2.2.5.	L'homéostasie intestinale	102
2.3.	L'axe intestin – cerveau	103
3.	Les effets de l'exposition maternelle à des facteurs environnementaux sur l'homéostasie intestinale	104
3.1.	Les effets de l'exposition à des organophosphorés sur l'homéostasie intestinale	104
3.3.	Les effets de l'obésité maternelle sur l'homéostasie intestinale	106
LA PHYSIOLOGIE HEPATIQUE.....		108
1.	La morphogenèse et morphologie hépatique	108
2.	Le métabolisme glucidique, lipidique, protéique et des xénobiotiques	109
2.1.	Le métabolisme glucidique	109
2.2.	Le métabolisme des lipides.....	111
2.3.	Le métabolisme protéique et autres fonctions hépatiques	112
2.4.	Les pathologies hépatiques	113
3.	Les effets de facteurs environnementaux sur le métabolisme hépatique	114
3.1.	Les effets des organophosphorés sur le métabolisme hépatique.....	114
3.2.	Les effets de l'obésité ou du HFD sur le métabolisme hépatique	115
OBJECTIFS DE L'ETUDE		118
METHODOLOGIE.....		122
EVALUATION DE LA PERTURBATION DE LA FONCTION BARRIERE INTESTINALE ET DU METABOLISME HEPATIQUE CHEZ DES RATS ISSUS DE MERES EXPOSEES A UN PESTICIDE ET/OU UN REGIME OBESOGENE.....		126
1.	Modèle d'exposition périnatale aux perturbateurs environnementaux	126
1.1.	Exposition des mères au chlorpyrifos (CPF).....	127
1.2.	Exposition des mères à un régime hyperlipidique-hypercalorique dit « HFD » ..	128
2.	Marqueurs de croissance corporelle de la descendance	129
3.	Evaluation des lésions hépatiques chez la descendance	129
3.1.	Evaluation de marqueurs sanguins de l'activité métabolique hépato-pancréatique	129

3.2. Evaluation de l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme lipidique et glucidique	129
3.3. Analyse histologique des perturbations hépatiques	130
4. Evaluation des perturbations de l'homéostasie intestinale de la descendance.....	131
4.1. Evaluation des modifications de la perméabilité intestinale.....	131
4.2. Evaluation de l'induction d'une réponse inflammatoire	131
4.3. Expression des gènes impliqués dans la protection immunitaire innée	131
4.4. Évaluation de la modification de la structure de la paroi intestinale.....	132
EVALUATION DE LA PERTURBATION DE LA FONCTION BARRIERE INTESTINALE SUR UN MODELE CELLULAIRE REPRESENTATIF D'UN EPITHELIUM INTESTINAL HUMAIN EXPOSE A DES RESIDUS DE PESTICIDES.....	134
1. Modèles d'étude de l'épithélium intestinal <i>in vitro</i>	134
2. Mise en place d'un modèle <i>in vitro</i> d'épithélium intestinal humain	135
3. Comparaison de l'évaluation de la sensibilité du modèle de monoculture et de co-culture à un stimulus inflammatoire induit par l'exposition à un cocktail de cytokines pro-inflammatoires	136
4. Evaluation des conséquences de l'exposition de la co-culture épithéliale intestinale au CPF.....	136
Résultats	138
ETUDE 1 : L'EXPOSITION PERINATALE AU CPF ET/OU A UN REGIME OBESOGENE ENTRAINE DES LESIONS HEPATIQUES CHEZ LA DESCENDANCE MALE.....	140
ETUDE 2 : PROGRAMMATION PERINATALE DE L'HOMEOSTASIE INTESTINALE CHEZ LA DESCENDANCE MALE APRES UNE EXPOSITION MATERNELLE A UN PESTICIDE ET UN REGIME RICHE EN LIPIDES	158
ETUDE 3 : L'EVALUATION DE CONTAMINANTS ALIMENTAIRES PAR UN MODELE DE CO-CULTURE EPITHELIALE INTESTINALE	176
1. Introduction.....	Erreur ! Signet non défini.
2. Materials and Methods	Erreur ! Signet non défini.
3. Results	Erreur ! Signet non défini.
4. Discussion	Erreur ! Signet non défini.
5. Conclusions.....	Erreur ! Signet non défini.
References.....	Erreur ! Signet non défini.
Discussion generale	206
Perspectives	222
Conclusion générale.....	228
Bibliographie	232

TABLE DES ILLUSTRATIONS

LISTE DES FIGURES

Figure 1 - Répartition des achats de pesticides ramenés à l'hectare par continent de 1990 à 2016 (source : FAOSTAT).....	57
Figure 2 - Utilisation mondiale de pesticides en 2017 (kg/ha) (source : FAOSTAT)	58
Figure 3 – Achats de pesticides par superficie de terres cultivées en France entre 1990 et 2017 (source : FAO).....	59
Figure 4 – (A) Carte de vente des pesticides par département par hectare de surface agricole utilisée (kg/ha) en 2017 (source : Générations Futures Novembre 2018) et (B) le % d'exploitations engagées dans une démarche de réduction des produits phytosanitaires par rapport au nombre total d'exploitations du département (source : ministère de l'agriculture et de l'alimentation 19/04/2019).....	59
Figure 5 - Tonnages moyens de l'utilisation agricole des OPs, par pays (2010–2015)(Hertz-Picciotto et al. 2018).....	61
Figure 6 - Sources d'expositions aux pesticides (création personnelle sur BioRender.com) ..	63
Figure 7 - Nombre de publications référencées sur pubmed incluant le mot “chlorpyrifos” entre 1969 et 2019 (création personnelle)	66
Figure 8 - Formule chimique des OPs.....	68
Figure 9 - Impacts des OPs – traduit de (Czajka et al. 2019).....	72
Figure 10 - Répartition territoriale de l'obésité en 2016 (source : BEH n°35-36, 2016, Santé publique France).....	78
Figure 11 - Pathogenèse de l'obésité - adapté et traduit de (Blüher, 2019) (création personnelle sur BioRender.com).....	80
Figure 12 - Principaux dépôts de graisse chez les rongeurs (A) et les humains (B) (Tchkonja et al. 2013).....	81
Figure 13 - Nombre de publications référencées sur pubmed incluant le mot “HFD” entre 1977 et 2019 (création personnelle).....	83
Figure 14 – Résumé des effets des OPs en périnatalité décrits dans la littérature (création personnelle).....	86
Figure 15 - Paroi intestinale (création personnelle sur BioRender.com).....	92
Figure 16 - Composition de l'épithélium intestinal adapté de (Boonekamp et al. 2020) (source personnelle créée avec BioRender.com)	94
Figure 17 - Jonctions cellulaires: barrière physique étanche (création personnelle sur BioRender.com).....	96
Figure 18 - Immunité digestive (iléon) (création personnelle sur BioRender.com)	100
Figure 19 - Barrière intestinale (création personnelle sur BioRender.com)	102
Figure 20 - Organisation hépatique (création personnelle sur BioRender.com)	109
Figure 21 - Métabolisme glucidique hépatique (création personnelle sur BioRender.com). 110	
Figure 22 - Métabolisme lipidique hépatique (création personnelle sur BioRender.com) ...	112
Figure 23 - Pathogenèse des maladies du foie gras - adapté et traduit de (Kuchay et al. 2020) (création personnelle sur BioRender.com)	114

Figure 24 - Objectifs et hypothèses de l'étude (création personnelle sur BioRender.com) .	121
Figure 25 - Double approche méthodologique (création personnelle sur BioRender.com) .	125
Figure 26 - Protocole expérimental du modèle animal (création personnelle sur BioRender.com).....	128
Figure 27 - Résumé des analyses de l'expérimentation animale (création personnelle sur BioRender.com).....	133
Figure 28 - Protocole expérimental de mise au point et d'induction d'une réponse inflammatoire dans un modèle in vitro d'épithélium intestinal puis exposé à un pesticide (création personnelle sur BioRender.com)	137
Figure 29 – Perturbations de la prise de poids des animaux issue d'une exposition maternelle à des facteurs environnementaux (création personnelle sur BioRender.com).....	209
Figure 30 – Résultats observés sur la barrière intestinale in vivo et in vitro (création personnelle sur BioRender.com).....	213
Figure 31 - Illustration des résultats observés sur le métabolisme hépatique et proposition de mécanismes d'action de la co-exposition du CPF et du HFD (création personnelle sur BioRender.com).....	216

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 - Classement OMS par degré de toxicité des pesticides (source : OMS)	56
Tableau 2 - Relation entre la sévérité clinique d'une intoxication aux OPs et l'inhibition de l'AChE traduit de (Thabet et al. 2009)	69

VALORISATION DES TRAVAUX DE THESE

1. Publications

H. El Khayat El Sabbouri, J. Gay-Quéheillard, W. H. Joumaa, S. Delanaud, **M. Guibourdenche**, W. Darwiche, N. Djekkoun, V. Bach, W. Ramadan.

Does the perigestational exposure to CPF and/or high-fat diet affect respiratory parameters and diaphragmatic muscle contractility in young rats?

Food and Chemical Toxicology (IF : 4.679), 2020; 140:111322, doi:10.1016/j.fct.2020.111322.

H. El Khayat El Sabbouri, **M. Guibourdenche**, W. Darwiche, N. Djekkoun, V. Bach, W. H. Joumaa, W. Ramadan, J. Gay-Quéheillard.

Impacts of perigestational exposure to chlorpyrifos (CPF) and High -Fat Diet (HFD) on ileum contractility in male rats at early adulthood.

Journal of Pharmacology and Drug Metabolism (IF : 2.1), 2021; 4:1-12, doi:10.17303/jpdm.2021.4.101.

M. Guibourdenche, H. El Khayat El Sabbouri, F. Bonnet, N. Djekkoun, H. Khorsi-Cauet, A. Corona, J. Guibourdenche, V. Bach, P. M Anton, J. Gay-Quéheillard.

Perinatal exposure to chlorpyrifos and/or a high fat diet induces liver injuries in male rat offspring

Cells and Development (IF : 2.126), 2021 Apr 19; 166:203678, doi:10.1016/j.cdev.2021.203678.

M. Guibourdenche, H. El Khayat El Sabbouri, N. Djekkoun, H. Khorsi-Cauet, V. Bach, P. M Anton, J. Gay-Quéheillard.

Programming of intestinal homeostasis in male rat offspring after maternal exposure to chlorpyrifos and/or to a high fat diet

Scientific Reports (IF : 3.998), 2021 Jun 1 ; 11(1):11420, doi: 10.1038/s41598-021-90981-2.

M. Guibourdenche, J. Haug, N. Chevalier, M. Spatz, N. Barbezier, J. Gay-Quéheillard, P. M Anton.

Food contaminants effects on in vitro model of human intestinal epithelium

Toxics (IF : 3.271), accepté en Mai 2021.

2. Communications nationales et internationales

2.1. Communications orales

H. El Khayat El Sabbouri, W. H. Joumaa, J. Gay-Quéheillard, V. Bach, **M. Guibourdenche**, N. Djekkoun, W. Darwiche, W. Ramadan
Effects of Perigestational Exposure to CPF and/or High Fat Diet on Sleep Apnea in Young Adult Rats.



GLOBAL HEALTH 2019 : The Eighth International Conference on Global Health Challenges - Porto, Portugal - 22 au 26 Septembre 2019

N. Djekkoun, B. Chognika, A. Brasseur, **M. Guibourdenche**, H. El Khayat El Sabbouri, F. Depeint, M. Biendo, J. Gay-Quéheillard, L. Rouabah, F. Hamdad, V. Bach, H. Khorsi-Cauet.
Exposition à un pesticide et/ou un régime obésogène chez le rat : dysbiose et perturbation métabolique



Congrès MiBioGate "Physiologie et Pathologie des Barrières : rôle du microbiote sur l'hôte" - Nantes, France - 20 Juin 2019

N. Djekkoun, B. Chognika, A. Brasseur, **M. Guibourdenche**, H. El Khayat El Sabbouri, L. Rhazi, F. Depeint, J. Gay-Quéheillard, L. Rouabah, F. Hamdad, V. Bach, H. Khorsi-Cauet.
La co-exposition à un pesticide et/ou un régime obésogène et prévention par un prébiotique : impact sur le microbiote intestinal chez le modèle animal



The first national seminar of nutrition and health - Chlef , Algérie – 16 au 17 decembre 2019

2.2. Communications affichées



7ème Journées Amiénoises de la Recherche en Santé - Amiens, France - 17 Janvier 2019

- **M. Guibourdenche**, H. El Khayat El Sabbouri, A. Bouzerara, N. Djekkoun, H. Khorsi-Cauet, J. Guibourdenche, V. Bach, P.M Anton, J. Gay-Quéheillard.
Programmation périnatale de l'homéostasie intestinale suite à l'exposition à un régime obésogène et à un pesticide chez le rat mâle.
- H. El Khayat El Sabbouri, W. Darwiche, **M. Guibourdenche**, N. Djekkoun, V. Bach, W.H. Joumaa, W. Ramadan, J. Gay-Quéheillard.
Impacts of perigestational exposure to CPF (CPF) and High -Fat Diet (HFD) on respiration and diaphragm contractility in male rats.
- N. Djekkoun, **B. Chognika**, A. Brasseur, **M. Guibourdenche**, H. El Khayat El Sabbouri, F. Depeint, M. Biendo, J. Gay-Quéheillard, L. Rouabah, F. Hamdad, V. Bach, H. Khorsi-Cauet.
Co-exposition aux chlorpyrifos, régime obésogène et inuline : impact sur la dysbiose intestinale et la translocation bactérienne chez le modèle animal.



17ème symposium ComTech AFSTAL - Paris, France - 31 Janvier 2019

- **M. Guibourdenche**, H. El Khayat El Sabbouri, N. Djekkoun, H. Khorsi-Cauet, V. Bach, P. M Anton, J. Gay-Quéheillard.
Exposition de rats à un pesticide : gavage oral au chlorpyrifos.



Journées Francophones d'Hépatogastroentérologie & d'Oncologie Digestive 2019 - Paris, France - 23 mars 2019

- **M. Guibourdenche**, H. El Khayat El Sabbouri, A. Bouzerara, N. Djekkoun, H. Khorsi-Cauet, J. Guibourdenche, V. Bach, P.M Anton, J. Gay-Quéheillard.
Programmation périnatale de l'homéostasie intestinale suite à l'exposition à un régime obésogène et à un pesticide chez le rat mâle.
Prix meilleur poster catégorie "recherche pré-clinique "

- N. Djekkoun, A. Brasseur, **M. Guibourdenche**, H. El Khayat El Sabbouri, F. Depeint, M. Biendo, J. Gay-Quéheillard, L. Rouabah, F. Hamdad, V. Bach, H. Khorsi-Cauet.

Combinaisons d'expositions au pesticide, régime obésogène et prébiotique : impact sur la dysbiose intestinale et la translocation bactérienne lors de la gestation chez le rat.



**Journées Jeunes Chercheurs Transfrontalières 2019 -
Reims, France - 3 Avril 2019**

- **M. Guibourdenche**, H. El Khayat El Sabbouri, A. Bouzerara, N. Djekkoun, H. Khorsi-Cauet, J. Guibourdenche, V. Bach, P.M Anton, J. Gay-Quéheillard.

Programmation périnatale de l'homéostasie intestinale suite à l'exposition à un régime obésogène et à un pesticide chez le rat mâle.

Prix Poster « Jeunes Chercheurs Transfrontaliers »



**The
Physiological
Society**

Physiology 2019 - Aberdeen, Ecosse - du 8 au 10 Juillet 2019

- **M. Guibourdenche**, H. El Khayat El Sabbouri, A. Bouzerara, N. Djekkoun, H. Khorsi-Cauet, J. Guibourdenche, V. Bach, P.M Anton, J. Gay-Quéheillard.

Perinatal programming of intestinal homeostasis following exposure to low dose of CPF in male rats offspring.



**Congrès MiBioGate “Physiologie et Pathologie des Barrières
: rôle du microbiote sur l’hôte” - Nantes, France - 20 Juin 2019**

- N. Djekkoun, B. Chognika, **M. Guibourdenche**, H. El Khayat El Sabbouri, L. Rhazi, F. Depeint, J. Gay-Quéheillard, L. Rouabah, F. Hamdad, V. Bach, H. Khorsi-Cauet.

Exposition à un pesticide et/ou un régime obésogène chez le rat : dysbiose et perturbation métabolique.



NeuroGastro 2019 - Lisbonne, Portugal - du 5 au 7 Septembre 2019

- **M. Guibourdenche**, H. El Khayat El Sabbouri, A. Bouzerara, N. Djekkoun, H. Khorsi-Cauet, J. Guibourdenche, V. Bach, P.M Anton, J. Gay-Quéheillard.
Perinatal programming of intestinal homeostasis following exposure to low dose of CPF in male rats offspring.
- **M. Guibourdenche**, H. El Khayat El Sabbouri, A. Bouzerara, N. Djekkoun, H. Khorsi-Cauet, J. Guibourdenche, V. Bach, P.M Anton, J. Gay-Quéheillard.
Perinatal programming of intestinal homeostasis following exposure to high fat diet in male rats offspring.
- H. El Khayat El Sabbouri, **M. Guibourdenche**, W. Darwiche, N. Djekkoun, V. Bach, W.H. Joumaa, W. Ramadan, J. Gay-Quéheillard
Impacts of perigestational exposure to CPF (CPF) and High-Fat Diet (HFD) on ileum contractility in male rats.



United European Gastroenterology 2019 – du 19 au 23 Octobre 2019
- Barcelone, Espagne

- **M. Guibourdenche**, H. El Khayat El Sabbouri, A. Bouzerara, N. Djekkoun, H. Khorsi-Cauet, J. Guibourdenche, V. Bach, P.M Anton, J. Gay-Quéheillard.
Perinatal programming of intestinal homeostasis following exposure to low dose of CPF in male rats offspring.
- **M. Guibourdenche**, H. El Khayat El Sabbouri, A. Bouzerara, N. Djekkoun, H. Khorsi-Cauet, J. Guibourdenche, V. Bach, P.M Anton, J. Gay-Quéheillard.
Perinatal programming of intestinal homeostasis following exposure to high fat diet in male rats offspring.



11ème congrès annuel en santé environnement « Multiexpositions, conditions de vie et santé : de la connaissance à l'action » - Lille, France
(Congrès DIGITAL - en ligne) - du 16 au 20 Novembre 2020

- N. Djekkoun, B. Chognika, **M. Guibourdenche**, H. El Khayat El Sabbouri, L. Rhazi, F. Depeint, J. Gay-Quéheillard, L. Rouabah, F. Hamdad, V. Bach, H. Khorsi-Cauet.
Exposition à un pesticide et/ou un régime obésogène chez le rat : dysbiose et perturbation.

3. Médiation scientifique

- **Article vulgarisé, publié le 11 Février 2019** (2,7k vues en Mai 2021)
Les effets d'un pesticide (chlorpyriphos) et d'une alimentation déséquilibrée, sur notre organisme au cours des 1000 premiers jours de la vie : mon travail de thèse.
Disponible en ligne sur le site EchoSciences Hauts de France :
<https://www.echosciences-hauts-de-france.fr/articles/les-effets-d-un-pesticide-chlorpyriphos-et-d-une-alimentation-desequilibree-sur-notre-organisme-au-cours-des-1000-premiers-jours-de-la-vie-mon-travail-de-these>
- **Colloque international "Telling Science, Drawing Science", Angoulême, 15-17 Mai 2019**
Participation au forum "Les jeunes chercheurs et la place de la BD".
- **Membre organisateur de Pint of Science Amiens 2019, année scolaire 2018/2019 (1 an)**
Organisation d'un évènement de trois soirées dans des bars amiénois, dans le but d'intéresser des chercheurs de tous univers scientifiques à la vulgarisation scientifique.
- **Dessin de deux bandes dessinées sur mon sujet de thèse, Février 2018 et Mars 2019**
Formation « Mets ta recherche en récit « Sciences en Bande Dessinée » ».
- **Journée des doctorants UniLaSalle, 29 Mars 2019**
Speech vulgarisé sur mon sujet de thèse en 3 minutes.
- **Article sur mon contrat doctoral élargi, publié le 16 Juillet 2019** (1.1k vues en Mai 2021):
« Trouver c'est bien, partager c'est mieux » Marion Guibourdenche nous parle du contrat doctoral mission science société Publié par Ombelliscience.
Disponible en ligne sur le site EchoSciences Hauts de France :
<https://www.echosciences-hauts-de-france.fr/communautes/doctorants-des-hauts-de-france/articles/trouver-c-est-bien-partager-c-est-mieux-marion-guibourdenche-nous-parle-du-contrat-doctoral-mission-science-societe>

- **Rencontre des anciens élèves UniLaSalle Beauvais, Agora 2019, Beauvais, 8 Juin 2019**
Speech « Une thèse après une école d'ingénieur » en 3 minutes.
- **Tenue du compte twitter La Bio au Labo, du 30 Septembre au 6 Octobre 2019**
Rédiger et publier une dizaine de tweets quotidiens sur sa thématique de recherche, le temps d'une semaine (113 tweets).
Récapitulatif de la semaine de tweets disponible en ligne :
<https://wakelet.com/wake/4f837e6e-cebc-4d00-b194-3762bc08c7e4>
- **Stand « Laboratoire Pérیتox » Bibliothèque Louis Aragon, Amiens, Fête de la Science 2019, 5 Octobre 2019 et au village des sciences de l'UPJV, 10-11 Octobre 2019**
Mise en place et création de 3 stands autour de nos thématiques de recherche et expositions et speech explicatives de mes deux bandes dessinées sur mon sujet de thèse.
- **Stand « Quoi d'noeuf docteur ? » Fête de la Science 2019, UniLaSalle, 8 Octobre 2019**
Participation au stand sur une journée face à des élèves de primaire, expériences culinaires.
- **Journée des doctorants UniLaSalle, 5 Décembre 2019**
Speech vulgarisé sur mon sujet de thèse en 3 minutes.
- **« Sciences, innovations, société : la rencontre des professionnels en Hauts de France », Arras, 13 Février 2020**
Participation à la rencontre de 167 acteurs impliqués dans le partage des sciences et techniques en Hauts-de-France.
- **Vidéo dans la série « Les doctorants nous parlent de sciences », publiée le 10 Avril 2020 sur le site internet de l'UPJV (3k vues en Janvier 2021)**
Vidéo de 4 minutes présentant mon sujet de recherche.
Disponible sur le site de l'UPJV :
https://webtv.u-picardie.fr/watch_video.php?v=8W28UY81MW4R

- **Création d'un outil de médiation scientifique : mannequin pesticide en périnatalité.**
Cahier des charges rédigé lors de mon contrat élargi d'activité de diffusion de l'information scientifique (2018-2019), au sein d'Ombelliscience.
Objet de médiation scientifique financé par la Fête de la Science 2019 et actuellement en cours de réalisation au sein du laboratoire PériTox UMR_I 01 grâce à l'aide de Stephane Delanaud, ingénieur d'études du laboratoire et Corentin, étudiant en BTS en informatique au lycée Branly d'Amiens.
- **Article sur mes actions de médiation réalisées lors de ma thèse, publié le 18 Février 2021**
(1.3k vues en Mai 2021) :
« Comment faire de la médiation scientifique lors de sa thèse ? »
Disponible en ligne sur le site EchoSciences Hauts de France :
<https://www.echosciences-hauts-de-france.fr/communautes/doctorants-des-hauts-de-france/articles/comment-faire-de-la-mediation-scientifique-autour-de-sa-these>
- **Article vulgarisé résumé de ma thèse, publié le 21 Avril 2021** (420 vues en Mai 2021)
« Notre alimentation pourrait-elle impacter la santé de nos futurs enfants ? »
Disponible en ligne sur le site EchoSciences Hauts de France :
<https://www.echosciences-hauts-de-france.fr/communautes/doctorants-des-hauts-de-france/articles/notre-alimentation-pourrait-elle-impacter-la-sante-de-nos-futurs-enfants>
- **Conférence en ligne lors de Pint Of Science 2021, Amiens Mission « Notre corps » : Notre alimentation pourrait-elle impacter la santé de nos futurs enfants ?**
Replay disponible : https://www.youtube.com/watch?v=J4_SXMxOf1U

ABREVIATIONS

Acaca : Acetyl-CoA carboxylase 1	(Carbohydrate Response Element Binding Protein)
Actb : Bêta-actine	CKs : Cytokines
ACh : Acétylcholine	Cldn4 : Claudine 4
AChE : Acétylcholinestérase	CML : N (6) - Carboxymethyllysine
ADME : Absorption, Distribution, Métabolisme et Excrétion	Col1a1 : Le collagène, de type I, alpha 1 (Collagen alpha-1)
ADNc : ADN complémentaire	CPF : Chlorpyrifos (Chlorpyrifos)
AG : Acides Gras	CT : Seuil de cycle (Threshold Cycle)
AGEs : Produits avancés de glycation (Advance Glycation End products)	CTL : Contrôle (control)
AGL : Acides Gras Libres	CXCL8 : Gène codant pour l'interleukine 8 (C-X-C Motif Chemokine Ligand 8)
AGS : Acides Gras Saturés	CYP450 : Cytochrome P450
AJE : Apport Journalier Estimé	DDT : Dichlorodiphényltrichloroéthane
ALAT : ALanine AminoTransférase	Defb1 : Défensine β1
ALP : ALkaline Phosphatase	Defb4 : Défensine β4
AMM : Autorisation de Mise sur le Marché	DEP : Diéthylphosphate
ANSES : Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de L'Environnement et du travail	DETP : Diéthylthiophosphate
ARNm : Acide RiboNucléique messenger	Dgat1 : Diglyceride O-acyltransferase 1
ASAT : Aspartate aminotransférase	Dgat2 : Diglyceride O-acyltransferase 2
BW : Poids corporel (Body Weight)	DGCCRF : Direction générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes
Ctrl : Contrôle	DJA : Dose Journalière Admissible
CASP3 : Caspase 3	DL50 : Dose Létale Médiane
CASP9 : Caspase 9	DMEM : Milieu de culture cellulaire (Dulbecco's Modified Eagles Medium)
Cd36 : Translocatase d'acide gras (Fatty Acid Translocase)	DNA : acide désoxyribonucléique (DeoxyriboNucleic Acid)
cDNA : ADN complémentaire (Complementary DNA)	DOHaD : Les origines développementales de la santé et des maladies
CE : Commission Européenne	
Chrebp : La protéine de liaison aux éléments sensible aux glucides	

(Developmental Origins of Health and Disease)

EAT : Etude de l'Alimentation Totale

EFSA : Autorité européenne de sécurité des aliments (European Food Safety Authority)

ELISA : Dosage immuno-enzymatique (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

FAO : Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (Food and Agriculture Organization of the United Nations)

Fasn : Acide gras synthase (Fatty Acid Synthase)

FBS : Sérum Foetal Bovin (Fetal Bovine Serum)

FITC : Isothiocyanate de fluorescéine

G6pc : Glucose-6-phosphatase

GALT : Tissu lymphoïde du tube digestif (Gut-Associated Lymphoid Tissue)

GAPDH : Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

GD : Jour de gestation (Gestational day)

Glut2 : Transporteur de glucose 2

ha : Hectare

HDL : Lipoprotéines de Haute Densité

HFD : Régime obésogène (High fat diet)

Hmgcr : Hydroxyméthylglutaryl-CoA réductase

Hprt1 : Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase

IF : Facteur d'impact

IFN- γ : Interféron γ

IgA : ImmunoGlobuline A

IGF1 : Somatomédine C (Insulin-like Growth factor-1)

IL-1 β (*IL1b*) : Interleukine 1 bêta

IL-6 : Interleukine 6

IMC : Indice de Masse Corporelle

LDH : Lactate déshydrogénase

LDL : Lipoprotéine de basse densité

LFD : Régime pauvre en graisse

LMR : Limites maximales de résidus

Lpl : Lipoprotéine lipase

LPS : Lipopolysaccharides

MAP3K1 : Protéine kinase kinase kinase 1 (Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1)

MAPK8 : Protéine kinase 8 (Mitogene-Activated Protein Kinase 8)

MAPK14 : Protéine kinase 14 (Mitogene-Activated Protein Kinase 14)

Mlxipl : La protéine de liaison aux éléments sensible aux glucides (MLX interacting protein like)

Muc1 : Mucine 1

Muc2 : Mucine 2

Muc3 : Mucine 3

MUC5AC : Mucine 5AC

MYD88 : Réponse primaire de différenciation myéloïde 88 (Myeloid Differentiation primary response gene 88)

NAFLD : Stéatopathie non alcoolique (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease)

NASH : Stéatose non alcoolique (Non-Alcoholic SteatoHepatitis)

NF-κB : Nuclear factor-kappa B

NOAEL : Dose sans effet toxique observable ou DSENO (No Observable Adverse Effect Level)

Ocln : Occludine

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OPs: Organophosphorés

PAMP : Motif moléculaire associé aux pathogènes (Pathogen Associated Molecular Pattern)

PAS : Periodic Acid Schiff

PBS : Tampon phosphate salin (Phosphate Buffered Saline)

PCR : Réaction en Chaîne par Polymérase (Polymerase Chain Reaction)

Pck1/Pepck : Phosphoénolpyruvate carboxykinase

PND : Jour après la naissance (Postnatal Day)

PNNS : Programme National Nutrition Santé

PNSE : Plans Nationaux Santé Environnement

Ppara : Récepteur alpha activé par les proliférateurs de peroxysomes (Peroxisome proliferator activated receptor alpha)

Pparg : Récepteur gamma activé par les proliférateurs de peroxysomes

(Peroxisome proliferator-activated receptor gamma)

PPIA : Cyclophiline A (Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A)

Prkaa1/Ampka : Protéine kinase AMP-dépendante (AMP-activated protein kinase)

qPCR : PCR quantitative

RAGE : Récepteur des AGEs (Receptor for Advanced Glycation End products)

RT-PCR : Transcriptase inverse Réaction en Chaîne par Polymérase (Reverse Transcription Polymerase chain Reaction)

SCD : Alimentation standard (Standard Chow Diet)

SEM : Ecart type (Standard Error to the Mean)

Slc2a2 : Transporteur de glucose 2 (Solute Carrier Family 2 Member 2)

Srebf1/Srebp1c: Facteur 1 de transcription de liaison des éléments régulateurs de stérol (Sterol regulatory element binding protein)

STAT3 : Facteur de transcription de la famille des STAT (Signal Transducer Activator of transcription 3)

T2DM : Diabète de type 2 (Type 2 diabetes)

TC : Cholestérol total

TCPy : 3-5-6 trichloro-2-pyridinol

TEER : Transepithelial electrical resistance

TGs : Triglycérides

TJ : Jonctions serrées (Tight Junctions)

Tjp1 : Protéine de jonction serrée-1 (Tight junction protein 1)

TLR : Récepteur de type Toll (Toll-like receptors)

Tlr2 : Récepteur de type Toll-like 2

Tlr4 : Récepteur de type Toll like 4

TNF- α : Facteur de nécrose tumorale (Tumor Necrosis Factor α)

Ubc : Ubiquitine C (Ubiquitin C)

UE : Union Européenne

VTR : Valeurs Toxicologiques de Référence

VLDL : Lipoprotéine de très basse densité (Very Low Density Lipoprotein)

VIL1 : Villine 1

ZO : Zonula Occludens

ZO-1 : Zonula Occludens

PREAMBULE

Bien qu'utilisés depuis l'Antiquité pour protéger les cultures, les pesticides se sont très fortement développés avec l'apparition des produits de synthèse, après la seconde Guerre Mondiale. Au cours des années, l'évolution des connaissances et compétences a permis d'aller à l'encontre des ravageurs de cultures agricoles et les prémunir de maladies. Cela a ainsi augmenté considérablement la production alimentaire, essentielle face à une population mondiale grandissante. Ces produits ont alors constitué un progrès important dans l'augmentation des rendements, et donc, dans la maîtrise des ressources alimentaires, mais également dans l'amélioration de la santé publique. Depuis les années 50, les scientifiques se sont penchés sur l'étude des impacts de ces substances sur l'environnement et la santé humaine. La pollution environnementale et l'augmentation des maladies chroniques constituent désormais une réelle menace pour la santé humaine et animale. Mieux comprendre les impacts de diverses activités humaines, modes de vie et comportements sur les écosystèmes est très important pour avoir une meilleure connaissance et maîtrise de la montée de maladies chroniques et pour conduire les politiques publiques de prévention des risques. Comprendre l'exposition aux pesticides et leurs effets s'intègre ainsi au concept « One Health » (« une seule santé ») (Destoumieux-Garzón *et al.* 2018). Ces derniers temps, des programmes de prévention santé ont commencé à intégrer la notion de pesticides. Les Plans Nationaux Santé Environnement (PNSE) s'impliquent depuis plusieurs années dans la réduction de leurs usages. Ils ont permis, par exemple, l'interdiction définitive de l'épandage aérien de ces produits, de l'épandage terrestre à proximité des lieux accueillant des publics sensibles et enfin, de l'utilisation des pesticides chimiques par les collectivités. Le Programme National Nutrition Santé 4 (PNNS 4) (2019-2023) a pour objectif d'améliorer l'état de santé de la population en agissant sur l'alimentation pour limiter les maladies liées à celle-ci. Leurs nouvelles recommandations préconisent la consommation de produits de qualité et de saison, en choisissant des produits qui respectent l'environnement (agriculture biologique) afin de limiter l'exposition à des contaminants (comme des pesticides ou des métaux lourds) et d'aller vers une alimentation durable en harmonie avec l'environnement. L'ensemble de ces actions ne survient qu'après une meilleure connaissance des potentiels impacts des pesticides sur la santé humaine, et a pour but de réduire ces contraintes environnementales sur notre santé. Ces politiques de prévention s'astreignent également à réduire la prévalence de l'obésité, qui pourrait être liée à ces expositions environnementales. En effet, depuis 1975, la prévalence de l'obésité a triplé (OMS 2017). Celle-ci augmente le risque de développer des pathologies

métaboliques comme le diabète de type 2, des maladies cardiovasculaires, des cancers... De nombreux facteurs sont incriminés dans l'apparition de l'obésité : une alimentation souvent trop grasse et déséquilibrée chez des personnes prédisposées, mais aussi l'exposition répétée à des polluants environnementaux dont les pesticides. Comme tous les organophosphorés, le chlorpyrifos est suspecté d'avoir des conséquences sur la programmation du métabolisme de la phase fœtale à l'âge adulte (Slotkin 2011 ; Slotkin *et al.* 2005b). Cela pourrait s'expliquer, entre autres, par une accumulation des pesticides et de leurs métabolites dans les tissus adipeux pouvant induire des troubles métaboliques importants. Cette crainte est notable pour les populations les plus vulnérables, à savoir les jeunes populations. En effet, la période périnatale se caractérise par une plasticité maximale des systèmes physiologiques, ce qui explique la grande sensibilité de ces individus face aux facteurs environnementaux (programmation fœtale). L'exposition à des résidus de pesticides alimentaires, la malnutrition et l'obésité maternelles constituent un environnement à risque pour le métabolisme de leurs futurs enfants. En effet, l'homéostasie intestinale du fœtus et du jeune enfant peut être perturbée par de nombreux facteurs dès la naissance et pourrait induire des pathologies intestinales et métaboliques (obésité, diabète de type 2...). Des études précédentes du laboratoire ont démontré que l'exposition au CPF *in utero* avait des conséquences digestives (Joly Condette *et al.*, 2014, & 2015) mais également métaboliques. Nous pouvons alors nous interroger sur les effets de cette exposition maternelle environnementale associée à une alimentation déséquilibrée.

Nous émettons l'hypothèse que l'exposition maternelle à un pesticide et à un régime obésogène pourrait perturber l'homéostasie intestinale du futur enfant et avoir des effets à long terme sur sa santé. L'originalité de notre étude provient d'un potentiel effet cumulatif de facteurs environnementaux avant conception et jusqu'à la fin de la lactation et de ses effets éventuels sur la descendance. Les femelles ont été exposées au pesticide et à un régime obésogène durant une période pré-gestationnelle de 4 mois, puis pendant les périodes de gestation et de lactation. L'alimentation déséquilibrée, mimée expérimentalement par une exposition à du « high fat diet » pourrait modifier les effets potentiels du pesticide sur le développement, les fonctions digestives et le métabolisme hépatique de la descendance. Le caractère novateur de ce projet réside également dans la mise en place d'une co-culture de cellules épithéliales intestinales humaines permettant de mimer les effets du pesticide sur cette barrière intestinale et d'en évaluer les conséquences sur la perméabilité intestinale,

l'expression des protéines des jonctions serrées et des mucines et l'induction d'une inflammation et de ses voies de signalisation.

Ce projet de recherche a été financé par la Région Hauts-de-France ainsi que par une bourse ministérielle du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. Cette thèse a été menée conjointement par deux laboratoires d'expertises complémentaires : le laboratoire PériTox, au sein de l'UPJV, à Amiens et l'équipe PETALES de l'Unité Transformations et Agroressources (EA 7519), au sein de l'Institut Polytechnique UniLaSalle, Beauvais. De plus, une collaboration nous a permis d'approfondir les analyses sur notre modèle expérimental animal grâce aux dosages métaboliques et hormonaux réalisés par l'équipe de Biologie hormonale, du CHU Cochin, de l'Université Paris Descartes, à Paris.

Ce manuscrit débute par une synthèse bibliographique composée de trois chapitres traitant respectivement du pesticide d'intérêt, de l'obésité et de la physiologie intestinale. Puis les objectifs de l'étude seront présentés. La méthodologie de la thèse sera détaillée, suivie d'une présentation des résultats de mes travaux de recherche, sous forme de publications scientifiques. L'apport de ces résultats sera discuté dans une troisième partie ainsi que les perspectives associées et la conclusion du travail. Les figures que j'ai réalisées dans cet ouvrage, ont été créées à l'aide du logiciel BioRender.com sous un abonnement académique payant autorisant la publication de ces illustrations (BioRender, Toronto).

ETAT DE L'ART

EXPOSITION MATERNELLE AUX PESTICIDES : IMPACTS SUR LA SANTE

La dépendance actuelle de notre système alimentaire à l'utilisation de pesticides pour produire suffisamment et nourrir une population mondiale grandissante nous interroge sur les impacts de l'exposition à ces produits sur notre santé. Les produits phytosanitaires peuvent avoir des effets à plus ou moins long terme sur notre santé, notamment lors d'une exposition précoce.

1. Généralités

Les pesticides sont des produits utilisés pour lutter contre des organismes vivants considérés comme nuisibles. Le terme pesticide provient des mots latins *caedere* (tuer) et *pestis* (fléau). La réglementation européenne distingue les pesticides utilisés pour la protection des végétaux (90% agriculture, 10% zones non agricoles) aussi appelés produits phytosanitaires ou phytopharmaceutiques (règlement d'exécution (UE) n° 540/2011), de ceux utilisés pour préserver la santé humaine et animale, à usages domestiques ou industriels, appelés biocides. Ces derniers sont destinés à détruire, repousser ou rendre inoffensifs les organismes nuisibles. On recense parmi eux les désinfectants (hygiène, milieu hospitalier...), les produits de protection (conservation du bois...) ou encore les produits de lutte contre les nuisibles (insecticides, répulsifs comme les produits antipoux, antimites...) ... Ces appellations intègrent ainsi les produits antiparasitaires humains (Directive 2004/28/CE) et vétérinaires (Directive 2004/27/CE). Les pesticides sont retrouvés dans différents milieux (air, sol, eau...) et peuvent être plus ou moins persistants dans l'environnement. Les substances actives et les produits biocides font l'objet d'un règlement européen (règlement (UE) n°528/2012). Cette réglementation a pour but de protéger l'Homme et les animaux ainsi que leur environnement en limitant la mise sur le marché de ces produits. Cependant, leur forte utilisation questionne de plus en plus quant à leurs impacts sur notre santé et sur notre environnement. Il est maintenant établi qu'ils présentent des risques pour la population, et notamment pour les enfants. Les effets les plus connus sont les effets aigus (irritations, troubles neurologiques...). Les effets chroniques sont moins bien cernés, de par la difficulté à évaluer les expositions de la population, la latence d'apparition d'effets sur le long terme, des effets cocktails...

2. Classifications des pesticides

Les pesticides peuvent être classés par cible, par structure chimique, ou par degré de toxicité.

2.1. Classement par cible

- Les insecticides (comme par exemple des organochlorés : Dichlorodiphényltrichloroethane (DDT) ou des organophosphorés : malathion, ou chlorpyrifos) sont destinés à lutter contre les insectes. Ils peuvent agir en tuant ou en empêchant la reproduction de ces derniers ;
- Les fongicides (le soufre, le cuivre) ont pour but d'éliminer les moisissures et autres champignons des plantes ;
- Les herbicides visent à lutter contre certains végétaux, utilisés, entre autres, pour détruire les herbes annuelles ou bisannuelles des cultures, mais également pour le désherbage des parcs, jardins publics et trottoirs.

Les pesticides peuvent avoir des cibles et usages plus spécifiques, tels que les acaricides (contre les acariens), les algicides (contre les algues), les bactéricides (contre les bactéries), les rodenticides (contre les rongeurs) (revue : Yadav and Devi, 2017).

2.2. Classement par toxicité aiguë

L'OMS utilise depuis 2009, une classification par risque de toxicité aiguë, basée notamment sur la DL50 (Dose Létale 50) cutanée et orale aiguë chez le rat (International Program on Chemical Safety *et al.* 2010). La DL50 est la quantité d'une matière, administrée en une seule fois, qui cause la mort de 50 % d'un groupe d'animaux d'essai. Cette classification permet de distinguer les pesticides les plus dangereux des moins ou peu dangereux (Tableau 1).

Tableau 1 - Classement OMS par degré de toxicité des pesticides (source : OMS)

Classement OMS		DL50 pour le rat (mg/kg poids corporel)	
		Voie orale	Voie cutanée
Ia	Extrêmement dangereux	< 5	< 50
Ib	Très dangereux	5–50	50–200
II	Modérément dangereux	50–2000	200–2000
III	Légèrement dangereux	Supérieur à 2000	Supérieur à 2000
U	Peu susceptible de présenter un danger aigu	5000 ou plus	

2.3. Classement par structure chimique

Les pesticides peuvent être également classés par famille en fonction de leur structure chimique. On distingue parmi elles :

- Les carbamates : sels ou esters de l'acide carbamique, toxiques par inhibition de l'acétylcholinestérase (AChE) ;
- Les organochlorés : molécules renfermant au moins une liaison carbone-chlore, retirées du marché de par leur persistance, accumulation et susceptibilité à être perturbateurs endocriniens et cancérigènes ;
- Les organophosphorés (OPs) : molécules ayant une liaison carbone-phosphore, qui sont non persistantes, peu sélectives, inhibitrices de l'AChE et généralement utilisées en insecticide (ex : chlorpyrifos) ;
- Les pyréthrinoïdes : esters de l'acide chrysanthème monocarboxylique, proches des pyréthrines naturelles dérivés des fleurs de chrysanthèmes, utilisés généralement en insecticide.

3. Distribution et utilisation des pesticides

3.1. Distribution des pesticides pour des usages agricoles

3.1.1. Dans le monde et en Europe

Le système agricole actuel est dépendant de l'utilisation de produits phytosanitaires dans les pays développés ou en développement. La Food and Agriculture Organisation of the United Nations (FAO) met à disposition et à jour une base de données d'utilisation des pesticides à partir de données des ventes de ces produits phytosanitaires pour des usages agricoles dans le monde entre 1990 et 2017. On note une constance des ventes mondiales de pesticides ces quinze dernières années (Figure 1).

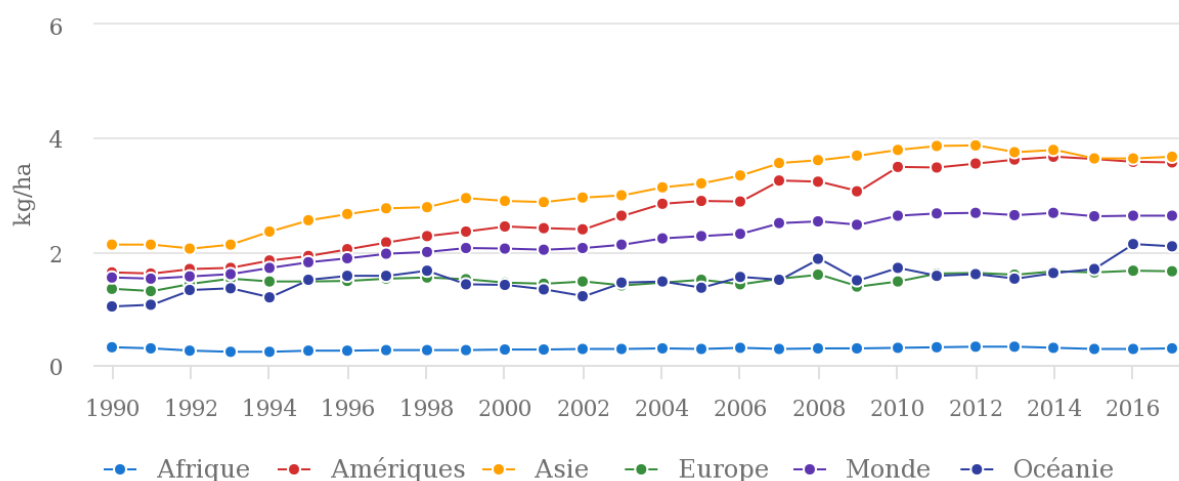


Figure 1 - Répartition des achats de pesticides ramenés à l'hectare par continent de 1990 à 2016
(source : FAOSTAT)

Concernant les ventes de pesticides rapportées à la surface agricole, la moyenne mondiale est de 2,63 kg/ha en 2017. La France est légèrement au-dessus avec une utilisation de 3,63 kg/ha, mais bien loin de nombreux pays comme la Chine (13,07 kg/ha), l'Israël (12,61 kg/ha) ou encore le Japon (11,76 kg/ha). Elle se situe ainsi dans la moyenne européenne (3,6kg/ha) en 2017 derrière différents pays comme les Pays-Bas (7,9 kg/ha), la Belgique (6,7 kg/ha), l'Irlande (6,5 kg/ha), l'Italie (6,1 kg/ha), l'Espagne (5,4 kg/ha) et l'Allemagne (4,0 kg/ha) par exemple (Figure 2).

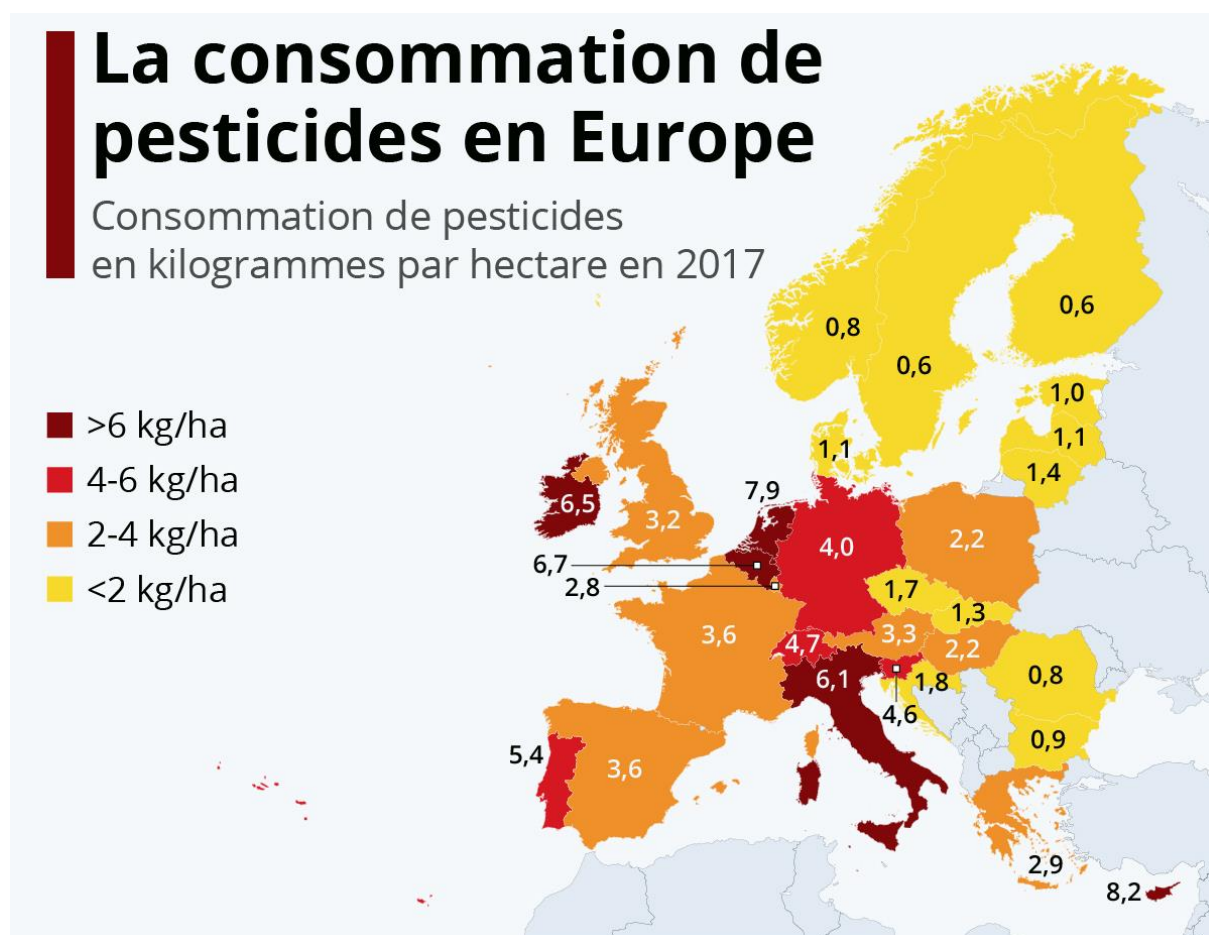
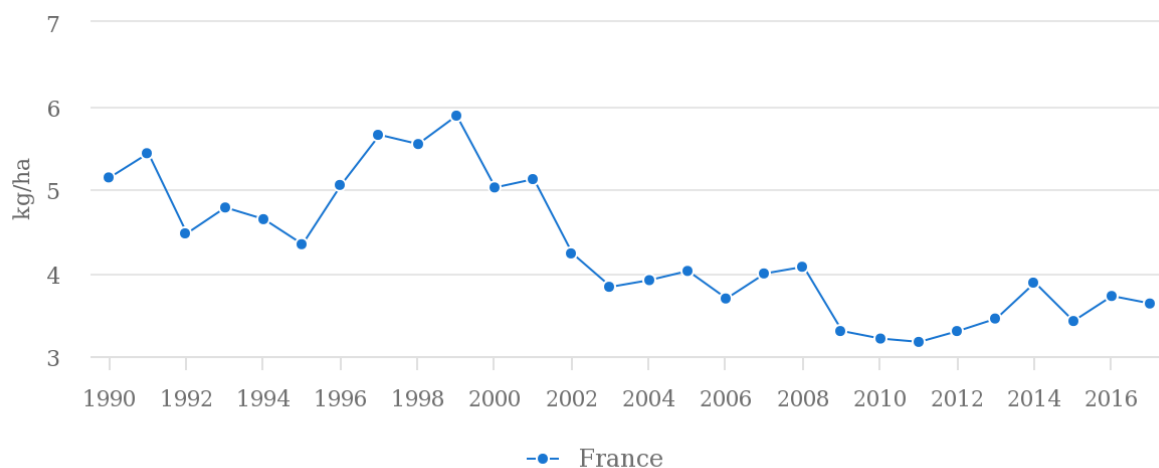


Figure 2 - Utilisation mondiale de pesticides en 2017 (kg/ha) (source : FAOSTAT)

3.1.2. En France

3.1.2.1. Utilisation agricole : généralités

Depuis les années 2000, la France tend à diminuer son utilisation agricole de produits phytosanitaires (Figure 3). Les données de la Banque Nationale des ventes de produits phytopharmaceutiques sont actualisées chaque année grâce aux déclarations des bilans annuels de ventes de produits phytosanitaires par les distributeurs agréés depuis 2009. Elle indiquait pour la période 2016/2017, une vente de 70 000 tonnes/an.



Source: FAOSTAT (août 06, 2020)

Figure 3 – Achats de pesticides par superficie de terres cultivées en France entre 1990 et 2017 (source : FAO)

Si l'on regarde la disparité par région, la Nouvelle Aquitaine se retrouve en tête (9 141 tonnes achetées en 2017), suivie des Hauts-de-France (8 475 tonnes), responsable de 12 % des achats de pesticides agricoles de France en 2017 (Figure 4A).

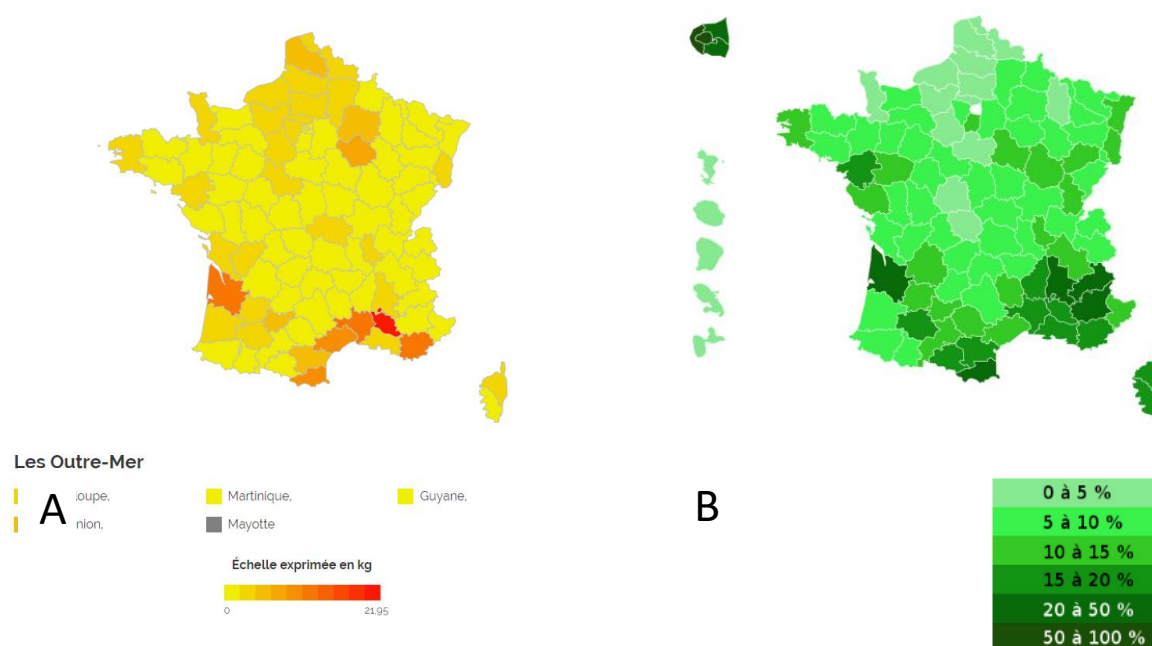


Figure 4 – (A) Carte de vente des pesticides par département par hectare de surface agricole utilisée (kg/ha) en 2017 (source : Générations Futures Novembre 2018) et (B) le % d'exploitations engagées dans une démarche de réduction des produits phytosanitaires par rapport au nombre total d'exploitations du département (source : ministère de l'agriculture et de l'alimentation 19/04/2019)

Il est intéressant de noter que de nombreuses exploitations se sont engagées dans une démarche de réduction des produits phytosanitaires (Figure 4B). Les Plans Nationaux Santé Environnement (PNSE1 : 2004-2008, PNSE2 : 2009-2013, PNSE3 : 2015-2019, PNSE 4 : 2020-2024), initiés par la loi du 9 août 2004 relative à la politique de santé publique, visent à étudier les conséquences sanitaires de l'exposition à différentes pollutions environnementales. On y retrouve entre autres, l'estimation de l'exposition de la population aux pesticides (PNSE1, action 36), l'amélioration des connaissances sur les expositions aux pesticides (PNSE2, action 6) et le renforcement du suivi des expositions professionnelles (PNSE2, action 12). Au sein du PNSE2, suite au Grenelle de l'environnement en 2008, le plan Écophyto a vu le jour pour réduire l'utilisation des produits phytosanitaires en France en maintenant une agriculture économiquement performante. Initialement, le plan Ecophyto avait pour objectif de réduire de 50 % l'utilisation de ces substances. Ledit objectif a été prolongé à l'échéance 2025 face aux difficultés de mise en œuvre.

3.1.2.2. Utilisation des OPs

Dans notre étude, la famille de pesticides d'intérêt est la famille des OPs. Ces pesticides ont commencé à être synthétisés au début du XIX^{me} siècle. Ils ont été fortement développés lors de la seconde Guerre Mondiale comme composés de haute toxicité humaine et de haute volatilité, à utiliser comme gaz toxiques (Koelle 1963). Depuis, de nombreux composés OPs ont été fabriqués et commercialisés dans le monde sous forme d'insecticides de formulation variable pour leur usage agricole. Leur utilisation a bondi dans les années 1970, suite aux interdictions des insecticides organochlorés très utilisés jusqu'alors. Bien que leur emploi soit en constante diminution, ils sont fortement appliqués en Europe de par leur large spectre d'action et leur coût d'utilisation faible (Costa 2018) (Figure 5). On note parmi les OPs le malathion, le parathion, le diméthoate, le fenthion ou le chlorpyrifos.

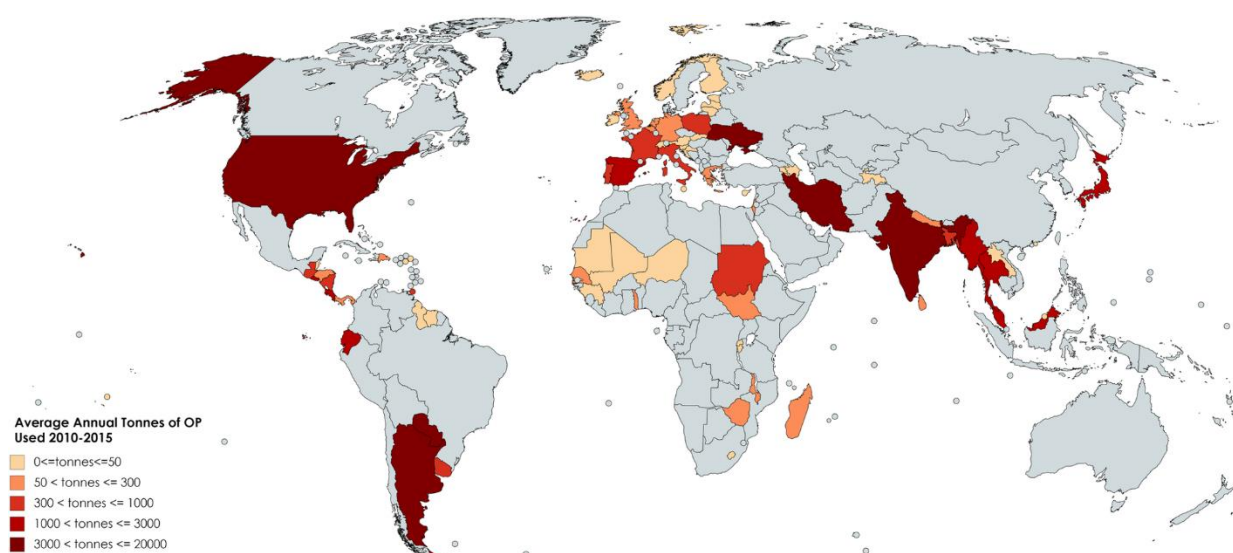


Figure 5 - Tonnages moyens de l'utilisation agricole des OPs, par pays (2010–2015)(Hertz-Picciotto et al. 2018)

3.2. Utilisation des pesticides non agricole

Cependant, l'utilisation de ces substances ne se résume pas à l'usage agricole. Ces produits sont omniprésents dans notre quotidien. La population générale les utilise au sein de son domicile et y est exposée dans son environnement. En effet, les communes en utilisaient pour l'entretien des espaces verts, des parkings, trottoirs mais aussi des voies ferrées et des routes. Ils entrent dans la composition de désinfectants, insecticides (ex : produits anti-mites, anti-poux ou anti-moustiques) et produits de protection (ex : bois ou cuir). Ces produits sont très réglementés pour protéger la santé de la population et l'environnement. Leur mise sur le marché est encadrée par le règlement européen (UE) n° 528/2012 ainsi que l'évaluation des substances actives biocides (efficacité et risques). En France, la délivrance, la modification et le retrait des Autorisations de Mise sur le Marché (AMM) s'effectuent depuis 2016 par l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de L'Environnement et du travail (ANSES) (Ministère de la Transition Ecologique 2020). Les lois : loi n° 2014-110 du 6 février 2014 dite « loi Labbé » et loi n°2015-992 du 17 août 2015 dite « loi relative à la transition énergétique pour la croissance verte », qui modifie l'article 68 de la « loi labbé », permettent un meilleur encadrement de l'utilisation des biocides en France. De ce fait, depuis 2017, les collectivités et établissements publics ne sont plus autorisés à utiliser ces produits pour l'entretien des voiries, des espaces verts, des forêts et chemins accessibles au public. Concernant les particuliers, la vente libre de ces produits a été interdite en 2017, et leur

utilisation en 2019. L'étude Pesti'home publiée par l'ANSES en 2019 relate que 75 % des ménages répartis sur l'ensemble du territoire ont utilisé au moins une fois un pesticide en 2013, et davantage au sein du domicile qu'à l'extérieur. Sont recensés parmi eux les insecticides (utilisés par 84 % des ménages ayant utilisé des pesticides), puis des herbicides (22 %). Enfin, des études épidémiologiques américaines ont révélé des données concernant l'exposition résidentielle de femmes enceintes aux pesticides dans les années 2000. Ils indiquent que 71,5 % d'entre elles ont été exposées à ces produits lors de leur grossesse (Berkowitz *et al.* 2004) ou 84-86 % dans une autre étude (Whyatt *et al.* 2004).

4. Exposition

4.1. Généralités

L'exposition à une substance chimique peut induire des effets toxiques sur notre organisme. Ces derniers dépendent de l'intensité, de la voie, de la fréquence et la durée de l'exposition. Ils varient aussi selon les individus, leur sexe, âge et état de santé. Ils peuvent être effectifs immédiatement ou plus tardifs, être réversibles ou non. L'effet toxique augmente souvent avec le niveau d'exposition : ce phénomène est appelé la relation dose-effet. Les professionnels de santé publique ont défini des Valeurs Toxicologiques de Référence (VTR) en fonction de l'exposition à ces substances chimiques. Les dangers sont multiples : changements dans la morphologie, la physiologie, la croissance, le développement ou la durée de vie d'un organisme. L'effet de seuil, quant à lui, est un effet qui survient au-delà d'une certaine dose administrée. En-dessous, le risque est considéré comme nul, et au-dessus, la dangerosité augmente avec la dose. Lors d'une exposition orale, les VTRs sont exprimées en masse de substance par kilogramme de poids corporel et par jour (mg/kg de p.c/j). Cette donnée indique l'estimation de la quantité de produit à laquelle un individu peut théoriquement être exposé sans constat d'effet nuisible, sur une durée déterminée en l'état actuel des connaissances appelée « Dose Journalière Admissible (DJA) ».

L'exposition aux pesticides peut être professionnelle, domestique ou via l'environnement résidentiel. Les voies d'exposition sont l'ingestion, l'inhalation et/ou le passage cutané. Elle dépend également de la fréquence d'utilisation du produit et de l'intensité du contact variable selon l'individu, sa profession, son alimentation, son lieu de résidence... L'exposition aux pesticides peut être aiguë ou chronique :

- L'exposition aiguë est caractérisée par une exposition très importante et ponctuelle, lors d'un accident par exemple, au cours d'une utilisation professionnelle ou bien à visée suicidaire. Les effets de cette exposition dépendent de la voie de pénétration dans l'organisme, des caractéristiques et de la quantité du produit. Ces effets déterminent la DL50 dans les études toxicologiques ;
- L'exposition chronique, quant à elle, est définie par une exposition répétée, bien souvent à de faibles doses, pouvant générer une bioaccumulation et provoquer des effets à court ou long terme.

L'OMS définit l'alimentation comme première source d'exposition aux pesticides, bien que la population soit exposée à d'autres sources telles que la contamination de l'air, des sols, l'utilisation de pesticides dans les jardins ou sur les animaux domestiques. L'ANSES, dans un rapport de l'exposition de la population générale aux résidus de pesticides en France de 2010, confirme que la population française est exposée de manière répétée à de faibles doses de pesticides, bien que sa source soit difficilement déterminée de part sa multiplicité (Figure 6) (ANSES 2018).

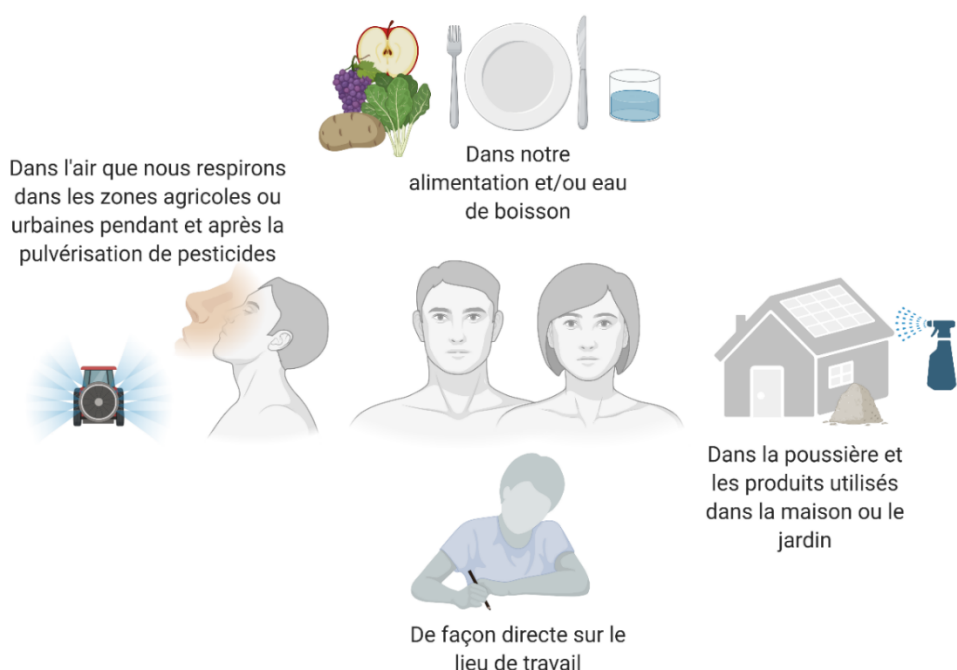


Figure 6 - Sources d'expositions aux pesticides (création personnelle sur BioRender.com)

Afin de quantifier l'imprégnation liée à une exposition, l'utilisation de biomarqueurs est requise. Les pesticides ou leurs métabolites peuvent être dosés dans des matrices humaines, généralement les urines, le sang, les cheveux et plus rarement dans le sang de cordon, le lait

maternel et le méconium. En 2003, l'Etat français a créé l'observatoire des résidus de pesticides afin d'évaluer l'exposition aux pesticides de la population française et de notre environnement. L'ANSES coordonne cette structure depuis 2010.

4.2. Exposition dans notre alimentation et boisson

La contamination de notre alimentation par les pesticides constitue la voie d'exposition la plus importante. Elle est donc très réglementée pour garantir une faible exposition des consommateurs. Son niveau est réglementé par la Commission Européenne, notamment grâce aux Limites Maximales de Résidus (LMR), niveau maximum acceptable de résidus de pesticides retrouvé dans notre alimentation (Règlement n° 396/2005). Les LMR permettent de faire le lien entre les bonnes pratiques en agriculture, et l'exposition du consommateur par son alimentation, afin de ne pas exposer la population à des risques trop importants pour sa santé. Chaque année, les LMR sont contrôlées et analysées par l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (European Food Safety Authority) (EFSA). En 2016, en Europe, 1,7 % des contrôles dépassaient ces limites (EFSA 2018). En France, la Direction Générale de l'Alimentation gère la mise en œuvre de plans de surveillance et de contrôle afin de surveiller la contamination des productions primaires animales et végétales, des denrées alimentaires d'origine animale et de l'alimentation animale. Concernant les produits issus de l'importation, la Direction générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes (DGCCRF) contrôle la présence des résidus de pesticides. Afin de caractériser le risque alimentaire chronique de ces substances, l'exposition est estimée par la méthode de l'Apport Journalier Estimé (AJE), qui étudie les denrées consommées connues pour être contaminées, comparativement à la DJA. Concernant l'eau potable, les contrôles sanitaires permettent de connaître les contaminations en pesticides. En France, ils sont disponibles sur le site du Ministère de la santé ainsi que sur les factures d'eau avec une synthèse de la qualité de l'eau réalisée par l'Agence Régionale de la Santé. En 2012, en France, 4,5 % de la population était alimentés par une eau non conforme aux limites de quantité de résidus de pesticides autorisés (EauFrance, 2016). De plus, l'Etude de l'Alimentation Totale (EAT 2) de l'ANSES qui a porté sur l'analyse de l'alimentation française (près de 20 000 produits alimentaires représentatifs de la consommation de la population) a mis en lumière lors du programme de surveillance de 2010-2011, que la moitié des aliments analysés, présentait au moins une substance détectée de

résidus de pesticides. Le chlorpyrifos-méthyl et le chlorpyrifos-éthyl faisaient partie des substances retrouvées (ANSES 2011).

4.3. Exposition dans l'environnement et résidentiel

Outre l'alimentation, l'exposition aux pesticides peut s'effectuer par des contaminations de l'air, extérieur et/ou intérieur ; par les sols et poussières... Cette exposition est liée à l'utilisation agricole et domestique des pesticides. Concernant les milieux aquatiques, le Service de l'Observation et des Statistiques du Ministère de l'Ecologie recensait en 2006 que 90 % des points de mesures de la qualité des eaux superficielles et 47 % des eaux souterraines contenaient au moins un pesticide. Dans l'air, 12 % des mesures réalisées détectaient au moins un pesticide. Les concentrations observées, et notamment les plus élevées, sont largement corrélées aux périodes d'utilisation agricole des pesticides. Cependant, il n'existe pas de données de contamination de l'air ambiant par les pesticides à l'échelle des villes, bien que des campagnes de mesures voient le jour, notamment dans le cadre de Plans Régionaux Santé Environnement. L'ANSES a également commencé des travaux étudiant les modalités de la mise en œuvre d'une telle surveillance depuis 2018. Cependant, l'exposition par voie aérienne de la population intervient principalement dans les milieux fermés. C'est pourquoi les données des biocides seraient alors plus pertinentes à prendre en compte que les données agricoles. Les usages domestiques entraînent à la fois une exposition directe des personnes occupant le domicile lors de l'utilisation, mais aussi une contamination de l'environnement, puisque les substances restent présentes dans les poussières de logement (Colt *et al.* 2004). La population générale est alors particulièrement exposée aux OPs, mais également, dans une moindre mesure, aux pyréthriinoïdes et aux carbamates. Une étude confirme que l'utilisation résidentielle d'insecticides, la présence d'animaux de compagnie et la vie à proximité de champs induisent des taux de métabolites de pesticides urinaires élevés dans la population concernée (Bouvier *et al.* 2005).

5. Les organophosphorés

5.1. Présentation générale du chlorpyrifos (CPF)

Dans notre étude, le pesticide représentant de la famille des OPs que nous avons utilisé est le chlorpyrifos (CPF). Cet insecticide existe sous deux formes, le CPF-méthyl et le CPF-éthyl. La forme étudiée dans ce travail est la seconde, communément appelée chlorpyrifos (O, O-diethyl O-3,5,6-trichloropyridin-2-yl phosphorothioate). Sa formule chimique est $C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$ et son n° CAS est le 2921-88-2. Mise sur le marché en 1965 comme une alternative au DDT, ses effets sur la santé humaine, et plus précisément sur le neurodéveloppement des jeunes populations à risque, ont restreint ses usages. Il est noté dans le classement des pesticides par degré de toxicité de l'OMS, soit modérément dangereux. Ce pesticide est ainsi au cœur de nombreuses études depuis les années 2000 (Figure 7).

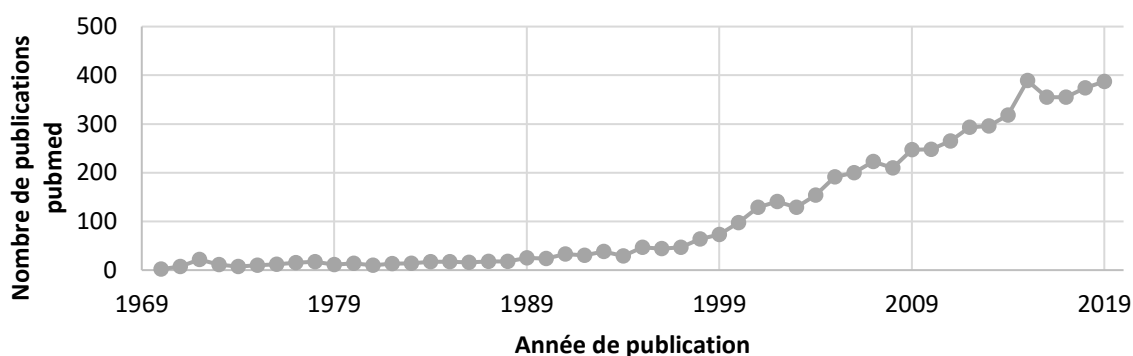


Figure 7 - Nombre de publications référencées sur pubmed incluant le mot "chlorpyrifos" entre 1969 et 2019 (création personnelle)

5.2. Règlementation du CPF

Commercialisée depuis 1965 par Dow Chemical aux USA puis dans le monde, cette substance active est inscrite au niveau européen à l'annexe I de la directive 91/414/CEE sur la mise sur le marché de pesticides. Une ré-évaluation a eu lieu en 1992, lorsque le règlement (CEE) n°3600/92 de la Commission Européenne (CE) a modifié la réglementation. Le CPF a été ensuite réévalué et ainsi, le règlement (CE) n°396/2005 du Parlement européen a conclu que les résidus de ce pesticide résultant des bonnes pratiques phytosanitaires, n'ont pas d'effets nocifs sur la santé humaine ou animale, ni sur l'environnement. Il a été approuvé en 2009 à la Régulation du règlement (CE) n°1107/2009 du Parlement européen du Conseil relative à la mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques. En 2011, dans le règlement d'exécution (UE) n°540/2011, les États membres ont demandé des études

complémentaires pour confirmer l'évaluation des risques pour les oiseaux et les mammifères, précisant que seules les utilisations en tant qu'insecticide pouvaient être autorisées. Le règlement d'exécution (UE) n°762/2013 de la commission du 7 août 2013 modifie le règlement d'exécution (UE) n°540/2011, et indique que les approbations de la substance active du CPF expireront en juin 2016. Cette période d'approbation a ensuite été prolongée à trois reprises : Règlement d'exécution (UE) n°762/20136, n°2018/848 et n°2018/17969. A partir de 2016, en France, cette substance active n'a plus été autorisée que pour la culture d'épinards dans la formulation du Pyristar. En 2018, le règlement (UE) n°2018/686 a modifié les LMR du CPF du règlement (CE) n°396/2005. L'EFSA a décelé l'existence d'un risque pour les consommateurs. Elle a recommandé d'abaisser les LMR pour de nombreux fruits (coings, abricots, cerises) et certains légumes (potirons, maïs, brocolis, choux) ainsi que les volailles. Suite à cela, en 2019, et suite à la demande de la CE, des experts de l'EFSA ont publié un rapport relatant des problèmes de santé humaine liés à une exposition au CPF, et ont conclu que les critères d'approbation de ce pesticide pour la santé humaine définis précédemment dans la législation européenne n'étaient pas remplis. La CE a alors retiré ces substances actives du marché. Fin 2019, les états membres du comité permanent des plantes, des animaux, des denrées alimentaires et des aliments pour animaux, n'ont pas renouvelé les approbations du CPF, compte tenu des préoccupations relatives à la génotoxicité et la neurotoxicité développementales. La CE a adopté le règlement d'exécution (UE) n°2020/17. Ainsi, depuis 2020, ces produits phytopharmaceutiques ne peuvent plus être mis sur le marché ni utilisés dans l'UE. Les États membres ont approuvé une proposition de la CE visant à abaisser les LMR du CPF dans les denrées alimentaires et les aliments pour animaux. Elles sont devenues applicables fin 2020 et s'appliquent à la fois aux denrées alimentaires produites dans l'UE et aux importations.

5.3. Mode d'action et toxicité des OPs

Les OPs sont distribués par voie sanguine principalement dans le tissu adipeux, les reins, le foie et le cerveau après leur absorption. Ils sont rapidement métabolisés par le foie et excrétés principalement dans les urines ou stockés dans le tissu adipeux. L'un des principaux mécanismes d'action de ces pesticides, l'inhibition de l'AChE, a été découvert dans les années 30 (Costa 2018). La structure chimique des OPs se caractérise par une structure incluant : un

phosphore pentavalent lié par une double liaison à un soufre ou un oxygène, deux substituants R1 et R2 très stables face à l'hydrolyse, et un groupe X partant éliminé lorsque l'OP phosphoryle l'AChE, le plus sensible à l'hydrolyse (Figure 8).

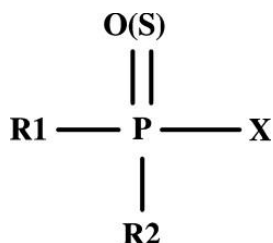


Figure 8 - Formule chimique des OPs

La minorité des OPs qui possède une fonction P=O constitue des inhibiteurs directs et rapides de l'AChE. Mais la majorité qui contient la liaison P=S (organothiophosphates) inhibe indirectement cette enzyme, après métabolisation en leur composé actif et toxique P=O. (Jokanović 2001). Cette bioactivation est donc une désulfuration oxydative sous l'action d'enzymes du cytochrome P450 (CYP450). Les groupements P=O inhibent l'AChE, enzyme terminant la neurotransmission en hydrolysant l'acétylcholine (ACh), neurotransmetteur majeur des systèmes nerveux central et périphérique. Plus précisément, les OPs viennent occuper, en le phosphorylant, le site estérasique de l'enzyme AChE. Cette inhibition induit un excès d'ACh, provoquant une sur-stimulation des récepteurs cholinergiques (muscariniques et nicotiniques) principalement du système nerveux (Casida and Durkin, 2013 ; Thabet et al., 2009) et font des OPs des neurotoxiques. Cependant, ces effets sur l'activité de l'AChE induisent différents effets sur la santé humaine (Tableau 2), qui peuvent varier en fonction de l'individu, du pesticide, de la dose, de la voie d'exposition... (Eddleston *et al.* 2008).

Tableau 2 - Relation entre la sévérité clinique d'une intoxication aux OPs et l'inhibition de l'AChE traduit de (Thabet et al. 2009)

Activité AChE (%)	Degré de sévérité	Signes et symptômes
21–50	Léger	Myosis, hypersalivation, nausées, vomissements, diarrhées, douleurs abdominales, bradycardie...
11–20	Modéré	Altération de l'état de conscience, troubles de l'élocution, fasciculations musculaires, fièvre, hypersécrétion bronchique, hypertension artérielle
< 10	Sévère	Paralysie, œdème pulmonaire, détresse respiratoire, hypotension, coma, convulsions

5.4. Profil d'Absorption, de Distribution, Métabolisme et Excrétion (ADME) du CPF

5.4.1. Absorption orale du CPF

Le pesticide peut pénétrer dans l'organisme par différentes voies selon l'exposition. On peut quantifier cette absorption grâce à la corrélation entre les effets sur l'AChE et la dose d'exposition, ou en quantifiant le CPF et/ou ses métabolites dans les urines, ou autres matrices. Suite à une exposition dermale, l'absorption est estimée entre 1 % et 2,32 % chez l'Homme et serait détectable après 24 heures dans le sang (Griffin et al., 1999; Nolan et al., 1984). Elle est de 18 % à 93 % après une exposition orale, et détectable après 5 heures dans le sang selon la dose, la formulation et la forme physique du CPF (Griffin *et al.* 1999 ; Nolan *et al.* 1984 ; Timchalk *et al.* 2002). Elle atteint 80 % chez le rat après un gavage oral (Timchalk *et al.* 2002). De plus, chez des souris traitées au CPF (aiguë : 12,5 à 100 mg/kg et chronique : 2 à 25 mg/kg de 5 à 30 jours), indépendamment de la durée du traitement, l'effet d'inhibition dose-dépendante de l'activité cérébrale (de 0 à 31 %) et sérique (de 65 % à 93 %) de l'AChE a été observé à toutes doses (Cometa *et al.* 2007).

5.4.2. Distribution du CPF

Après son absorption dans l'organisme, le CPF atteint la circulation sanguine et est distribué dans l'organisme. Il s'accumulera dans divers tissus et organes, et plus particulièrement le

tissu adipeux (Bakke *et al.* 1976), en raison de sa forte lipophilie. Chez le rongeur, le CPF se stocke dans le tissu adipeux, le cerveau, le foie et les reins (Timchalk *et al.* 2002) .

Lors d'une exposition maternelle, du CPF radiomarqué (5,0 mg/kg) a été administré par voie intraveineuse à des rates gestantes. Le métabolite spécifique du CPF, le TCPy, a été retrouvé 5 minutes après l'injection dans le sang, le foie et le cerveau du fœtus ainsi que dans le placenta (Abdel-Rahman *et al.* 2002). Les distributions du CPF (9,6 à 15 mg/kg/j) chez des rates exposées par voie orale tout le long de la gestation ont été étudiées à l'aide de CPF radioactif. Des résidus de ce pesticide ont été retrouvés chez le fœtus en fin de gestation dans le foie, le cerveau, le placenta et le liquide amniotique (Akhtar *et al.* 2006). Dans une autre étude, lorsque des rates gestantes sont exposées au CPF (7 à 10 mg/kg/j) par voie orale en fin de gestation, le temps d'inhibition maximale de l'ACHé était le même pour le cerveau maternel et fœtal. Cependant, le degré d'inhibition de l'ACHé cérébrale fœtale était inférieur à celui de la mère, expliqué par un potentiel de désintoxication des tissus fœtaux plus faible chez les fœtus (Lassiter *et al.* 1998). Des rates exposées par voie orale à ce même pesticide (1 mg/kg/j) en période de la lactation ont présenté des concentrations mesurables de CPF, beaucoup plus élevées dans le lait maternel que dans le sang du fœtus (200x) (Mattsson *et al.* 2000). Ceci peut s'expliquer par sa forte lipophilie, le lait maternel étant riche en lipides. Les datas expérimentales relatives à l'exposition maternelle ont été confirmées dans une étude épidémiologique américaine dans laquelle des femmes enceintes exposées au CPF, du fait de leur utilisation résidentielle, présentaient du CPF dans le sang et dans le cordon ombilical. Ces travaux pointent un passage du CPF à travers la barrière placentaire (Whyatt *et al.* 2005). L'exposition maternelle peut donc s'effectuer via le passage du pesticide de cette barrière avant la naissance et/ou via le lait maternel après la naissance.

5.4.3. Métabolisme du CPF

La métabolisation du CPF commence par une bioactivation du celui-ci par désulfuration oxydative dans le foie par le CYP450 formant un métabolite toxique, le CPF-oxon, responsable de sa toxicité. Ce dernier ou le CPF lui-même peut être détoxifié par une réaction de désarylation en diéthylphosphate (DEP) et 3,5,6-trichloro-2- pyridinol (TCPy) et en diethylthiophosphate (DETP) (Chambers et Chambers 1989 ; Ma et Chambers 1994). Ce

métabolisme est très rapide et important. Il est à noter que 75 % des OPs sont bio-transformés en DETP et DEP, métabolites communs à cette famille de pesticides (Bravo *et al.* 2004).

5.4.4. Élimination du CPF

Chez le rat, après une exposition orale, les métabolites du CPF sont présents à des taux détectables dans l'urine des rats de 12 heures à 72 heures après exposition. Les principaux métabolites urinaires retrouvés étaient le TCPy (62 %), le DETP (40 %) et le DEP (4 %)(Timchalk *et al.* 2007). Le CPF est retrouvé dans le lait maternel de rates exposées par voie orale au CPF (0,3, 1,0 ou 5,0 mg/kg) (Mattsson *et al.* 2000). Ces données ont été confirmées chez l'Homme (Sanghi *et al.* 2003). Après une absorption orale ou cutanée (dermique), une grande partie des toxiques est éliminée dans les urines humaines. Le CPF et le CPF-oxon n'ont pas été retrouvés dans cette matrice mais uniquement ses métabolites (Bicker *et al.* 2005 ; Griffin *et al.* 1999 ; Nolan *et al.* 1984 ; Timchalk *et al.* 2002). Ainsi, le CPF et ses métabolites sont recherchés majoritairement dans les urines et le sang, le méconium, voire le sang de cordon pour évaluer l'exposition du fœtus (Ostrea *et al.* 2009).

5.5. Toxicité du CPF

Le CPF a le même mode d'action que sa famille de pesticides, les OPs. C'est donc un inhibiteur de l'AChE. Cette perturbation induit des effets à court et à long terme, en fonction de la dose et de la voie d'exposition.

5.5.1. Toxicité aiguë

Selon l'agence américaine de la protection de l'environnement et l'OMS, le CPF est classé II (modérément dangereux). Les valeurs de DL50 orale du CPF chez le rat Wistar sont pour les mâles : 163 mg/kg ; et pour les femelles : 135 mg/kg (McCollister *et al.* 1974).

Chez l'Homme, la dose de référence aiguë selon l'Agence de Réglementation de la Lutte Antiparasitaire en 2003 était de $7,5 \times 10^{-4}$ mg/kg/j pour les nourrissons et les enfants de moins de 12 ans ; 0,001 mg/kg/j pour les femmes de 13 à 50 ans en âge de procréer ; et 0,01 mg/kg/j pour le reste de la population. L'agence américaine de la protection de l'environnement donne lui la valeur de 0,0036 mg/kg/j pour la population générale, incluant les bébés et les enfants. Enfin, selon l'OMS, la dose de référence aiguë pour l'Homme est de 0,1 mg/kg/j (FAO 2004).

5.5.2. Toxicité chronique

La dose sans effet nocif observable (NOAEL) du CPF selon l'EFSA en 2019 est définie pour une exposition chronique par voie orale chez le rat à 1 mg/kg/j correspondant à la dose induisant une inhibition de l'AChe (EFSA 2019). Le seuil de neurotoxicité aiguë chronique (1mois) est estimé à 10 mg/kg/j. La DJA qui correspond à la NOAEL/100 est alors de 0,01 mg/kg de p.c/j. Si le CPF exerce une toxicité aiguë sur le système nerveux, de nombreuses publications établissent le lien entre l'exposition aux pesticides et l'augmentation de l'incidence des maladies chroniques (cancer, troubles de la reproduction, maladies cardiovasculaires et respiratoires, troubles du développement, troubles métaboliques...) (revue : Eaton et al., 2008). Une revue fait le point sur les effets des pesticides sur la santé humaine, et note des impacts sur l'incidence de diverses maladies malignes, neurodégénératives, respiratoires, reproductives, développementales et métaboliques (Mostafalou et Abdollahi 2017). Elles indiquent notamment que les OPs sont des facteurs de risque prédisposants à l'obésité et au diabète, mais les mécanismes impliqués semblent encore mal connus (Czajka *et al.* 2019) (Figure 9).

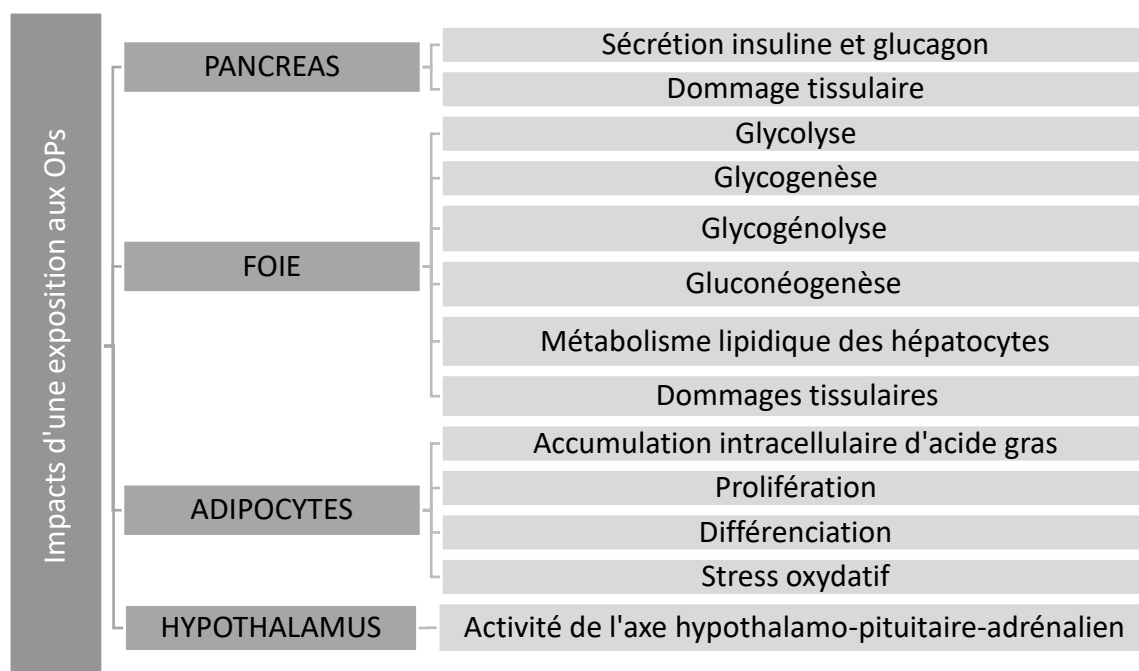


Figure 9 - Impacts des OPs – traduit de (Czajka et al. 2019)

5.6. Effets des OPs en périnatalité sur la santé

En plus de l'inhibition de l'AChe, d'autres mécanismes sont probablement impliqués dans les effets à long terme de l'exposition fœtale ou néonatale aux OPs (Slotkin 1999). Les populations

les plus vulnérables à ces substances toxiques sont les fœtus et jeunes enfants (Furlong *et al.* 2005), en raison de capacités métaboliques encore immatures et d'une sensibilité accrue à l'inhibition de l'ACHé (Kousba *et al.* 2007). De nombreuses études ont révélé les effets neurotoxiques à la suite d'une exposition périnatale à ces pesticides (revue : Muñoz-Quezada *et al.*, 2013), même à des doses inférieures à celle induisant une inhibition de l'ACHé cérébrale (Ricceri *et al.* 2006). La vulnérabilité développementale au CPF devrait être étendue de la période embryonnaire à la vie postnatale, voire la vie de jeune adulte de l'individu (Slotkin 1999). Dans une étude précédente au sein du laboratoire, il a été montré que des ingestions répétées de faibles doses de CPF par la mère pendant le développement fœtal induisaient des effets neurologiques à long terme sur la descendance, y compris des troubles du comportement et un retard d'acquisition avec des conséquences ultérieures à l'âge adulte (Laporte *et al.* 2018). Il a également été montré que l'exposition au CPF pendant la gestation et le développement induisait des altérations anatomo-fonctionnelles à court et long terme sur le tube digestif (Joly Condette *et al.* 2015). Des études supplémentaires ont analysé l'exposition au CPF et d'autres pesticides (imidaclopride (néonicotinoïde), cyhalothrine (pyréthrianoïde) et oxamyl (carbamate)) pendant la période de gestation. Elles ont indiqué que l'exposition périnatale induisait un stress oxydant et une peroxydation lipidique chez les descendants de rats femelles Wistar. La persistance de ces altérations à l'âge adulte suggère des effets indésirables transgénérationnels (Ndonwi *et al.* 2019). L'exposition maternelle au CPF a un impact sur le métabolisme du glucose et des lipides, aboutissant au prédiabète chez la descendance (Slotkin 2011). Cette exposition est un facteur de risque reconnu d'obésité (Lassiter et Brimijoin 2008) et est responsable de la toxicité maternelle et développementale (Maurissen *et al.* 2000). Une revue récente a indiqué que l'exposition aux OPs pourrait être hépatotoxique, induire une inflammation et un stress oxydant, et entraîner une hyperglycémie et d'autres altérations du métabolisme du glucose chez la descendance (Czajka *et al.* 2019).

L'omniprésence de pesticides dans notre environnement nous expose au quotidien à ces substances toxiques, par différentes voies d'exposition et à différentes doses. Cette exposition peut conduire à des perturbations métaboliques importantes, et pourrait être un facteur prédisposant l'individu au développement d'une obésité et d'un diabète, avec des mécanismes encore inconnus et à explorer. L'exposition aux pesticides, plus particulièrement au cours des premiers jours de la vie, et/ou par une exposition maternelle, peut avoir des effets à long terme sur la santé, et être un facteur de risque pour de nombreuses maladies chroniques.

OBESITE ET DESEQUILIBRE ALIMENTAIRE MATERNELS : IMPACTS SUR LA SANTE

L'augmentation constante de la prévalence de l'obésité, et la pandémie actuelle, placent cette maladie en tête des enjeux de santé publique du XXI^{ème} siècle. L'obésité augmente fortement le risque de développer des maladies métaboliques comme le diabète de type 2, des maladies cardiovasculaires, des cancers... De ce fait, la recherche actuelle vise à mieux comprendre l'origine de cette pathologie et notamment la contribution de facteurs environnementaux.

1. Définition de l'obésité

L'obésité est définie comme un excès de masse grasse qui peut nuire à la santé et réduire l'espérance de vie. Cette maladie chronique métabolique est caractérisée par une augmentation du nombre et/ou de la taille des cellules adipeuses. L'obésité est diagnostiquée, depuis 1842, par l'IMC (Indice de Masse Corporelle). Il est calculé selon : poids en kg/taille² en mètre (Khosla et Lowe 1967). Selon la classification de l'OMS, le surpoids comprend un IMC entre 25 et 30, et l'obésité un IMC > 30. On distingue trois classes d'obésité : l'obésité modérée ou de classe I pour un IMC entre 30 et 35 ; l'obésité sévère ou de classe II entre 35 et 40 ; l'obésité morbide ou de classe III > 40 (OMS 2020). L'IMC moyen en France en 2012 était de 25,4 kg/m² (Obepi-Roche 2012). Il existe une relation entre l'IMC et des risques de mortalité (Manson *et al.* 1995) et de comorbidités comme le diabète de type 2 (Colditz 1995) ou des maladies cardiovasculaires (Willett 1995). Il a été montré récemment qu'un IMC élevé est un indicateur prédictif de la gravité de l'intoxication d'une exposition aiguë aux OPs chez l'homme, en particulier les pesticides hautement lipophiles comme le CPF (Lee *et al.* 2014). Cependant, la composition corporelle peut varier d'un individu à l'autre et dans certaines conditions, ne pas être représentative d'un excès de tissus adipeux pathologique. Cela est le cas pour les femmes enceintes ou pour les sportifs de haut niveau, qui présentent un IMC élevé sans pour autant présenter d'excès de masse grasse. De plus, celui-ci ne représente à l'heure actuelle qu'un index approximatif pour estimer le degré d'adiposité de la population (Prentice et Jebb 2001). Il ne renseigne ni sur la présence ou l'absence de troubles métaboliques, ni ne détecte l'augmentation de l'adiposité. Des personnes présentant un IMC

dit « normal » peuvent avoir jusqu'à 30 % d'élévation de graisse corporelle, et ainsi présenter un degré élevé de dérégulation métabolique, d'inflammation et un risque accru de mortalité (Oliveros *et al.* 2014). De plus, les conséquences sur la santé dans le cas de l'obésité sont plus liées à la localisation de l'excès de graisse corporelle qu'à un poids corporel élevé (Vague 1996). Ainsi, le tour de taille est un critère à prendre en compte car il témoigne de l'accumulation du tissu adipeux viscéral. On parle d'obésité abdominale lorsque sa valeur est supérieure à 102 cm chez l'homme, et 88 cm chez la femme (Pouliot *et al.* 1994). La graisse viscérale est associée à des risques cardiométaboliques et cardiovasculaires (Després Jean-Pierre 2012). Enfin, on peut associer un dosage des triglycérides (TGs) circulants. La notion de « taille hypertriglycémique » a été décrite pour diagnostiquer des personnes en situation de surpoids, d'obésité ou souffrant de syndrome métabolique (Lemieux Isabelle *et al.* 2000).

2. Prévalence de l'obésité

2.1. Au niveau mondial

En 2016, selon l'OMS, le surpoids concernait plus de 1,9 milliards d'adultes (39 % de la population adulte mondiale) et l'obésité plus de 650 millions d'adultes (13 % de la population adulte mondiale). Depuis les années 80, la prévalence mondiale de l'obésité a triplé. Les taux d'obésité dans le monde chez les enfants et les adolescents représentent près de 6 % chez les filles (50 millions) et près de 8 % chez les garçons (74 millions) en 2016.

2.2. En France

Selon l'étude OBEPI (2012), 32,3 % des français adultes sont en surpoids, et 15 % en obésité (dont 10,7% en obésité modérée, 3,1 % en obésité sévère et 1,2% en obésité morbide). Il est intéressant et optimiste de noter que l'on observe un ralentissement de la progression de l'IMC et du tour de taille moyens. La prévalence de l'obésité en France était de 15 %, celle-ci tend à décélérer ces dernières années. Le Nord-Pas-de-Calais détient la prévalence de l'obésité la plus élevée de France (21,3 % en 2012) avec notamment une augmentation de la prévalence de 1997 à 2012 de + 57,8 %. La Picardie la suit de près en étant la 3^{ème} région la plus touchée de France avec une prévalence de 20 % en 2012 et une augmentation de prévalence de 1997 à 2012 de + 119,8 %. Il existe un gradient Nord-Sud important de prévalence de l'obésité en France (Figure 10). Selon l'enquête OBEPI, 6 % des femmes âgées

de 18 à 24 ans et 11 % âgées de 25 à 34 ans, correspondant à l'âge de procréer, étaient obèses en 2012. Dans le contexte de la grossesse, la prévalence du surpoids des femmes enceintes a augmenté de 17 à 20 % entre 2010 et 2016 en France, et celle de l'obésité de 10 à 12 % (Enquête nationale périnatale 2017, Équipe de recherche en Épidémiologie Obstétricale, Périnatale et Pédiatrique et l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale).

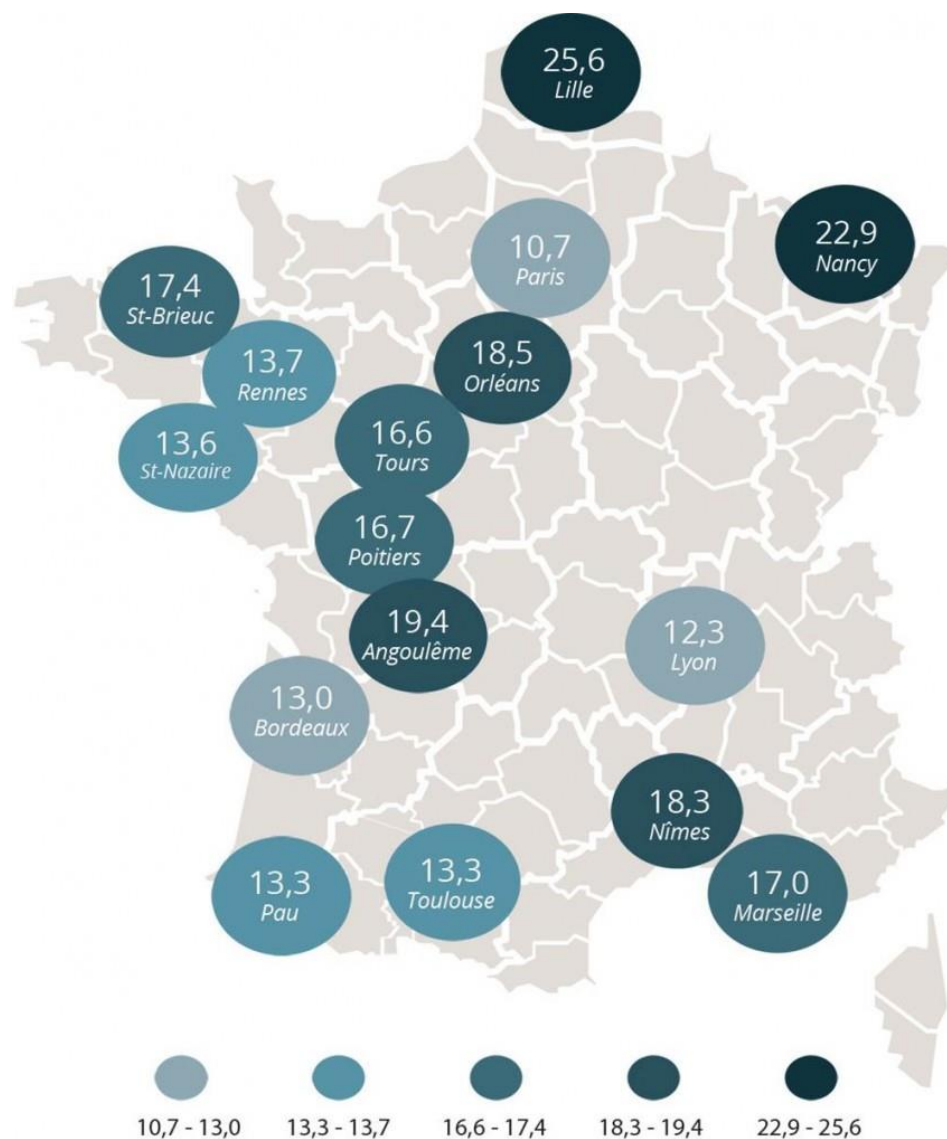


Figure 10 - Répartition territoriale de l'obésité en 2016 (source : BEH n°35-36, 2016, Santé publique France)

3. Causes de l'obésité

3.1. Déséquilibre alimentaire

La première cause connue pour entraîner une obésité est caractérisée par un déséquilibre entre les apports et des dépenses de calories. Certains facteurs influencent le bilan

énergétique et donc le statut nutritionnel tels qu'un déséquilibre alimentaire et une diminution de l'activité physique. Ceci résulte pour partie d'une augmentation de la consommation d'aliments transformés et ultra-transformés (Monteiro *et al.* 2017), ainsi que d'aliments riches en énergie, en graisses et en sucres. S'y joignent des changements de comportement. La sédentarité, l'évolution des modes de vie comme l'utilisation de la voiture et des transports en commun dans les déplacements du quotidien induisent une diminution de l'activité physique et des dépenses énergétiques (revue : Hruby *et al.*, 2016). Avec les années, les changements alimentaires, comme l'augmentation de la taille des portions, l'augmentation de la densité énergétique, l'industrialisation de l'alimentation et sa disponibilité, favorisent les consommations caloriques excessives.

3.2. Pathogenèse de l'obésité

Cependant, tous ces éléments ne suffisent pas pour expliquer une telle augmentation de la fréquence de l'obésité. Une prédisposition génétique a été suggérée. De nombreux gènes impliqués dans la prise de poids, l'obésité et/ou les complications associées ont été identifiés (Heymsfield et Wadden 2017). Des mutations de gènes impliqués dans la satiété et la prise alimentaire pourraient contribuer au développement de l'obésité chez l'homme (Blüher 2019). Des facteurs environnementaux perturbant l'horloge biologique, le stress, certains médicaments, des virus, ou l'exposition à des polluants, semblent également être des facteurs de risque de cette pathologie.

Différents facteurs de risques prénataux de survenue de l'obésité ont été identifiés : tabagisme maternel, diabète ou surpoids maternel, alimentation maternelle, prise de poids excessive pendant la grossesse, déficit et milieu socioéconomique défavorable (INSERM 2019). La recherche actuelle tente de mieux comprendre les nombreux mécanismes à l'origine de cette pathologie pour pouvoir en diminuer sa prévalence et son impact sur la santé des individus (Figure 11).

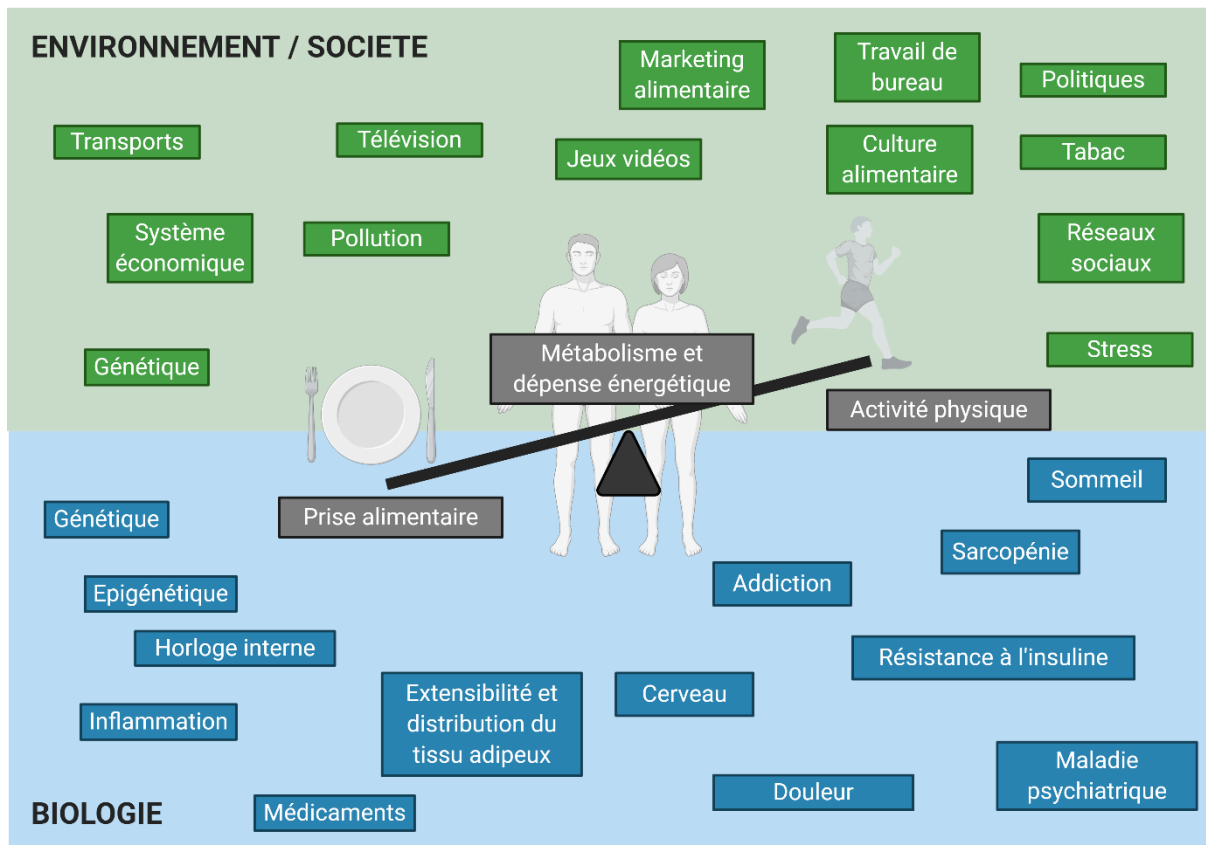


Figure 11 - Pathogénèse de l'obésité - adapté et traduit de (Blüher, 2019) (création personnelle sur BioRender.com)

4. Conséquences métaboliques et physiologiques

Cette pathologie engendre un excès d'adiposité progressif dans le temps décrit par une accumulation de lipides dans le tissu adipeux. Ces lipides, en excès, sont distribués dans de nombreux compartiments du corps et auront des effets variant avec les caractéristiques métaboliques et physiologiques des tissus (Figure 12). Le tissu adipeux est un tissu endocrine (par sa sécrétion d'adipokines comme la leptine et de resistine notamment) qui peut induire de nombreux effets indésirables en fonction de sa localisation et de sa quantité (Tchkonina *et al.* 2013). Il peut se retrouver en grande quantité autour du rein et augmenter la pression artérielle en partie en exerçant une compression physique sur cet organe (Hall *et al.* 2010). Au niveau du pharynx, son accumulation peut contribuer à obstruer les voies respiratoires pendant le sommeil notamment (Ashrafian *et al.* 2015). Enfin, cette adiposité peut également induire une charge sur les articulations. Les adipokines produites seraient impliquées dans l'inflammation et les lésions cartilagineuses, facteurs de risque de développement de l'arthrose (Goldring et Otero 2011).

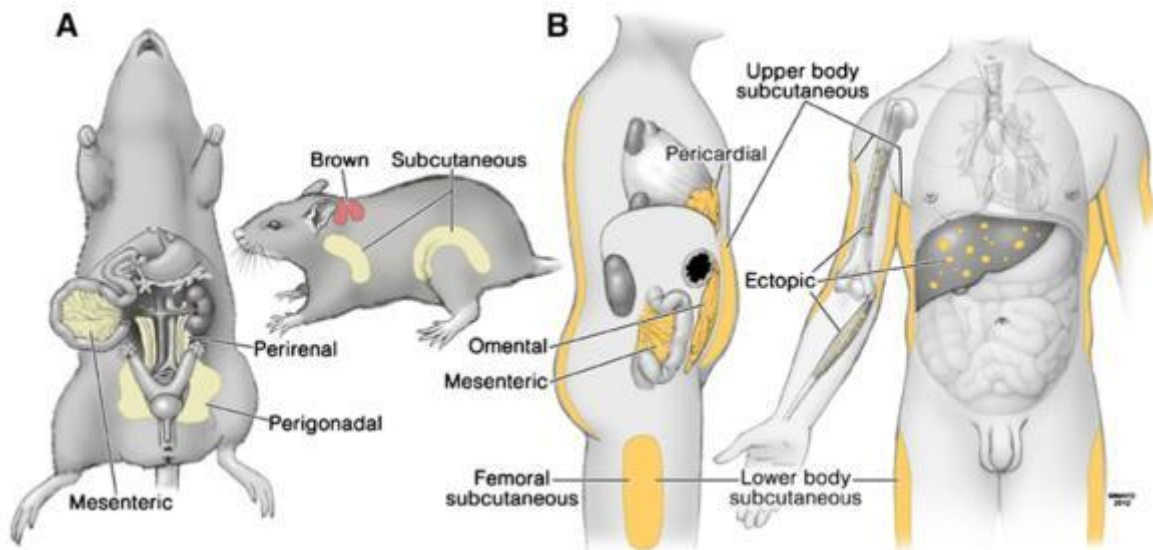


Figure 12 - Principaux dépôts de graisse chez les rongeurs (A) et les humains (B) (Tchkonia et al. 2013)

Le tissu adipeux est constitué de plusieurs types cellulaires dont des adipocytes (cellules de stockage des lipides), des préadipocytes (adipocytes immatures), des fibroblastes, des macrophages... Au niveau cellulaire, les adipocytes synthétisent des protéines, les adipokines comme la leptine, l'adiponectine et la résistine. Elles sont impliquées dans l'inflammation et dans la régulation du métabolisme. Leur production et leurs effets sont dépendants de la distribution et la quantité de tissu adipeux. Lors du développement d'une obésité, on observe une hypertrophie des adipocytes qui s'accompagne d'une augmentation de la production des adipokines (Skurk *et al.* 2007). Au sein des adipocytes, l'hydrolyse des TGs libère des acides gras libres (AGL), qui sont ensuite transportés dans le sang. Les acides gras (AG), produits principalement par le foie ou les tissus adipeux, sont des substrats énergétiques, mais également des molécules de signalisation. On observe une élévation marquée des taux circulants d'AG chez les personnes obèses (Arner 2005). Une accumulation d'intermédiaires lipidiques dans certains tissus non adipeux peut entraîner une lipotoxicité avec dysfonctionnement cellulaire et apoptose (Tchkonia *et al.* 2013). Au niveau hépatique, cela peut provoquer une stéatose non alcoolique (NAFLD) (McCullough 2004), caractérisée par une augmentation de la teneur en TGs hépatiques. Celle-ci serait due à une élévation du taux des AGLs et une hyperinsulinémie entraînant une augmentation de la lipogenèse *de novo* hépatique. Cette pathologie a été associée au syndrome métabolique et au diabète de type 2 (Marchesini *et al.* 2001).

De plus, au sein des tissus adipeux, l'obésité entraîne une augmentation du nombre de macrophages et d'autres cellules immunitaires, et modifie l'orientation de ces cellules vers un statut pro-inflammatoire, ce qui induit une inflammation tissulaire et une résistance à l'insuline (Grant et Dixit 2015). De plus, la sécrétion de l'insuline augmente avec l'IMC de l'individu (Ferrannini *et al.* 2004). L'obésité est ainsi souvent associée, à une résistance à l'insuline, un diabète de type 2, une dyslipidémie, une stéatose hépatique non alcoolique... (revue : Heymsfield and Wadden, 2017).

5. L'obésité maternelle

5.1. Les conséquences sur la santé

Une obésité installée avant la conception pourrait avoir des conséquences sur la grossesse et des impacts sur la biologie et la physiologie gestationnelle qui programme le risque d'obésité chez la descendance (Lindsay *et al.* 2020). Des perturbations survenant au cours de la période *in utero* peuvent prédisposer la descendance à des maladies dans leur future vie d'adulte. Cette notion se traduit par le concept des origines développementales de la santé traduit de l'anglais «The developmental origins of adult disease » (DOHaD) (Barker 2003a). Cette hypothèse d'une origine ou contribution fœtale des maladies de l'adulte suppose que la malnutrition maternelle ou fœtale entraîne chez le fœtus des adaptations pour lui permettre de survivre *in utero*, ce qui serait à l'origine de maladies chroniques dans leur vie d'adulte (Charles *et al.* 2016). Une revue de la littérature récente a analysé les études portant sur les conséquences de la surnutrition développementale, du diabète et de l'obésité maternels sur un développement d'obésité et du risque de diabète de type 2 pendant l'enfance et l'adolescence. Certaines études montrent un lien entre la surnutrition, le diabète maternel et/ou un diabète gestationnel et une induction d'une grande taille et poids de naissance. Ceci serait lié à une hyperglycémie maternelle et altération du métabolisme maternel pendant ou avant la grossesse. La surnutrition *in utero* et le diabète gestationnel ont provoqué un diabète de type 2 chez la descendance, une résistance à l'insuline et une glycémie à jeun plus élevée. Enfin, le gain de poids gestationnel induit une plus grande adiposité de la progéniture de la naissance à l'âge adulte, et est corrélé à des biomarqueurs métaboliques liés au diabète de type 2, dont la résistance à l'insuline (Perng *et al.* 2019).

Afin de mieux comprendre les impacts de cette obésité ou d'un déséquilibre alimentaire maternel sur la santé de la descendance, il est possible de mimer cette exposition par l'utilisation d'un High Fat Diet (HFD) comme alimentation unique dans des modèles animaux.

5.2. Le High Fat Diet (HFD) comme modèle d'exposition *in vivo*

Différents modèles expérimentaux existent pour mimer les différentes origines de cette pathologie :

- Un régime riche en graisse (hyperlipidique) peut entraîner une obésité nutritionnelle ;
- Des lésions de régions hypothalamiques contrôlant la prise alimentaire peuvent entraîner une obésité d'origine hypothalamique ;
- Des mutations dans des gènes cruciaux pour l'équilibre énergétique et la croissance peuvent induire une obésité génétique.

Le terme HFD représente une alimentation riche en graisses. Il existe différents régimes alimentaires riches en graisses destinés aux rongeurs pour étudier l'obésité. Cette technique est de plus en plus utilisée depuis les années 2000 par les chercheurs (Figure 13).

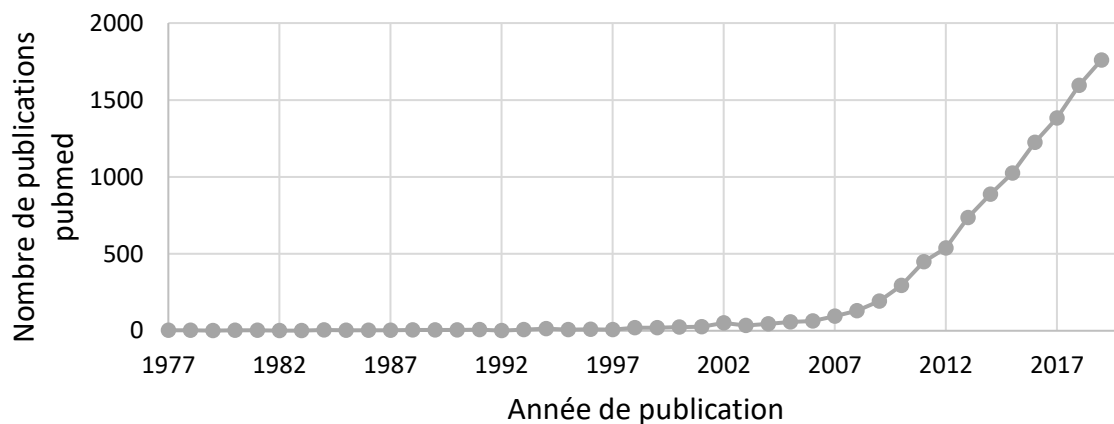


Figure 13 - Nombre de publications référencées sur pubmed incluant le mot "HFD" entre 1977 et 2019 (création personnelle)

Ces régimes se distinguent par leur teneur et origine en lipides alimentaires. Cependant, extrapolées à l'homme, ces quantités de lipides sont bien supérieures aux consommations habituelles chez l'homme (Speakman 2019). Dans le cas de l'obésité nutritionnelle, les rongeurs consomment une alimentation dense en calories, c'est-à-dire enrichie en lipides de différentes origines et glucides. Les régimes les plus couramment utilisés contiennent 30, 45

ou 60 % de calories d'origine lipidique. Cette alimentation conduit à une adiposité accrue, puis à l'obésité. Cette approche peut également être utilisée dans des modèles d'obésité nutritionnelle visant à étudier la programmation métabolique chez les rongeurs. Une revue de la littérature indique que les 11 études montrent qu'une exposition maternelle au HFD entraîne un risque de diabète de type 2 et d'obésité chez la descendance (Ainge *et al.* 2011). La consommation d'un régime riche en graisses pendant la gestation et/ou l'allaitement, l'alimentation des rats avec un régime gras, ou encore la manipulation des quantités de lait ingérées par modification de la taille des portées, jouent un rôle sur le poids corporel, la masse grasse et l'induction de l'inflammation au sein tissu adipeux dans la descendance à l'âge adulte (Guo et Jen 1995). En effet, une étude a montré que la composition nutritionnelle du lait maternel pourrait également être affectée par le régime alimentaire pendant la grossesse et l'allaitement, tout comme par l'obésité maternelle. Les changements dans la composition du lait pendant la lactation pourraient contribuer aux changements métaboliques à long terme induits par le HFD maternel (Purcell *et al.* 2011). De nombreuses études, recensées dans une revue récente, indiquent que le HFD maternel entraîne une augmentation de la quantité de graisse corporelle, du poids corporel, des taux de leptine, du glucose, de l'insuline et des TGs chez les jeunes adultes (Tellechea *et al.*, 2017).

5.3. Les impacts de l'exposition à des pesticides OPs sur la survenue de l'obésité et plus particulièrement lors de la période périnatale

5.3.1. Les impacts de l'exposition des OPs sur la survenue de l'obésité

Une récente revue de la littérature a fait le point sur de nombreuses études explorant le lien entre l'exposition aux OPs et l'obésité et/ou le diabète de type 2 (études épidémiologiques, *in vivo* et *in vitro*) (Czajka *et al.* 2019). Des études épidémiologiques posent ce lien (Montgomery *et al.* 2008 ; Saldana *et al.* 2007) et des études expérimentales permettent d'en comprendre les mécanismes. Peu d'études ont, jusqu'à présent, mis en évidence d'effets *in vitro* des OPs sur l'adipogenèse (Martini *et al.*, 2012, 2016). Des expositions chroniques au CPF chez les murins ont induit une augmentation de la masse corporelle avec une augmentation du poids du tissu adipeux périrénal. Le CPF *in vitro* ensuite n'accélérait ni la différenciation ni la prolifération des pré-adipocytes en adipocytes (Meggs et Brewer 2007). Une étude *in vivo* confirme l'augmentation du poids liée à l'exposition au CPF, ainsi qu'une augmentation de la

prise alimentaire et des taux plasmatiques de leptine accompagnée d'une résistance à l'insuline (Peris-Sampedro *et al.* 2015). Une exposition à des OPs induit une hyperglycémie (revue : Rahimi and Abdollahi, 2007), une résistance à l'insuline, prédisposant au diabète (revue : Lasram *et al.*, 2014), des troubles du métabolisme lipidique (Howell *et al.* 2018) et glucidique (Acker and Nogueira, 2012) et une altération du microbiote intestinal (Costa 2018). Une exposition aux OPs peut donc induire le risque de développer une obésité ou des troubles métaboliques. Ces effets pourraient être exacerbés de par l'accumulation des OPs dans les tissus adipeux grâce à leur lipophilie. Une exposition pré- ou post-conceptionnelle à ces pesticides pourrait provoquer ces effets sur la descendance, et accompagner d'autres désordres métaboliques.

5.3.2. Les impacts des OPs dont le CPF en périnatalité

L'exposition maternelle aux pesticides ou résidus de pesticides dans l'alimentation détermine l'exposition du fœtus pendant la gestation, puis l'exposition du nourrisson pendant la lactation. Cette exposition à des OPs induit des troubles neurocomportementaux à long terme et un développement cognitif défavorable chez l'Homme (Eskenazi Brenda *et al.* 2007). Une revue s'est interrogée sur le lien entre une exposition maternelle à des OPs et la survenue d'une obésité ou d'un diabète (Slotkin 2011). Une exposition aux pesticides lors de la phase de développement pourrait entraîner des prédispositions à développer une obésité ou un diabète de type 2 de la descendance à l'âge adulte. Des études sur des modèles animaux ont révélé qu'une exposition néonatale aux OPs (dont le CPF) à des doses qui n'induisent pas d'inhibition de l'AChE créait une hyperinsulinémie et une hyperlipémie (hypertriglycémie et hypercholestérolémie), aboutissant à un prédiabète à l'âge adulte chez la descendance. De plus, un faible poids à la naissance et une petite taille lors de l'enfance, couramment observés chez la descendance issue de mères exposées à des OPs, sont associés à des facteurs de risque de développer un diabète de type 2 à l'âge adulte. Certaines études indiquent un gain de poids plus rapide à l'âge jeune adulte après maturité sexuelle chez la descendance mâle. Enfin, des études précédentes au sein de notre laboratoire ont mis en évidence un dysfonctionnement de la barrière intestinale, une translocation bactérienne et la survenue d'une dysbiose après une exposition maternelle à un OP (Joly Condette *et al.*, 2015, 2014; Reygner *et al.*, 2016;

Akhtar et al., 2006; Lassiter, 1999; Lassiter et al., 2010, 2008, 1998; Mansour and Mossa, 2010; Mattsson et al., 1996; Maurissen et al., 2000; Slotkin et al., 2005a) (Figure 14).

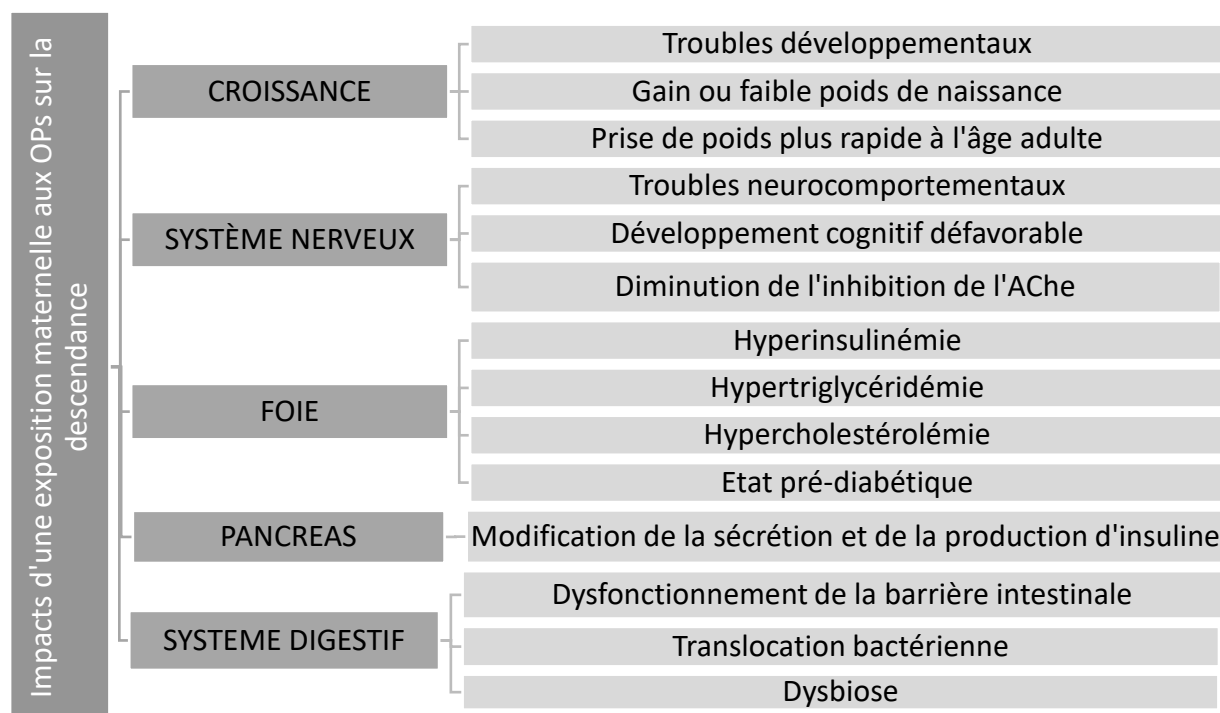


Figure 14 – Résumé des effets des OPs en périnatalité décrits dans la littérature (création personnelle)

Un déséquilibre alimentaire peut modifier les effets de l'exposition maternelle aux OPs. Un régime riche en graisses stimule les effets des OPs sur les perturbations métaboliques notamment le diazinon ou au parathion en début de vie. Les animaux exposés aux OPs et au HFD ont été caractérisés par un gain de poids beaucoup plus important en association avec des profils métaboliques pré-diabétiques. Toutefois, une alimentation riche en graisses reverse certains des effets neurodéveloppementaux de l'exposition néonatale aux OPs (Adigun *et al.* 2010 ; Lassiter *et al.* 2010, 2008 ; Meyer *et al.* 2004 ; Slotkin *et al.* 2009).

Une exposition maternelle à des pesticides peut induire des symptômes de syndrome métabolique, des troubles métaboliques, et prédisposer la descendance à une future obésité ou un diabète. Un déséquilibre alimentaire maternel et/ou une obésité maternelle pourrait exacerber les impacts de l'exposition maternelle aux pesticides sur la santé de l'enfant lors de sa future vie d'adulte. Des impacts de l'homéostasie intestinale, et particulièrement de sa fonction barrière épithéliale, ainsi que de la fonction hépatique pourraient avoir de lourdes conséquences sur la santé de l'individu.

L'HOMEOSTASIE INTESTINALE ET LES FACTEURS RESPONSABLES DE SA PERTURBATION

Des désordres de l'homéostasie digestive peuvent induire de nombreux impacts sur la santé. Ces altérations peuvent être induites par une exposition précoce à des facteurs environnementaux, tels que des pesticides ou un déséquilibre alimentaire. Les contaminants alimentaires peuvent moduler la fonction de barrière épithéliale ou la maturation immunitaire, et avoir également des répercussions sur la fonction hépatique.

1. Le système digestif

Le système digestif constitue une zone d'échanges et une barrière très sélective et efficace entre l'environnement et l'intérieur de notre organisme. Suite à l'ingestion d'aliments et leur digestion, les nutriments (glucides, protéines, lipides), minéraux et vitamines sont absorbés par l'épithélium intestinal, puis acheminés vers le foie et distribués vers les différents organes. L'intestin joue également un rôle de barrière important face à des contaminants alimentaires et agents pathogènes (Haber *et al.* 2017).

1.1. L'embryogenèse

Le développement du tractus gastro-intestinal se déroule *in utero* et la maturation s'effectue après la naissance. Des mécanismes coordonnent le développement intestinal, la croissance et la maturation de l'intestin, à partir de la formation du tube intestinal précoce provenant du feuillet endodermique. Une série de processus se produit : formation de l'endoderme, croissance du tube digestif et modelage, morphogenèse intestinale, réorganisation épithéliale, apparition des villosités...(Spence *et al.* 2011). Les organes du système digestif sont formés à la naissance, mais un développement structurel et fonctionnel advient durant la période d'allaitement et la période de lactation (Pácha 2000).

1.2. La description du système digestif

Le système digestif a pour fonction de dégrader le bol alimentaire, par action mécanique (mastication) et chimique (enzymatique), puis d'absorber les nutriments à travers la muqueuse digestive, enfin, il exerce une fonction d'élimination. Des organes annexes au système digestif ont des fonctions importantes dans la digestion des nutriments. Le foie joue différents rôles : stockage et relargage des nutriments en fonction des besoins de l'organisme, détoxification et sécrétion de la bile. La vésicule biliaire stocke et concentre la bile. Le pancréas a une activité endocrine en libérant des hormones, et une fonction exocrine de par la production de suc pancréatique riche en enzymes indispensables à la digestion (Rao et Wang 2010).

Le duodénum, première partie de l'intestin, est responsable de la décomposition chimique des aliments à l'aide d'enzymes pancréatiques et de sels biliaires et du début de l'absorption des nutriments. Le jéjunum et l'iléon sont les principaux sites à partir desquels les nutriments sont absorbés. Le côlon continue ce processus et a un rôle important dans la réabsorption d'eau et de sels minéraux, ainsi que dans l'élimination des déchets non absorbés. La paroi de l'intestin grêle et du gros intestin est composée de quatre tuniques (Figure 15) qui sont, en partant de l'extérieur vers la lumière (Collins *et al.* 2020) :

- La séreuse : couche externe de l'intestin composée de mésothélium et d'épithélium ;
- La musculuse : composée d'une couche circulaire interne et une couche longitudinale externe séparées par un plexus nerveux, appartenant au système nerveux entérique ; et du plexus d'Auerbach, régulant l'activité motrice et permettant les mouvements péristaltiques à l'origine de la progression du bol alimentaire ;
- La sous-muqueuse : composée d'un tissu conjonctif contenant des vaisseaux sanguins et un réseau de neurones du système nerveux entérique ; et du plexus de Meissner, régulant principalement l'activité de sécrétion du tractus digestif ;
- La muqueuse : constituée de la musculaire muqueuse formée de cellules musculaires lisses (*muscularis mucosae*) qui permettent la mobilité de cette muqueuse, puis d'un chorion (*lamina propria*), un tissu conjonctif où l'on retrouve des cellules immunitaires (lymphocytes), et des vaisseaux sanguins, et enfin recouverte d'un épithélium absorbant, sécrétoire et protecteur.

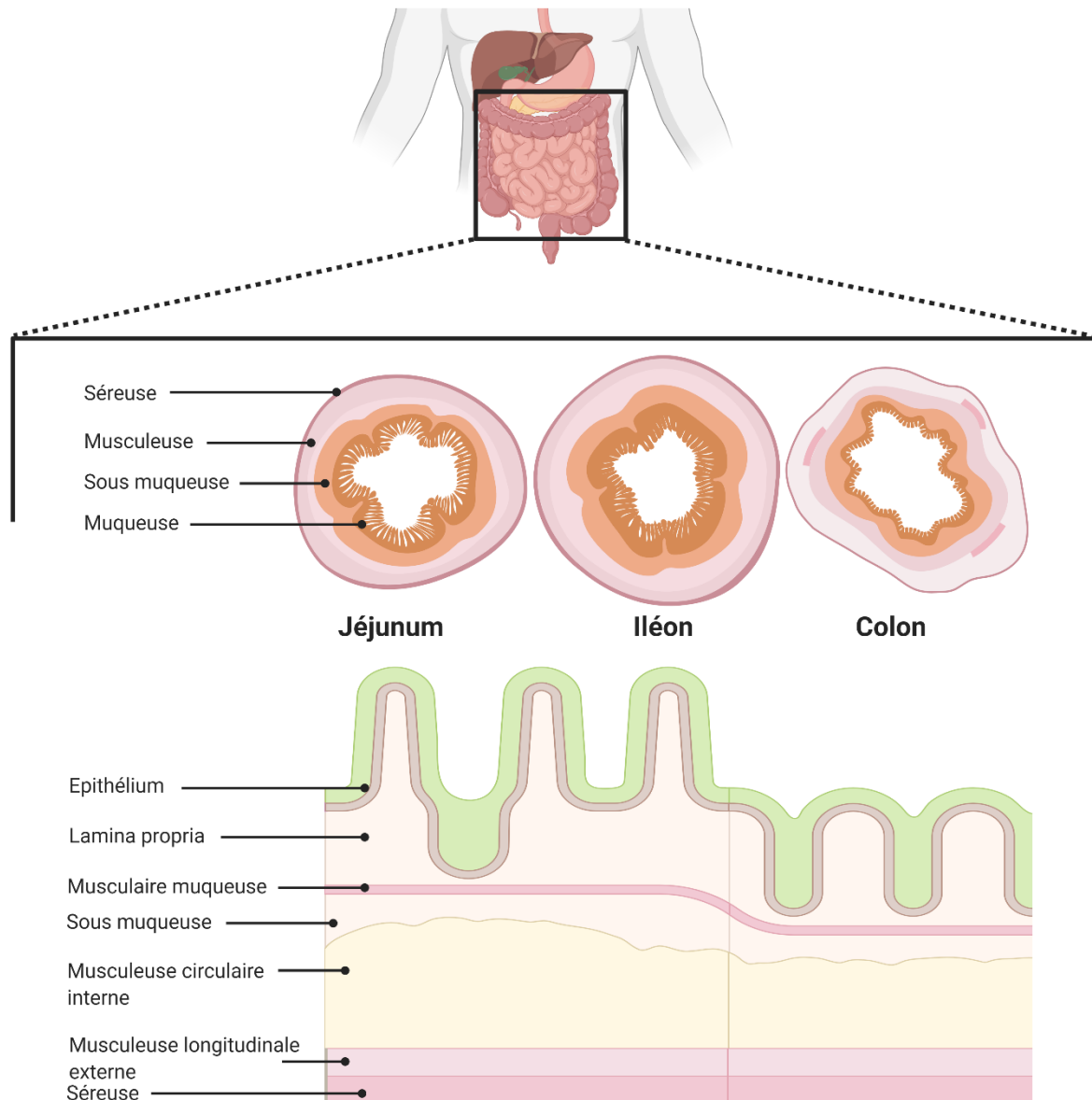


Figure 15 - Paroi intestinale (création personnelle sur BioRender.com)

2. L'épithélium intestinal

2.1. La morphogenèse et la description de l'épithélium intestinal

La morphogenèse des villosités intervient au début du développement embryonnaire, au niveau de l'épithélium intestinal (Spence *et al.* 2011). L'intestin plat pseudostratifié en forme de tube se structure en villosités et cryptes. Ces villosités étendent la surface épithéliale intestinale et permettent ainsi une absorption efficace des nutriments. Au sein de ces villosités, l'épithélium est composé de quatre principaux types de cellules : les cellules

absorbantes (entérocytes), les cellules caliciformes (cellules à mucus), les cellules de Paneth et les cellules endocrines. L'intestin a un taux élevé de renouvellement des cellules épithéliales, dû à la présence des cellules souches épithéliales immatures, retrouvées à la base des villosités dans les cryptes de Lieberkühn (Crosnier *et al.* 2006). Celles-ci prolifèrent, se différencient au travers de l'activation de différentes voies de signalisation, se déplacent le long des structures des villosités puis se détachent et sont éliminées dans la lumière intestinale (van der Flier et Clevers 2009). Les cellules épithéliales ont des fonctions spécifiques (Zouiten-Mekki *et al.* 2013) :

- Les entérocytes, cellules principales de l'épithélium intestinal, présentent des extensions cytoplasmiques appelées microvillosités, leur rôle principal étant d'absorber le plus efficacement possible les nutriments de la lumière pour diffusion dans les capillaires sanguins ;
- Les cellules à mucus, ou cellules caliciformes ou en gobelet, sécrètent le mucus qui tapisse la muqueuse des villosités ainsi que les peptides en feuille de trèfle ayant une activité de protection envers les bactéries ;
- Les cellules de Paneth, situées au fond des cryptes intestinales, sécrètent principalement du lysozyme, de la phospholipase A2, des DNases des peptides antimicrobiens (défensines α) qui jouent un rôle dans l'immunité innée...(Bel *et al.* 2017) ;
- Les cellules endocrines produisent des hormones intestinales exerçant un rôle important dans la motricité digestive et dans les sécrétions intestinales (Gribble et Reimann 2016) ;
- Enfin, d'autres cellules sont également retrouvées comme des cellules immunitaires (Elliott et Kaestner 2015 ; Boonekamp *et al.* 2020) (Figure 17).

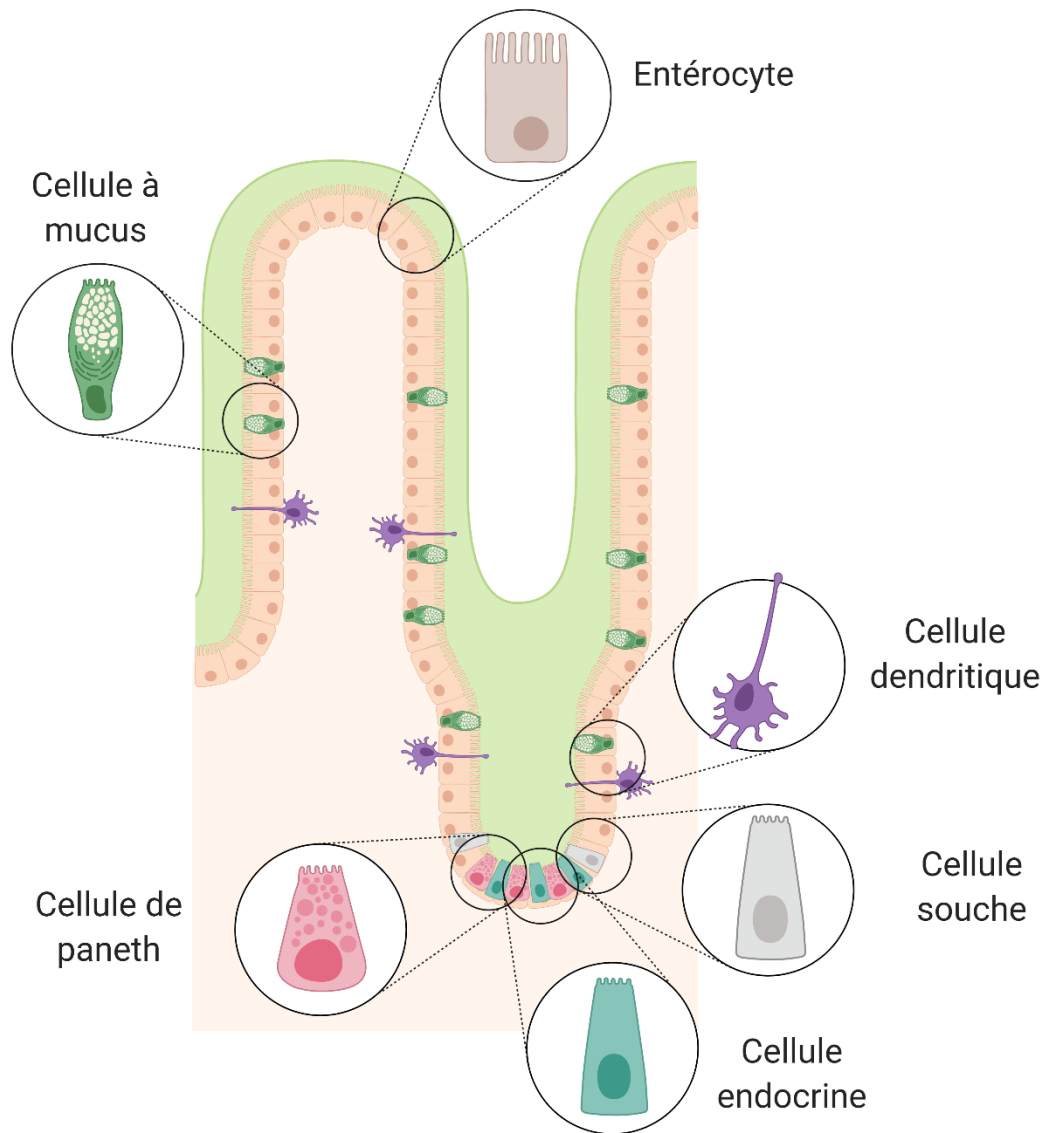


Figure 16 - Composition de l'épithélium intestinal adapté de (Boonekamp et al. 2020) (source personnelle créée avec BioRender.com)

2.2. Les fonctions de l'épithélium intestinal

2.2.1. L'absorption des nutriments

Les glucides, protéines et lipides, présents dans notre alimentation, sont dégradés en nutriments suite à une digestion chimique et mécanique, avant d'être absorbés et distribués aux organes cibles avec l'eau et les minéraux. Cette fonction représente le rôle premier du système digestif. Les protéines sont clivées au sein de l'estomac puis dégradées dans l'intestin. La digestion des lipides peut commencer au niveau de la cavité buccale, et de l'estomac, mais elle se passe principalement au sein de l'intestin. Une fois digérés, les acides gras et

cholestérol sont ensuite absorbés en majorité dans le jéjunum et l'iléon. L'absorption des glucides, digérés en monosaccharides démarre dans la cavité buccale, mais se déroule principalement au sein du duodénum et du jéjunum. Les structures polysaccharidiques solubles, elles, seront fermentées principalement dans le côlon en présence du microbiote (Goodman 2010).

2.2.2. La barrière épithéliale intestinale

L'épithélium intestinal présente également une fonction de barrière intestinale, sélectivement perméable, qui préserve l'homéostasie intestinale en empêchant le passage de molécules potentiellement pathogènes (allergènes, motifs bactériens). Cette fonction barrière est rendue possible grâce aux jonctions entre les cellules, à la sécrétion de mucus, mais aussi à la présence de cellules immunitaires (Chin *et al.* 2017). Cette barrière intestinale peut être altérée par des conditions physiopathologiques. Ces perturbations peuvent augmenter la perméabilité paracellulaire de l'intestin et déclencher une inflammation.

2.2.2.1. Les jonctions cellulaires

Les cellules épithéliales intestinales sont reliées à la lame basale à l'aide de jonctions d'adhérence, appelées hémidesmosomes et de points focaux d'adhérence, situés au pôle basal de ces cellules. Ces liaisons existent grâce à des filaments intermédiaires du cytosquelette et des filaments d'actine. Il existe également trois grands types de jonctions intercellulaires, classées selon leurs fonctions : les jonctions serrées, les jonctions communicantes et les jonctions d'ancrage (ceintures d'adhérence et desmosomes). Au niveau basolatéral, les jonctions adhérentes, au niveau des desmosomes, détiennent un rôle d'ancrage et maintiennent des liens mécaniques entre les cellules afin de préserver leur cohésion. Les jonctions communicantes, également appelées « gap » jonctions, mettent en relation des cellules voisines entre elles grâce à des canaux intercellulaires. Cela permet le transfert d'ions et de petites molécules. Enfin, les jonctions serrées sont des complexes protéiques localisés sur les membranes latérales proches de la face apicale des cellules épithéliales. Elles jouent un rôle d'adhérence en permettant la cohésion entre les cellules, mais également un rôle de protection en régulant le mouvement paracellulaire des ions, des solutés et de l'eau et donc en contrôlant la perméabilité sélective. Parmi les molécules les

constituant, sont répertoriées des protéines transmembranaires (occludine, claudine), la molécule d'adhésion jonctionnelle et des protéines intracellulaires (les *zonula occludens* (ZO)). Les niveaux de phosphorylation, de distribution et d'expression des protéines des jonctions serrées permettent de réguler la fonction de barrière (Figure 17) :

- L'occludine est exprimée au contact de deux cellules et crée le lien entre elles, grâce à des liaisons formées entre leurs domaines extracellulaires reliés à une protéine cytoplasmique (ZO-1), elle-même reliée à l'actine du cytosquelette de la cellule. Elle permet de réguler la stabilité et la perméabilité des jonctions serrées.
- Les claudines forment des boucles extracellulaires qui permettent des interactions entre deux cellules adjacentes. En effet, elles participent à une diffusion sélective d'ions et autres molécules grâce à un système de pores dans les voies paracellulaires. L'expression de ces protéines change en fonction de leur localisation. Au niveau digestif, sont principalement retrouvées les claudines 2, 3, 4, 7, 8, 12 et 15.
- Enfin, les protéines ZO (ZO-1, ZO-2 et ZO-3) relient des protéines jonctionnelles, comme celles décrites précédemment, au cytosquelette d'actine. Ces interactions protéiques contrôlent la formation et la fonction des jonctions serrées. ZO-1 serait la protéine qui détiendrait le rôle principal dans le contrôle de l'assemblage de jonctions serrées par rapport aux autres protéines de sa famille (Chin *et al.* 2017).

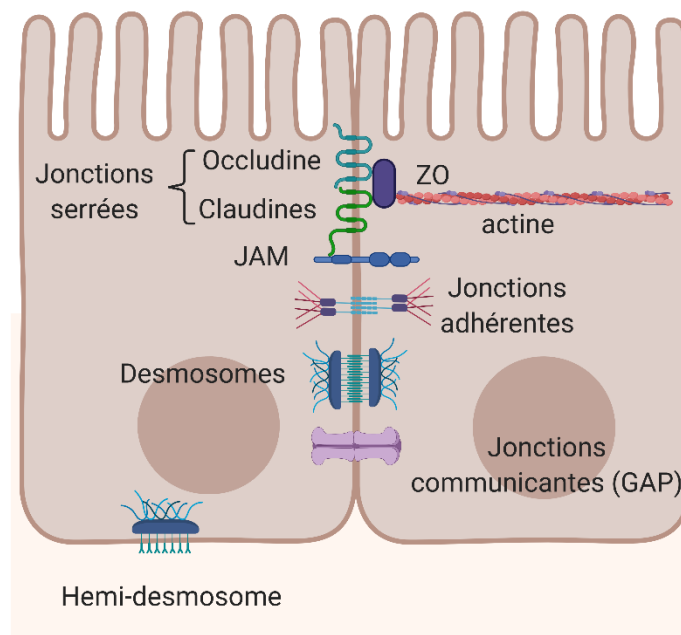


Figure 17 - Jonctions cellulaires: barrière physique étanche (création personnelle sur BioRender.com)

2.2.2.2. Le mucus

La barrière physique est également constituée d'une fine couche d'hydrogel, qui protège la muqueuse intestinale, et composée principalement d'eau. Le mucus est une substance sécrétée par les cellules caliciformes. Il protège la surface épithéliale des agressions :

- Chimiques (pH des sucs digestifs) en exerçant un rôle de tampon ;
- Mécaniques (progression du contenu luminal digestif) ;
- Bactériennes (peptides antimicrobiens) en évitant la colonisation bactérienne excessive (Johansson et Hansson 2016);
- Physiques en filtrant les molécules et les micro-organismes en fonction de leur charge et de leur taille, et en les piégeant grâce à la présence d'immunoglobulines A (IgA) sécrétoires.

Le mucus exerce également un rôle d'hydratation et de lubrifiant (revue : Hansson, 2019). Les mucines constituent une famille de grands polymères de glycoprotéines exprimés sous forme de molécules membranaires ou sont sécrétées par les cellules caliciformes comme composants majeurs du mucus (Kim et Ho 2010). Ces glycoprotéines lui confèrent ses propriétés physico-chimiques et biologiques. Les mucines coexistent, dans le mucus, sous la forme de mucines neutres, acides ou très acides, en équilibre qualitatif et quantitatif. Dans de nombreuses pathologies (maladies inflammatoires du tube digestif par exemple), cet équilibre est rompu et induit des altérations de la muqueuse. Parmi les gènes de mucines sécrétées, est retrouvée la mucine MUC2, majoritaire dans la couche de mucus du système digestif au niveau de l'intestin et du colon (Audie *et al.* 1993). Concernant les mucines membranaires, sont répertoriées MUC1, MUC3, MUC4, MUC12 et MUC13. La mucine 1 (MUC1) est exprimée sur la surface apicale de la membrane plasmique des cellules épithéliales humaines et dans les lymphocytes T (pour revue : Dhar and McAuley, 2019). Une dérégulation de son expression est caractéristique de divers types de cancers et de maladies inflammatoires (Bafna *et al.* 2010). La production de mucines est stimulée par les produits microbiens (Smirnova *et al.* 2003) et les cytokines inflammatoires (Enss *et al.* 2000). Dans le cas d'une inflammation, qui peut être causée par une infiltration bactérienne, une déplétion de cellules à mucus est observée. Les auteurs suggèrent que l'organisme tente d'éliminer les agents pathogènes en augmentant la sécrétion de mucines, alors que l'agent pathogène essaie de contrer cette

défense en inhibant la synthèse de mucine et en provoquant l'apoptose de cellules à mucus (Lindén *et al.* 2008).

2.2.2.3. L'immunité digestive

Le système immunitaire digestif a également un rôle important dans la fonction barrière intestinale. L'immunité du système digestif est composée d'une immunité innée constituée de cellules épithéliales et cellules présentatrices d'antigènes (cellules dendritiques et macrophages), de sites inducteurs (plaques de Peyer et follicules lymphoïdes) et de sites effecteurs (cellules immunitaires de la muqueuse intestinale). D'autre part, une immunité adaptative est constituée de lymphocytes, retrouvés principalement dans un tissu lymphoïde diffus localisé dans la *lamina propria*, appelé GALT (gut-associated lymphoid tissue ou tissu lymphoïde associé au système digestif) (Delneste *et al.* 2007).

2.2.2.3.1. L'immunité innée

L'immunité innée, première ligne de défense immunologique non spécifique est composée de sécrétions mucosales (mucus, lysozymes, peptides antimicrobiens), de cellules phagocytaires (macrophages et neutrophiles) et de mastocytes. Les peptides antimicrobiens sont synthétisés par les cellules épithéliales de manière constitutive ou inductible (via certains récepteurs de l'immunité innée). Parmi eux, sont retrouvées les défensines pouvant être divisées en deux groupes : les α -défensines, présentes au sein de cellules épithéliales spécialisées (cellules de Paneth), et les β -défensines, sur l'ensemble de l'épithélium. Les sous-types les plus présents au niveau digestif sont les sous-type 1 et 4. Les défensines se fixent sur la membrane des micro-organismes cibles et modulent la réponse inflammatoire par stimulation des cellules dendritiques immatures, des lymphocytes T et des neutrophiles (Chen *et al.* 2006). De plus, des récepteurs de l'immunité innée, les Pattern Recognition Receptor reconnaissent des motifs microbiens, associés aux pathogènes : Pathogen Associated Molecular Pattern (PAMPs). Ces récepteurs sont exprimés dans les cellules dendritiques (présentatrices de l'antigène) et dans d'autres cellules immunitaires et épithéliales. Les récepteurs les plus connus sont les Toll-Like Receptors (TLR), des récepteurs transmembranaires présents à la surface des cellules (TLR1, 2, 4, 6) ou dans les endosomes/lysosomes (TLR3, 7, 8, 9) (Abreu 2010). Le TLR2 joue un rôle important dans le maintien de la barrière intestinale en

supprimant l'inflammation muqueuse et en protégeant l'intégrité des jonctions serrées (Cario *et al.* 2007). Ces récepteurs reconnaissent de nombreux PAMPs, s'activent et induisent une cascade de signaux intracellulaires (McClure et Massari 2014). Parmi elles, la molécule « réponse primaire de différenciation myéloïde 88 » (MyD88) (Gibson *et al.* 2008) qui activera le facteur de transcription Nuclear factor-kappa B (NF- κ B), responsable de l'induction de gènes pro-inflammatoires (Medzhitov *et al.* 1998) et conduisant à l'activation et/ou la modulation de la réponse immunitaire. Parmi les PAMPs, le LPS (lipopolysaccharide), composant majeur des parois des bactéries Gram négatif, se fixe au récepteur TLR2 et TLR4 qui induiront la production de cytokines pro-inflammatoires (Hoshino *et al.* 1999 ; Yang *et al.* 1998) et le recrutement, l'activation et le déplacement des cellules immunitaires (revue : Akira and Takeda, 2004). La réponse immune innée est suivie d'une réponse immune adaptative (Delneste *et al.* 2007 ; Medzhitov et Janeway 1997).

2.2.2.3.2. L'immunité adaptative

Les antigènes de la lumière intestinale peuvent être capturés par les plaques de Peyer et leurs cellules épithéliales M spécialisées dans le tri des antigènes, et les nodules lymphoïdes isolés, ainsi que par les cellules dendritiques présentant des prolongements dans la lumière intestinale ou par les cellules épithéliales. Ces cellules M, présentent des microvésicules et une forme leur permettant un contact avec des cellules dendritiques, des macrophages et des lymphocytes. Elles captent les antigènes, les ingèrent à travers leur cytoplasme sous forme de vésicules et les transfèrent aux cellules immunitaires sous-jacentes. Les cellules lymphoïdes naïves T et B sont sélectionnées et prolifèrent.

En dehors de ce phénomène, les cellules dendritiques détectent les antigènes dans la lumière intestinale grâce à des récepteurs TLR, suivent un processus de maturation et migrent vers les ganglions mésentériques proches, vont produire des chimiokines et présenter aux lymphocytes T naïfs les antigènes issus des micro-organismes capturés.

Enfin, les cellules épithéliales peuvent aussi capter les antigènes et les présenter aux lymphocytes via les récepteurs TLR qui peuvent être activés par le LPS.

Suite à ces processus, les lymphocytes B rejoignent la circulation lymphatique, puis la circulation systémique afin de rejoindre la muqueuse. Les lymphocytes B activés se différencient en plasmocytes et produisent des IgA spécifiques de l'antigène. Elles seront

déversées à la surface des muqueuses après transport au travers des cellules épithéliales et pourront ainsi capter les antigènes dans la lumière intestinale. De plus, les lymphocytes T s'activent après présentation des antigènes et prendront un phénotype pro-inflammatoire ou anti-inflammatoire, aiguillés par les cellules dendritiques (Delneste *et al.* 2007). Les cytokines sécrétées de type Th2 (IL-4, IL-5, IL-6 et IL-10) produites par les lymphocytes T stimulent la maturation des cellules B et stimulent la production d'IgA, ont une action anti-inflammatoire, tandis que les cytokines sécrétées de type Th1 (IL-2, IFN- γ et TNF- α), inhibent la production d'IgA et ont une action pro-inflammatoire. La signalisation JAK-STAT régule plusieurs aspects de l'immunité adaptative, et notamment la différenciation des lymphocytes T (Heneghan *et al.* 2013). L'ensemble des éléments caractéristiques de l'immunité digestive est résumé en Figure 18.

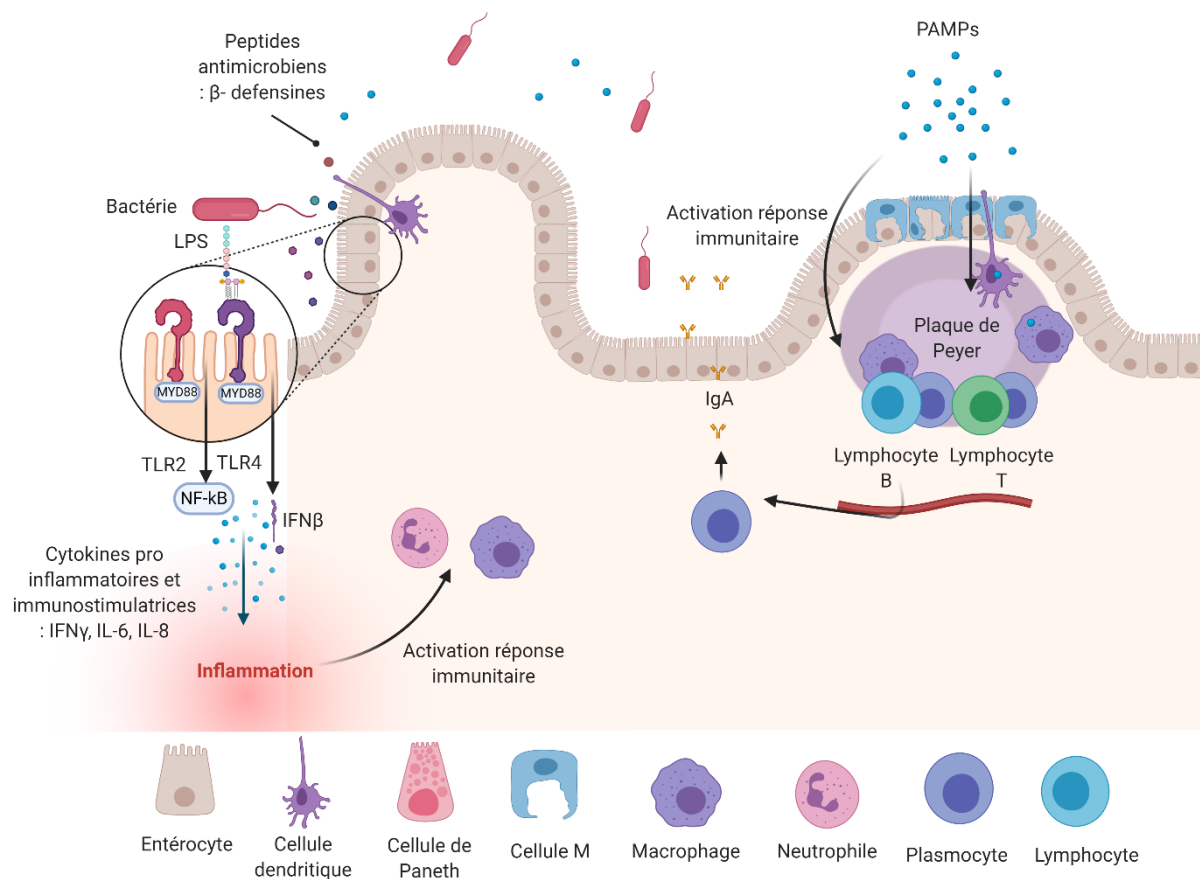


Figure 18 - Immunité digestive (iléon) (création personnelle sur BioRender.com)

2.2.2.4. Le microbiote intestinal

Le microbiote intestinal représente l'ensemble des micro-organismes qui colonisent le système digestif et qui accomplissent de nombreuses fonctions utiles pour l'organisme. Cette colonisation débute dès la naissance et est dépendante de l'exposition aux micro-organismes d'origine maternelle (fécale, vaginale et cutanée) et environnementale (alimentation et air ambiant) (Bäckhed *et al.* 2015). La flore microbienne d'un individu lui est propre et est composée de plusieurs centaines d'espèces bactériennes différentes et de fonctions potentielles. Lorsque le microbiote est mis en place, sa composition est stable dans le temps mais les populations sous-dominantes des bactéries peuvent varier, notamment par induction de changements liés à des facteurs environnementaux (Rodríguez *et al.* 2015). La majeure partie des effets physiologiques du microbiote est bénéfique comme la fermentation des substrats disponibles au niveau du côlon, le rôle de barrière à la colonisation par les micro-organismes pathogènes ou la synthèse de micronutriments comme les vitamines B. Son rôle de barrière se représente par une compétition au niveau des sites d'adhérence épithéliaux entre les bactéries pathogènes et les bactéries commensales (Rakoff-Nahoum *et al.* 2004), une induction de la production d'une grande partie des peptides antimicrobiens par les cellules épithéliales, la production de bactériocines (peptides ou protéines aux propriétés antibiotiques), une stimulation de la production des IgA sécrétoires et un renforcement des jonctions serrées entre les cellules épithéliales. La flore intestinale intervient également dans le développement et la maturation du système immunitaire. La production des Acides Gras à Chaîne Courte participe à la stimulation des lymphocytes T régulateurs dans la muqueuse intestinale. La composition du microbiote joue également un rôle dans l'équilibre entre les lymphocytes Th17 et Treg, indispensable au maintien de l'homéostasie intestinale (Delneste *et al.* 2007). L'ensemble des caractéristiques de la barrière intestinale est résumé en Figure 19.

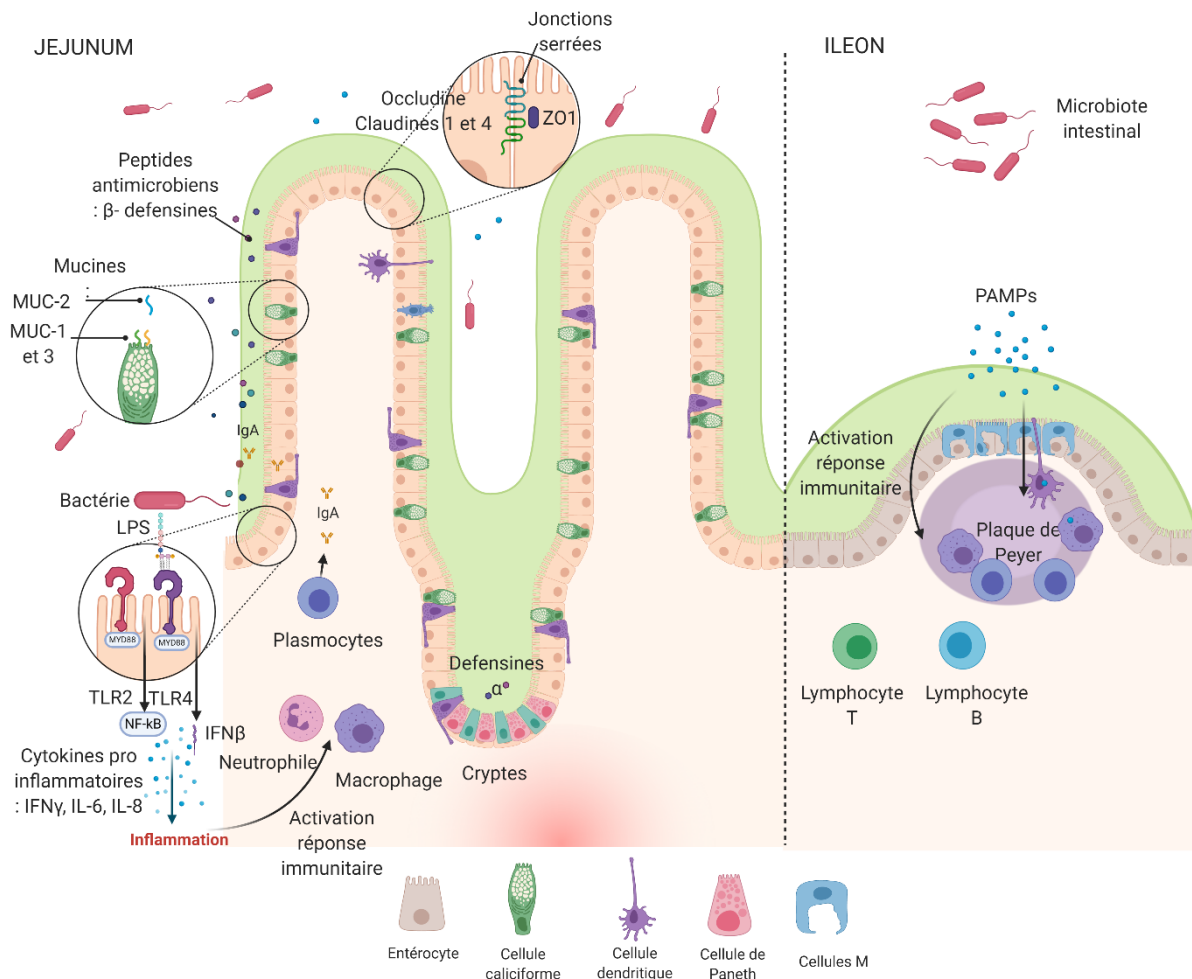


Figure 19 - Barrière intestinale (création personnelle sur BioRender.com)

2.2.2.5. L'homéostasie intestinale

L'homéostasie intestinale est caractérisée par le maintien stable de l'ensemble des paramètres physico chimiques de l'organisme malgré les variations de l'environnement pour garantir la bonne santé de l'être humain. Elle permet un contrôle des populations bactériennes présentes dans le tractus intestinal, grâce à ses interactions avec la muqueuse et toutes les cellules qui la composent. Une altération de l'homéostasie intestinale est à l'origine de l'apparition de nombreuses maladies. Les facteurs liés à cette altération comprennent les cytokines pro-inflammatoires, les bactéries pathogènes et les conditions pathologiques. En effet, les cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β et IFN γ) favorisent la perméabilité des jonctions serrées en activant la voie NF- κ B (Ma *et al.* 2004). Contrairement au TNF- α , IL-1 β n'affecte pas le taux de protéine ZO-1 mais diminue celui de l'occludine (Al-Sadi et Ma 2007). Les bactéries entériques pathogènes telles que *Escherichia coli* et *Salmonella*

typhimurium altèrent également la barrière épithéliale intestinale des jonctions serrées et entraînent une inflammation intestinale (Berkes *et al.* 2003). Enfin, la dysbiose et la translocation bactérienne accrue peuvent stimuler le système immunitaire et libérer des cytokines inflammatoires, qui peuvent affecter directement la perméabilité paracellulaire (revue : Lee *et al.*, 2018).

2.3. L'axe intestin – cerveau

Au sein de la paroi intestinale, la musculuse et la sous-muqueuse sont le support du système nerveux entérique : Plexus d'Auerbach (myentérique) et plexus de Meissner (sous muqueux), qui assurent la communication entre le cerveau et le tube digestif. Ainsi les neurones présents contrôlent les sécrétions et le péristaltisme de manière autonome et en partie indépendante du système nerveux central. On distingue parmi les neurones du système nerveux parasympathique en contact direct avec les cellules musculaires lisses : des neurones cholinergiques (stimulateurs) et des neurones non adrénergiques non cholinergiques (inhibiteurs). L'acétylcholine (ACh) libérée par les neurones cholinergiques est un neurotransmetteur qui joue un rôle majeur dans le contrôle du péristaltisme au niveau digestif, la sécrétion de mucus et les sécrétions gastriques. Le système digestif communique avec le cerveau par différentes voies (Rabot 2015) :

- Voie sanguine : les molécules libérées par les cellules endocrines intestinales sont excrétées dans la circulation sanguine pour parvenir jusqu'à la barrière hémato-encéphalique et la traverser ;
- Voie nerveuse : les neurones du système nerveux entérique sont stimulés par les signaux bactériens et induisent un signal transmis au système nerveux central par les systèmes nerveux parasympathique et sympathique ; les neurones présents dans l'épithélium intestinal sécrètent des neuropeptides tels que le neuropeptide Y ;
- Voie immunitaire : les cellules immunitaires stimulées par des facteurs bactériens vont induire une production de cytokines pro-inflammatoires ;
- Voie endocrinienne : les cellules endocrines de l'épithélium intestinal libèrent des hormones telles que le glucagon-like peptide 1, le peptide YY et la cholécystokinine.

3. Les effets de l'exposition maternelle à des facteurs environnementaux sur l'homéostasie intestinale

3.1. Les effets de l'exposition à des organophosphorés sur l'homéostasie intestinale

L'exposition de cellules intestinales humaines (Caco-2) au CPF ou CPF oxon (30 μ M) entraînerait une diminution de l'absorption membranaire intestinale et pourrait ainsi affecter la biodisponibilité et l'élimination des xénobiotiques (Agarwala *et al.* 2004). Ces mêmes effets ont été observés sous diazinon chez le rat (Lecoeur *et al.* 2006). De plus, le CPF (à la dose de 250 μ M durant 8h) diminue la résistance électrique transépithéliale (TEER), augmente le passage de mannitol et augmente ainsi la perméabilité paracellulaire et intracellulaire, sans induire de cytotoxicité au niveau des cellules épithéliales intestinales. Ceci s'accompagnerait d'une altération de la synthèse de protéines des jonctions serrées (ZO-1 et occludine). Ces effets sur la barrière épithéliale ne sont pas retrouvés à des doses plus faibles de CPF (30 et 50 μ M) (Tirelli *et al.* 2007). Enfin, le microbiote (et plus particulièrement les bactéries *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus fermentum* and *Escherichia coli*) dégrade les organophosphorés (OPs) au niveau intestinal sur un modèle *in vitro* (Harishankar *et al.* 2013). Chez des souris exposées chroniquement au monocrotophos, un autre OP, pendant 180 jours, la production d'acides gras à chaînes courtes lors de la dégradation microbienne des OPs au niveau intestinal, a induit une augmentation de la gluconéogenèse hépatique. Ceci expliquerait l'intolérance au glucose et donc l'hyperglycémie induite par les OPs. Cette étude suggère que la nature diabétogène des OPs pourrait être médiée par le microbiote intestinal (Velmurugan *et al.* 2017). Ce même pesticide, à des doses créant une inhibition de l'ACHé, a induit chez le rat une augmentation de l'activité des enzymes disaccharidases au niveau des bordures en brosses ainsi qu'un accroissement du taux de transit intestinal (distance parcourue par le bleu de méthylène/longueur totale de l'intestin). Il a également perturbé la composition lipidique de la membrane plasmique des cellules épithéliales du jéjunum (augmentation de la teneur en phospholipides et une diminution du cholestérol) et a perturbé la structure du jéjunum : augmentation de la hauteur des villosités, hyperplasie des cellules caliciformes et infiltration de cellules inflammatoires (Vismaya et Rajini 2014).

3.2. Les effets de l'exposition maternelle à des organophosphorés sur l'homéostasie intestinale

Des études se sont attachées à évaluer les effets d'une exposition maternelle aux OPs. L'administration orale de CPF (5 mg/kg/j) du 6^{ème} jour de gestation au 10^{ème} jour postnatal, et du 6^{ème} jour gestationnel au 10^{ème} jour de lactation a été associée à une réduction du poids corporel à la naissance et à des troubles développementaux quelques jours après la naissance (Postnatal Day (PND)4)(Mattsson *et al.* 2000 ; Maurissen *et al.* 2000). De même, d'autres études ont également décrit une baisse du poids corporel des petits à la naissance après l'administration maternelle de CPF (15 mg/kg/j) pendant toute la période de gestation (Akhtar *et al.* 2006). Ces mêmes effets sont retrouvés lors d'une exposition uniquement durant la lactation (Mansour et Mossa 2010). Ces retards de croissance peuvent être des facteurs de prédisposition au développement d'une obésité (Lassiter et Brimijoin 2008). De plus, des embryons de grenouilles qui ont été exposés à des OPs présentent des défauts structurels dans le système nerveux et digestif. En effet, l'AChE, inhibée par ces produits, est nécessaire pour la morphogénèse intestinale et son inhibition induit des anomalies du tube digestif (Snawder et Chambers 1989). Cet effet est observé dans les cellules de l'endoderme, à l'origine de l'épithélium intestinal, dans lesquelles on retrouve de l'AChE au niveau des membranes lors du développement embryonnaire. L'AChE a des fonctions non estérases essentielles pendant la morphogénèse intestinale. Son inhibition induit un réarrangement de l'endoderme défectueux et un défaut de polarisation des cellules endodermiques (Pickett *et al.* 2017). De ce fait, l'exposition environnementale aux OPs perturbe non seulement la signalisation cholinergique, mais peut également perturber les fonctions morphogénétiques. De plus, chez les nouveau-nés, la barrière intestinale peut être pénétrée par les macromolécules plus facilement que celle des individus plus âgés (de Zwart *et al.*, 2004) car au début de la période postnatale, l'intestin humain immature est relativement perméable (Spence *et al.* 2011). Des études *in vivo* sur le système digestif de rats lors d'une exposition au CPF pré- et post- natale rapportent une expression plus élevée de MUC2 dans l'iléon et le côlon associée à une dysbiose microbienne au sevrage et au début de la période adulte. Ils observent également une modification morphologique des villosités intestinales donc une altération de la maturation de la paroi intestinale, une altération de la barrière muqueuse intestinale (réduction de l'expression de l'Acide Ribonucléique messager (ARNm) de ZO-1 dans l'iléon et le côlon et claudine 4 dans l'iléon) et donc une perméabilité élevée ainsi qu'une

stimulation du système immunitaire inné. Ces effets étaient particulièrement marqués au sevrage (Joly Condette *et al.* 2015, 2014). Enfin, des rats issus de mères ayant reçu du CPF pendant toute la durée de la gestation, de la lactation et en phase post-sevrage présentaient des modifications du microbiote intestinal accompagnées de signes de syndrome métabolique (Reygner *et al.* 2016).

3.3. Les effets de l'obésité maternelle sur l'homéostasie intestinale

L'exposition d'une co-culture cellulaire Caco-2 & HT29-MTX (70/30) à un excès de nutriments mimant une surnutrition a induit un état inflammatoire, une augmentation de la production de mucus, une diminution du nombre de jonctions serrées et a augmenté la perméabilité intestinale (Bottani *et al.*, 2019). Cela permet d'émettre l'hypothèse que l'obésité est associée à une perméabilité intestinale accrue. En effet, une alimentation riche en graisses induit une perméabilité intestinale accrue chez la souris. Ces perturbations sont caractérisées par une altération des protéines des jonctions serrées induisant une absorption élevée du LPS et donc une augmentation du taux plasmatique de TNF- α (Cani *et al.* 2008a). Des rats soumis à un régime obésogène (HFD) durant 16 semaines ont développé une obésité et ont présenté une intolérance au glucose. Le déséquilibre alimentaire a augmenté la perméabilité intestinale et a diminué l'expression des protéines des jonctions serrées dans l'intestin mais pas dans le côlon. Les poids du foie et du tissu adipeux étaient également augmentés. Cette étude suggère qu'une alimentation contenant un excès de lipides (graisses saturées animales essentiellement), mais pas une obésité génétique, perturbe la barrière intestinale (Suzuki et Hara 2010). Ces effets de l'altération de la fonction de la barrière intestinale avaient déjà été observés dans des modèles de souris génétiquement obèses. En effet, l'augmentation de la perméabilité intestinale et du passage accru de LPS due à une modification de l'organisation et de la distribution des protéines des jonctions serrées entraîne une inflammation systémique qui induit une résistance à l'insuline puis une obésité (Brun *et al.* 2007). L'inflammation au niveau de la barrière intestinale induite par l'obésité pourrait s'expliquer par une augmentation du taux d'AGs. En effet, les AGs nutritionnels activent la signalisation TLR4 dans les adipocytes et les macrophages et induisent une réponse inflammatoire *in vitro* (Shi *et al.*, 2006). Le HFD augmente la concentration plasmatique de LPS ainsi que la proportion de bactéries présentant celui-ci chez des souris soumises à un régime obésogène

pendant 24 semaines (Cani *et al.* 2007). En effet, un régime riche en graisses modifie le microbiote intestinal. Il diminue la densité de bactéries et augmente la proportion relative des ordres Bacteroidales et Clostridiales chez des rats. Le HFD induit également une augmentation de l'activation des TLR4 associée à une inflammation au niveau de l'iléon et une diminution de la phosphatase alcaline intestinale, une enzyme luminale qui détoxifie le LPS. Enfin, dans cette étude, la perméabilité intestinale et le taux de LPS plasmatique ont été augmentés (de La Serre *et al.* 2010). De ce fait, une augmentation de la circulation de cytokines inflammatoires, souvent observée chez des patients obèses, peut entraîner une altération de la barrière intestinale en modifiant la structure et la localisation des jonctions serrées. En conclusion, l'état inflammatoire induit par l'obésité est associée à des modifications de l'intégrité de la barrière intestinale en lien avec le microbiote intestinal (pour revue : Cani *et al.*, 2008; Vajro *et al.*, 2013). Cet état physiologique pourrait alors avoir des répercussions hépatiques. Des animaux soumis à un régime obésogène sont caractérisés par une prise de poids accrue accompagnée d'une hypertriglycémie hépatique et plasmatique, une dyslipidémie et une stéatose hépatique. Un apport alimentaire riche en graisses pourrait être un facteur de risque d'augmentation de la toxicité hépatique du CPF (Kondakala *et al.* 2017). L'exposition au CPF et le HFD ont entraîné la baisse l'expression des gènes impliqués dans la lipogenèse hépatique *de novo* ainsi que les enzymes du CYP450 impliquées dans le métabolisme hépatique des xénobiotiques (Howell *et al.* 2018).

Un modèle murin a souligné que l'obésité maternelle (HFD 8 semaines avant la grossesse, durant la gestation et la lactation) induisait au niveau de l'iléon de la descendance femelle, une augmentation de la perméabilité intestinale accompagnée d'une diminution de la fonction de barrière intestinale (réduction de la hauteur des villosités, une tendance à une diminution de l'expression de l'ARNm de ZO-2 et ZO-3 et à une augmentation des niveaux d'ARNm et de protéine de claudine-2, une réduction de la densité des cellules caliciformes par villosités) et enfin une réponse inflammatoire (augmentation du taux des TNF- α et IL-6) (Xue *et al.* 2014).

LA PHYSIOLOGIE HEPATIQUE

Suite à la digestion et l'absorption, de nombreuses molécules (nutriments, produits médicamenteux, xénobiotiques) provenant de la veine porte sont absorbées par les cellules du foie. Les enzymes présentes dans les hépatocytes interviennent dans de nombreux métabolismes : régulation du métabolisme glucidique, rôle important dans la synthèse de protéines plasmatiques, détoxification de l'ammoniaque. Le foie est également une zone de transit et de stockage de vitamines, de régulation du métabolisme des lipides, de métabolisation et détoxification de xénobiotiques (alcool, médicaments...), ou de sécrétion de la bile.... Son fonctionnement est contrôlé par des hormones notamment pancréatiques (insuline et glucagon), elles-mêmes sous l'influence de circuits nerveux spécifiques.

1. La morphogenèse et morphologie hépatique

Le foie est organisé en lobules, au sein desquels le flux sanguin passe de l'artère hépatique et de la veine porte hépatique, par des sinusoides localisées au sein de travées hépatocytaires jusqu'à la veine centrolobulaire. La bile produite s'écoule dans les canalicules biliaires interlobulaires. Les cellules hépatiques sont pour plus de 60 % d'entre elles des hépatocytes, mais on y retrouve également des cellules endothéliales qui filtrent le passage de particules, les cellules immunitaires comme les macrophages résidents (cellules de Kupffer), macrophages retrouvés aux embranchements des sinusoides, des cellules de Pit (lymphocytes) et enfin des cellules d'Ito, qui participent à la formation de la matrice cellulaire, stockent la vitamine A et régulent le flux sanguin sinusoidal (Figure 20).

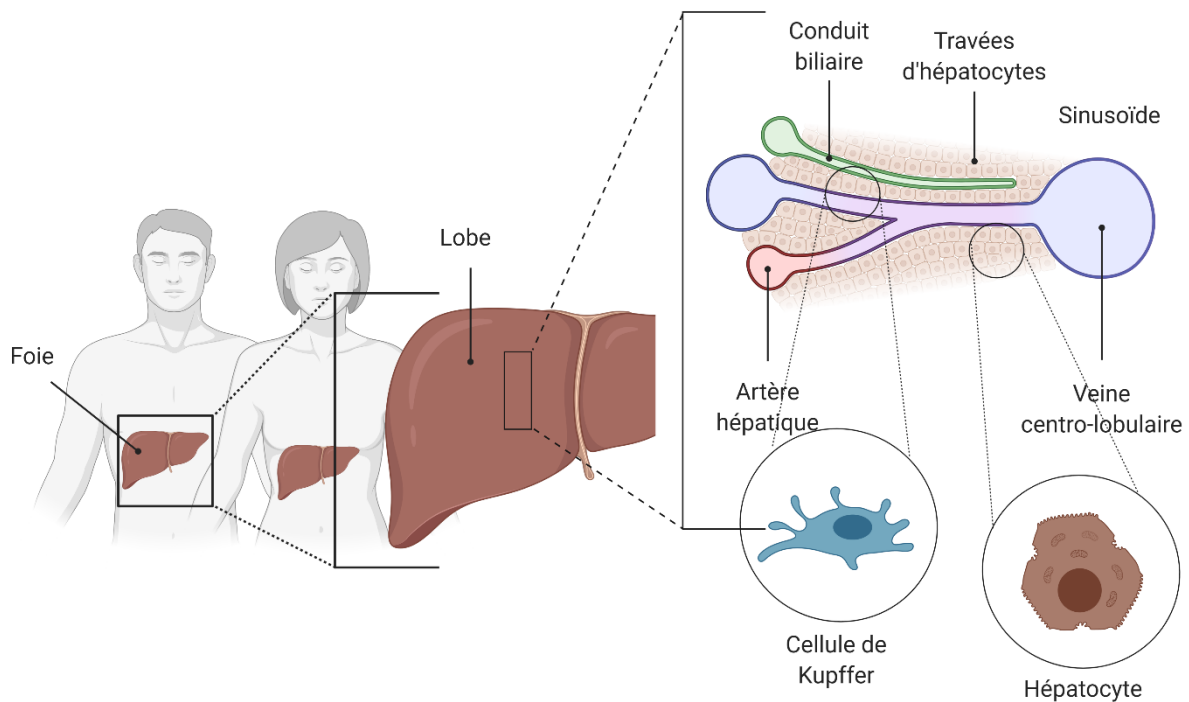


Figure 20 - Organisation hépatique (création personnelle sur BioRender.com)

2. Le métabolisme glucidique, lipidique, protéique et des xénobiotiques

2.1. Le métabolisme glucidique

Afin de maintenir l'homéostasie glucidique, le foie stocke le glucose sous la forme de glycogène afin de relarguer du glucose à distance des apports alimentaires, mais peut également en synthétiser à partir de substances provenant de la digestion ou d'autres métabolismes (néoglucogenèse). Le glucose intègre le foie par diffusion facilitée à l'aide d'un transporteur. Il est transformé en glucose-6-phosphate par la glucokinase et est ensuite utilisé par la voie de la glycolyse pour des besoins énergétiques ou vers la fabrication du glycogène pour être stocké. Lors de la glycogénogenèse, la glycogène synthétase accole des molécules de glucose pour former du glycogène pendant et après les repas. A l'inverse, lors d'un besoin de glucose (à distance d'un repas) la glycogénolyse se met en place et la glycogène phosphorylase dégrade le glycogène en glucose. Lors d'un jeun prolongé et lorsque le stock de glycogène est bas, le foie a également la capacité de synthétiser du glucose grâce à la néoglucogenèse. Ce processus représente la synthèse de glucose par les voies de sens inverse à celles de la glycolyse. Il s'initie par la dégradation oxydative des AGs. Pour des raisons énergétiques, trois étapes de la glycolyse ne sont pas réversibles (glucokinase, phosphofructokinase 1 et pyruvate kinase) et nécessitent des voies alternatives dont la

dernière est caractérisée par la transformation de l'oxaloacétate en phosphoénolpyruvate par la PEP carboxylase (PEPCK). Le glucagon diminue les voies de glycolyse et de glycogénogenèse et active la voie de la néoglucogénèse et glycogénolyse, à l'inverse de l'insuline (Jiang et Zhang 2003) (Figure 21). Le foie est également responsable du métabolisme du galactose et du fructose.

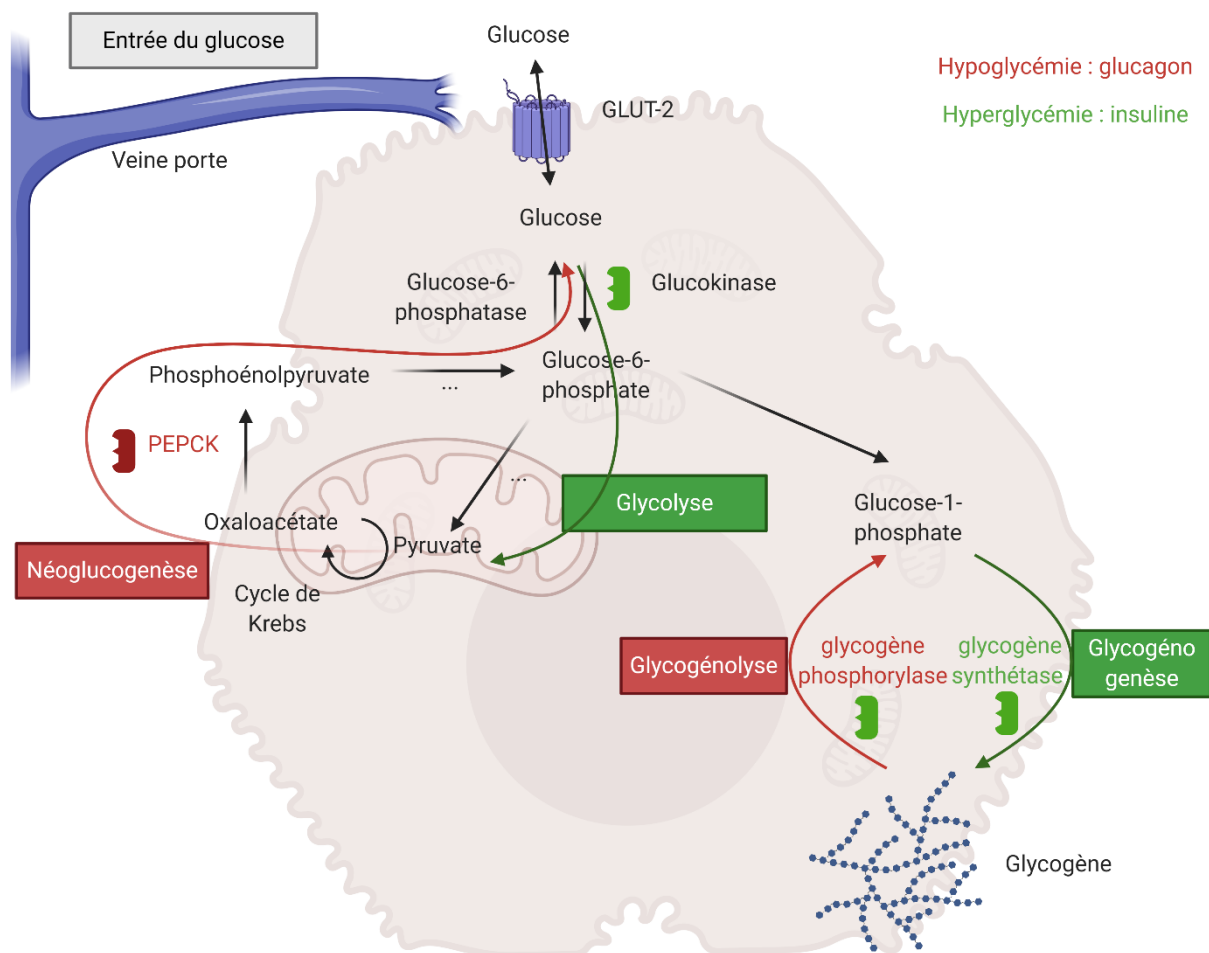


Figure 21 - Métabolisme glucidique hépatique (création personnelle sur BioRender.com)

2.2. Le métabolisme des lipides

La majeure partie des besoins en AGs sont satisfaits par notre alimentation, la synthèse *de novo* des AGs à partir d'acétyl-CoA, au niveau du foie, intervient lors d'un apport important de carbohydrates et d'un excès énergétique. La lipogenèse se produit, dans le cytosol, en deux étapes, l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) synthétise du malonyl-CoA à partir de l'acétyl-CoA, puis l'acide gras synthétase (FAS) le convertit en AGs (acide stéarique). Une grande partie des lipides alimentaires sont des triglycérides (AGs et glycérol) (95%). Suite à la digestion, ces lipides arrivent dans le foie via les chylomicrons après absorption via la lymphe et déversement dans la circulation sanguine. Ils seront prélevés par les tissus périphériques sous forme d'AGs et de glycérol après conversion par la lipoprotéine lipase (LPL) ou captés par le foie grâce à un récepteur reconnaissant l'apolipoprotéine E. Les lipoprotéines de très basse densité (VLDL) sont synthétisées dans le foie et transportent les TG et le cholestérol vers les tissus périphériques. La synthèse des VLDL s'accroît avec l'augmentation intrahépatique des acides gras libres (AGL généralement associée à un excès de tissus adipeux et des régimes riches en lipides. Les AGL sont éliminés dans le foie par le processus de β -oxydation (oxydation dans les mitochondries) ou alors ils sont exportés grâce aux VLDL sous forme de TGs (Lavoie et Gauthier 2006). Le foie intervient également dans la voie de retour du cholestérol qui fait intervenir les lipoprotéines de haute densité (HDL). Ainsi, le foie capture les HDL à l'aide de récepteurs spécifiques. Les facteurs stimulant la synthèse hépatique des lipoprotéines entraînent généralement une hypercholestérolémie et une hypertriglycéridémie. Enfin, le cholestérol est excrété dans la bile sous forme native ou d'acides biliaires, et retourne en partie au foie par le cycle entéro-hépatique. C'est le composant essentiel des membranes cellulaires des mammifères et le précurseur des acides biliaires, des hormones stéroïdes et de la vitamine D. Les lipides absorbés lors de la digestion et mis en réserve seront métabolisés à partir du tissu adipeux durant les phases d'activité physique et à distance des repas ou pendant le jeûne où la néoglucogenèse est active. La lipolyse est activée par le glucagon et implique la dégradation des triglycérides (Maitre et Bicklé 2008) (Figure 22).

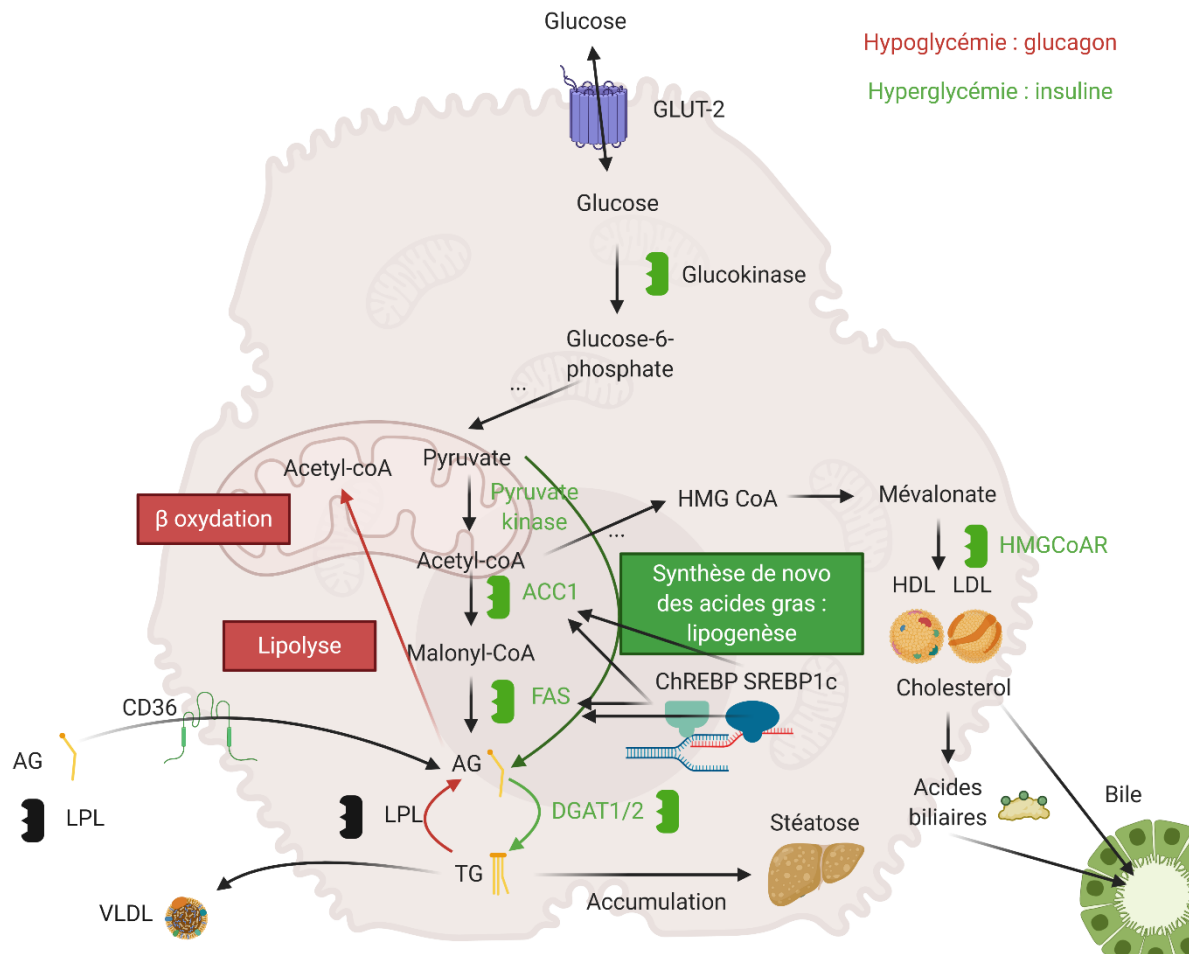


Figure 22 - Métabolisme lipidique hépatique (création personnelle sur BioRender.com)

2.3. Le métabolisme protéique et autres fonctions hépatiques

Le foie joue un rôle primordial dans la synthèse et le catabolisme protéique, d'une part du fait de son rôle dans la synthèse de nombreuses protéines plasmatiques et d'autre part dans la détoxification de l'ammoniaque provenant de la dégradation des acides aminés aboutissant à la synthèse de l'urée. En effet, la plupart des protéines plasmatiques proviennent du foie et sont principalement des glycoprotéines. Les maladies hépatiques altèrent quantitativement et qualitativement ces protéines circulantes. La principale de ces protéines est l'albumine, sans activité enzymatique ou hormonale connue. Elle sert de transporteur pour de nombreuses substances et en particulier, elle facilite le transport des AGs vers les tissus périphériques. De nombreuses autres protéines hépatiques plasmatiques interviennent dans la coagulation, la réaction inflammatoire, le transport spécifique d'ions ou d'hormones. Le foie participe également à la détoxification des xénobiotiques, substances absorbées en même temps que les nutriments, qui n'ont pas d'utilité pour l'organisme dans des conditions

normales, et doivent être éliminés. Ce peut être des métabolites d'origine végétale, des substances de synthèse (médicaments), des produits de pyrolyse apparus lors de la cuisson des aliments (Réaction de Maillard), des additifs alimentaires, des drogues multiples (produits de combustion de la cigarette, café, alcool, polluants...). S'ils sont hydrophobes, les xénobiotiques peuvent rester dans les structures riches en lipides et doivent souvent être transformés en substance hydrophile pour leur élimination. Les produits hydrophiles sont excrétés plus rapidement dans la bile ou les urines. Le foie participe à l'élimination des xénobiotiques en les détoxifiant grâce au CYP450 (Maitre et Bicklé 2008).

2.4. Les pathologies hépatiques

Un déséquilibre du métabolisme glucidique et lipidique hépatique est caractéristique de maladies telles que la stéatose hépatique non alcoolique (NASH pour non-alcoholic steatohepatitis) ou le diabète de type 2. Ceci peut s'expliquer par un excès d'AGL en provenance des tissus adipeux hyperplasiques/hypertrophiques, couplé à une résistance à l'insuline et sous l'influence de l'alimentation. Les glucides en excès sont convertis en AGL par lipogenèse *de novo* à l'aide de facteurs de transcription régulés à la hausse (tels que SREBP-1c ou ChREBP), ainsi que les enzymes de synthèse des AG *de novo* (ACC, FAS). Les mécanismes d'élimination des AGL tels que la β -oxydation ou l'exportation sous forme de TGs en tant que constituants des VLDL sont saturés, les TG s'accumulent sous forme de gouttelettes lipidiques dans les hépatocytes (stéatose). Une β -oxydation excessive des AGL entraîne un stress oxydant et une cytotoxicité, puis induisent des inflammasomes. Ces processus pathologiques conduisent à des lésions hépatocellulaires, au recrutement de cellules inflammatoires et à l'apoptose/nécroptose. Cela donne naissance à des maladies du foie gras hépatiques telles que la stéatopathie non alcoolique (non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)) qui sont caractérisées par une accumulation anormale de graisse intrahépatique en l'absence de consommation excessive d'alcool (Kuchay *et al.* 2020) (Figure 23). La NASH favorise l'accumulation de fibrose hépatique avec évolution vers la cirrhose ; elle est caractérisée par des troubles métaboliques et nutritionnels tels qu'une obésité, un diabète de type 2 et une hypertriglycéridémie.

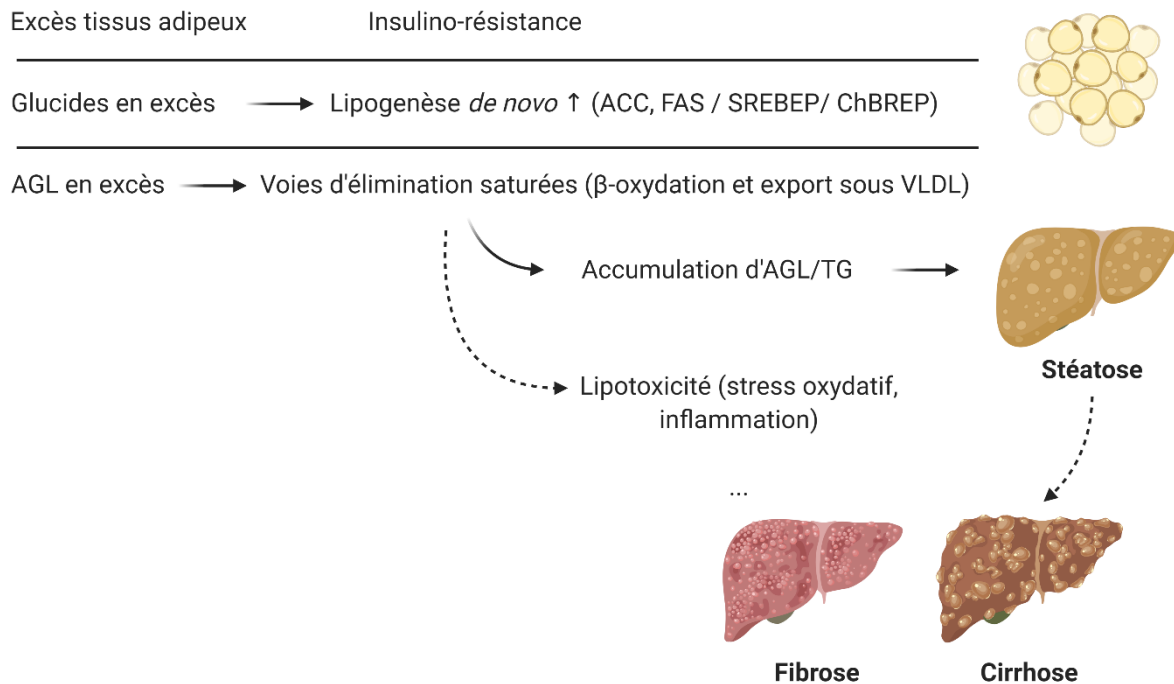


Figure 23 - Pathogenèse des maladies du foie gras - adapté et traduit de (Kuchay et al. 2020) (création personnelle sur BioRender.com)

Un des marqueurs principaux de fibrose hépatique chez l'homme est le gène du collagène de type 1 α -1 (COL1A1), l'un des deux principaux composants des fibres de collagène (Al-Qarni et al. 2020). Les phosphatases alcalines plasmatiques sont de bons marqueurs de lésions hépatiques (Epstein et al. 1986).

3. Les effets de facteurs environnementaux sur le métabolisme hépatique

3.1. Les effets des organophosphorés sur le métabolisme hépatique

Une exposition au CPF sur un modèle *in vitro* d'hépatome de rat a entraîné une augmentation de l'accumulation intracellulaire de lipides causée par une augmentation de l'accumulation de TGs dans les hépatocytes, elle-même résultant d'une augmentation de l'accumulation des AGL et de la lipogenèse *de novo*. Cependant le CPF a diminué la sécrétion cellulaire de TG induite par les AGL et n'a pas altéré la β -oxydation des AGs ni de stress oxydant cellulaire. Les auteurs émettent l'hypothèse que le métabolisme lipidique hépatique pourrait être modifié et induire une stéatose hépatique après une exposition au CPF (Howell III et al. 2016). Cette hyperglycémie peut être expliquée chez le rat par activation de la néoglucogenèse due à une

sécrétion d'hormones produites par les médullosurrénales avec une activité accrue de la glycogène phosphorylase et de la PEPCK (Abdollahi *et al.* 2004 ; Goel *et al.* 2005). L'hépatotoxicité a été confirmée par des modifications du profil des enzymes marqueurs de désordre hépatique ainsi que des lésions histopathologiques (Ncibi *et al.* 2008). Des altérations du métabolisme lipidique ont également été signalées chez des animaux exposés au CPF (Acker et Nogueira 2012 ; Elsharkawy *et al.* 2013 ; Peris-Sampedro *et al.* 2015). L'augmentation du cholestérol sérique pourrait provenir d'impacts des pesticides sur la perméabilité de la membrane des cellules hépatiques, signe de lésions hépatiques (Adham *et al.* 1997 ; Yousef *et al.* 2006). En effet, chez des rats mâles exposés au CPF (30 mg/kg) pendant 90 jours, il a été observé une hyperglycémie et une augmentation significative du cholestérol total, mais une diminution des taux de TGs (Elsharkawy *et al.* 2013). En effet, de manière générale les OPs auraient des impacts hépatotoxiques, modifieraient le métabolisme hépatique dont la β -oxydation des AGs et induiraient une inflammation et un stress oxydant dans le foie (Mesnage *et al.* 2017).

L'exposition maternelle aux OPs a des effets néfastes sur l'homéostasie du glucose et des lipides chez la descendance et augmente le risque de diabète au cours de la vie adulte (Slotkin 2011). L'exposition par voie sous cutanée néonatale au CPF (1 mg/kg) chez les rats lors des 4 premiers jours de vie était responsable de niveaux élevés de CT et de TG à l'âge adulte (110 jours) (Slotkin *et al.* 2005b). De plus, une exposition sous-cutanée au CPF (5 mg/kg) pendant la gestation (Gestational Day (GD) 9-12 ou GD17-20) ou les jours postnatals (PND1 à PND4) ou (PND11 à PND14) induit des poids hépatiques inférieurs chez les animaux au sevrage et les auteurs suggèrent que la toxicité développementale du CPF s'étend au-delà du système nerveux, et perturbent les cascades de signalisation cellulaire de l'homéostasie hépatique (Meyer *et al.* 2004).

3.2. Les effets de l'obésité ou du HFD sur le métabolisme hépatique

Les effets de l'exposition du CPF pourraient être exacerbés par un régime riche en graisses, dû à la potentielle bioaccumulation des OPs. Les maladies sous-jacentes de l'obésité sont le diabète de type 2, des maladies cardiovasculaires, des pathologies hépatiques (inflammation et fibrose) (revue : Reid, 2001). Une revue a recensé les diverses études sur les régimes alimentaires utilisés pour induire les NAFLD/NASH sur des modèles de rongeurs. Les régimes

HFD augmentent le poids corporel et la masse grasse et induisent une insulino-résistance chez les rongeurs (Radhakrishnan *et al.* 2020). Le HFD utilisé dans ces travaux, induit une obésité viscérale et une stéatose hépatique caractérisée par une augmentation des concentrations hépatiques et plasmatiques des AGs, des TGs et d'alanine aminotransférase (ALT) plasmatique chez des souris exposées pendant 8 semaines (Ito *et al.* 2007). L'inflammation hépatique pourrait être induite par une prolifération bactérienne au niveau intestinal et pourrait conduire à une fibrose chez le rat (Lichtman *et al.* 1990). En effet, la moitié des patients souffrants de NASH présente une augmentation de la prolifération bactérienne intestinale et une augmentation des taux de TNF circulants sans altération de la perméabilité intestinale (Wigg *et al.* 2001).

Dans de nombreuses études, le HFD maternel était associé à des niveaux plus élevés de poids corporel, de leptine, de glucose, d'insuline et de TG chez la progéniture plus tard dans la vie (pour revue : Tellechea *et al.*, 2017). L'exposition maternelle au HFD induit des altérations métaboliques (augmentation du poids corporel, hyperinsulinémie, programmation de l'adiposité...) chez la progéniture à l'âge adulte (7 mois) (Lecoutre *et al.* 2016). L'exposition néonatale des rats au parathion sous régime HFD a augmenté l'incidence de l'obésité, du diabète et des perturbations hépatiques et métaboliques (Adigun *et al.* 2010 ; Lassiter et Brimijoin 2008). Des primates exposés au régime obésogène ont présenté une augmentation de graisse corporelle ainsi que du taux de TGs chez leur descendance et l'apparition d'une NAFLD (McCurdy *et al.* 2009). De même, une exposition maternelle à un régime obésogène pendant la gestation et la lactation a provoqué une augmentation de la prolifération et de l'apoptose des hépatocytes ainsi qu'une stéatose et une fibrose péricellulaire chez la descendance mâle (Thompson *et al.* 2016). Des souris ont été exposées 12 semaines avant la conception à un HFD puis leur descendance mâle a reçu le même régime pendant 17 semaines. Sur cette descendance, les auteurs ont noté une modification du microbiote intestinal, une augmentation du poids du foie, la survenue d'une stéatose hépatique, une augmentation de l'expression des gènes codant pour la synthèse et le transport des AGs et un état pro-inflammatoire (Wankhade *et al.* 2018).

OBJECTIFS DE L'ETUDE

L'exposition maternelle à des organophosphorés est suspectée d'avoir des conséquences sur la programmation du métabolisme de l'individu de la phase fœtale à l'âge adulte (Slotkin 2011 ; Slotkin *et al.* 2005b). Une accumulation de ces pesticides et de leurs métabolites dans les tissus adipeux pourrait induire des troubles métaboliques importants. L'exposition à des résidus de pesticides alimentaires, la malnutrition et l'obésité maternelles constituent un environnement à risque de dérégulation de la programmation du métabolisme de leurs futurs enfants. En effet, les jeunes populations sont particulièrement sensibles et vulnérables aux facteurs environnementaux qui semblent, à terme, accroître les prédispositions à développer des maladies chroniques non communicables. Ainsi, la mise en place de l'homéostasie intestinale du fœtus et du jeune enfant peut être perturbée par de nombreux facteurs dès la naissance et pourrait induire des pathologies intestinales et métaboliques à l'âge adulte (obésité, diabète de type 2...) (Figure 24).

Nous sommes partis du postulat qu'une exposition maternelle à des résidus d'un pesticide OP dans l'alimentation et/ou un déséquilibre alimentaire pourrait induire, chez sa descendance, des troubles métaboliques et des perturbations digestives et hépatiques dans sa vie adulte. Cette perturbation de l'homéostasie intestinale pourrait avoir pour conséquence des effets à long terme sur sa santé

L'étude présentée ici avait pour objectif, dans un premier temps, de déterminer si une exposition répétée et péri-gestationnelle (pré-gestation, gestation et lactation) à de faibles doses orales de CPF induisait des troubles métaboliques, des perturbations de la physiologie digestive (altérations de la fonction de barrière intestinale, induction d'une inflammation digestive), du métabolisme hépatique ainsi que des troubles développementaux chez la descendance à l'âge adulte. De plus, nous avons évalué si les conséquences de la consommation par les mères d'une alimentation déséquilibrée comme un régime obésogène pourrait modifier les effets potentiels du pesticide.

Dans un second temps, nous avons souhaité explorer les impacts de ce pesticide sur la barrière épithéliale intestinale humaine à l'aide d'une approche *in vitro*. Nous avons évalué les effets du CPF sur une co-culture visant à mimer l'épithélium intestinal humain afin de vérifier si le CPF altérerait l'intégrité de la barrière intestinale et la perméabilité paracellulaire épithéliale. De plus, nous avons regardé si le CPF pouvait induire une réponse inflammatoire au niveau de cette barrière et quelles voies de signalisation pro-inflammatoires et pro-apoptotiques seraient potentiellement impliquées.

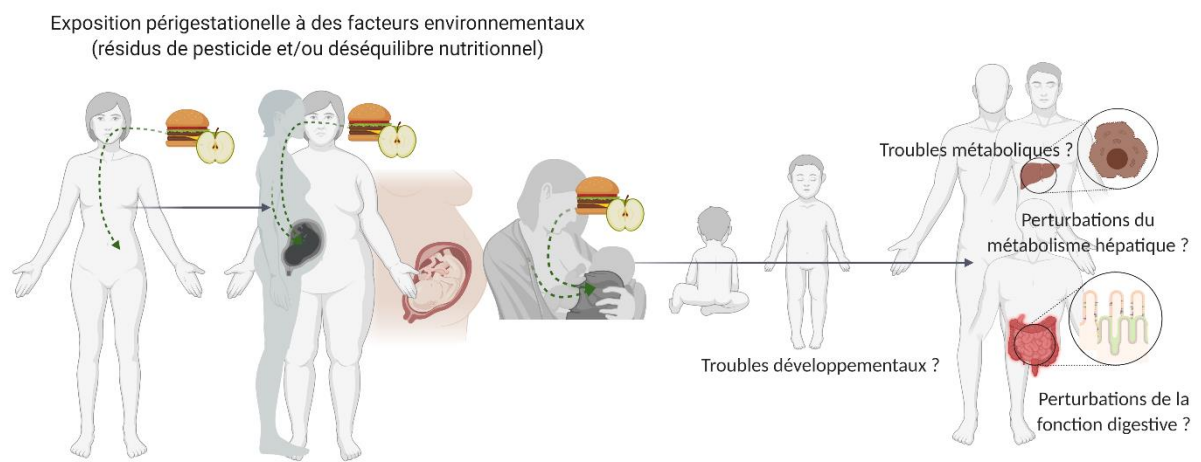


Figure 24 - Objectifs et hypothèses de l'étude (création personnelle sur BioRender.com)

METHODOLOGIE

Afin de répondre à ces objectifs deux approches expérimentales complémentaires ont été mises en œuvre. La première approche avait pour objectif de simuler les effets de ce pesticide sur la barrière intestinale humaine. La deuxième étude, sur le modèle animal, étudiait les perturbations digestives de rats issus de mères exposées au pesticide et/ou un régime obésogène quatre mois avant la conception et jusqu'à la lactation.

Afin d'étudier le fonctionnement de l'épithélium intestinal et ses interactions avec d'autres types cellulaires de la paroi, des modèles de cultures cellulaires de lignées épithéliales intestinales humaines sont couramment utilisés. La co-culture de cellules Caco-2 et H29-MTX représentent un bon modèle d'épithélium intestinal (Wikman-Larhed et Artursson 1995 ; Walter *et al.* 1996 ; Hilgendorf *et al.* 2000 ; Mahler *et al.* 2009 ; Béduneau 2014) et permet de simuler la barrière épithéliale intestinale. Ce modèle permet, en amont ou en complément de modèles expérimentaux *in vivo*, de mieux comprendre les effets de contaminants alimentaires, par exemple des pesticides, sur des perturbations de l'homéostasie intestinale.

Cependant, le recours au modèle animal est malgré tout justifié par l'absence de méthodes alternatives pour les études physiologiques et comportementales. Les paramètres étudiés dans notre étude sont liés à la cinétique de la survenue de l'obésité et de troubles métaboliques dans la descendance de rates gestantes présentant des troubles métaboliques liés à une alimentation déséquilibrée, impossible à modéliser autrement que par une étude chez l'animal de laboratoire. De plus, les interactions entre différentes fonctions physiologiques et organes (système digestif, microbiote, tissu adipeux et cerveau) sont impossibles à reproduire avec un modèle *in vitro*. Le modèle d'étude choisi est le rat, car il est un bon reflet des effets éventuellement observés chez l'Homme, de par la similitude des réponses physiologiques et comportementales mises en jeu lors de l'exposition à un régime obésogène ainsi qu'au pesticide d'intérêt. L'espèce choisie pour cette expérimentation est le rat Wistar, un rat albinos facile à manipuler et à élever. La littérature foisonne de données expérimentales sur ce modèle largement utilisé par la communauté scientifique (Janvier labs 2011)(Figure 25).

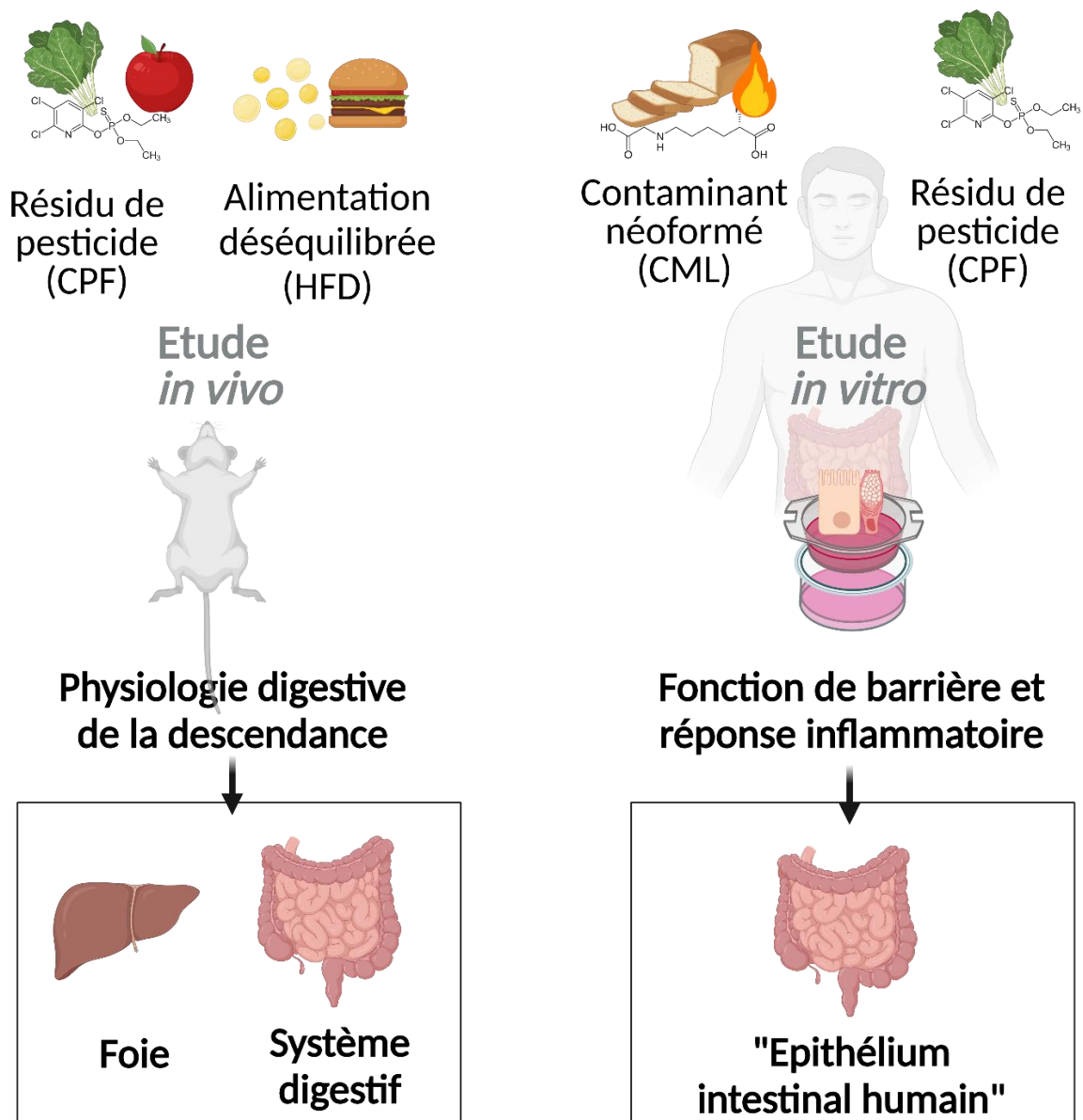


Figure 25 - Double approche méthodologique (création personnelle sur BioRender.com)

EVALUATION DE LA PERTURBATION DE LA FONCTION BARRIERE INTESTINALE ET DU METABOLISME HEPATIQUE CHEZ DES RATS ISSUS DE MERES EXPOSEES A UN PESTICIDE ET/OU UN REGIME OBESOGENE

1. Modèle d'exposition périnatale aux perturbateurs environnementaux

Seize femelles (âgées de 7 semaines à l'arrivée) ont été hébergées à raison de deux animaux par cage. L'intérieur des cages était tapissé d'une litière à base de maïs avec une litière foisonnante, additionnée d'un rouleau de carton et d'un fond sonore (radio). Les animaux ont eu un accès continu à l'eau de boisson et à l'alimentation. La pièce était à température contrôlée ($23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) avec une humidité relative constante de 26 % et un éclairage artificiel (cycle de 12h/12h jour/nuit). Le bien-être des animaux a été vérifié quotidiennement (état physique de l'animal, absence de stress lors de la manipulation...).

Après une période de 10 jours d'acclimatation, les 16 femelles âgées de 8 semaines ont été placées dans différentes conditions d'expérimentation. Durant cette période, les femelles ont été divisées en deux groupes de 8 rates exposées à un gavage quotidien au CPF (1 mg/kg) ou à son solvant (huile de colza), administrés à la même heure chaque matin. Chaque groupe a été divisé en deux sous-groupes, chacun soumis à un régime alimentaire standard ou le régime lipidique, appelé par la suite HFD. Ainsi les 16 rates ont été réparties en 4 groupes de 4 animaux chaque. Chaque rate a été pesée quotidiennement. Les rates ont été exposées aux différents traitements pendant 22 semaines en commençant 4 mois (16 semaines) avant la gestation et ce jusqu'à la fin de la lactation. Leur descendance n'a reçu aucun traitement particulier dans la suite de l'étude.

Après cette période de 4 mois d'exposition, les rates alors âgées de 6 mois, ont été mises en reproduction. Pour vérifier leur fécondation, la présence de spermatozoïdes dans le vagin a été vérifiée par la réalisation d'un frottis le lendemain matin. La présence de spermatozoïdes

et/ou la présence d'un bouchon vaginal désignait la femelle comme gestante. Une fois déclarées gestantes, les rates ont été réparties en cage individuelle et ont continué à être soumise à leur traitement initial pendant les 6 semaines suivantes (période de gestation puis de lactation).

Trois jours après la naissance, les ratons ont été sexés, pesés et comptés. Le tatouage a été effectué au niveau des pattes avec de l'encre vétérinaire. Le nombre de petits par portée était en moyenne de 10 ratons $\pm$ 5 ratons (4 ratons mâles par portée $\pm$ 3 ratons). Les ratons mâles représentaient 54 % de la descendance obtenue. Le nombre de ratons par portée n'a pas été significativement différent en fonction des groupes. Après le sevrage (PND21), ils ont été séparés de leur mère et divisés en groupes de 1, 2 ou 3 petits par cage jusqu'à l'âge de 8 semaines. Durant cette période les ratons ont été pesés tous les 3 jours à partir du 3^{ème} jour de vie et n'ont été soumis à aucun traitement ni aucun régime alimentaire spécifique. Afin d'éviter de potentielles perturbations liées au cycle menstruel ou aux impacts hormonaux, notamment sur les fonctions physiologiques, seuls les ratons mâles ont été inclus dans ce travail. A deux mois de vie, les rats ont été euthanasiés par une injection intrapéritonéale de pentobarbital sodique. La veille de leur mise à mort, les animaux ont été mis à jeun. Différents prélèvements ont été effectués dans des conditions stériles et conservés à -80°C: prélèvement sanguin, de pièces tissulaires provenant des différents segments de l'intestin grêle (jéjunum et iléon), de côlon proximal, de foie, de tissu adipeux, et de l'hypothalamus.

1.1. Exposition des mères au chlorpyrifos (CPF)

Le CPF a été acheté sous forme de poudre dans un flacon de 250 mg. Pour son administration, en raison de sa lipophilie, il a été dissous dans de l'huile de colza (le solvant). Il a été administré par gavage orogastrique.

1.2. Exposition des mères à un régime hyperlipidique-hypercalorique dit « HFD »

Les rates sont été nourries selon leurs groupes de traitement à l'un des deux régimes décrits ci-dessous :

- Un régime standard (Serlab 3436), dit régime d'entretien rongeur, contenant 3,13 kcal/g ou un régime enrichi en protéines et minéraux (Serlab 3336) durant les périodes de gestation et lactation, et contenant 3,41 kcal/g ;
- Un régime obésogène, riche en graisses (HFD D12492) (laboratoire Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Allemagne). Cet aliment contenait 5,16 kcal/g avec 60 % des calories totales sous forme de graisses. Aucune modification de la diète n'a été faite au cours de la gestation ni de la lactation (Figure 26).

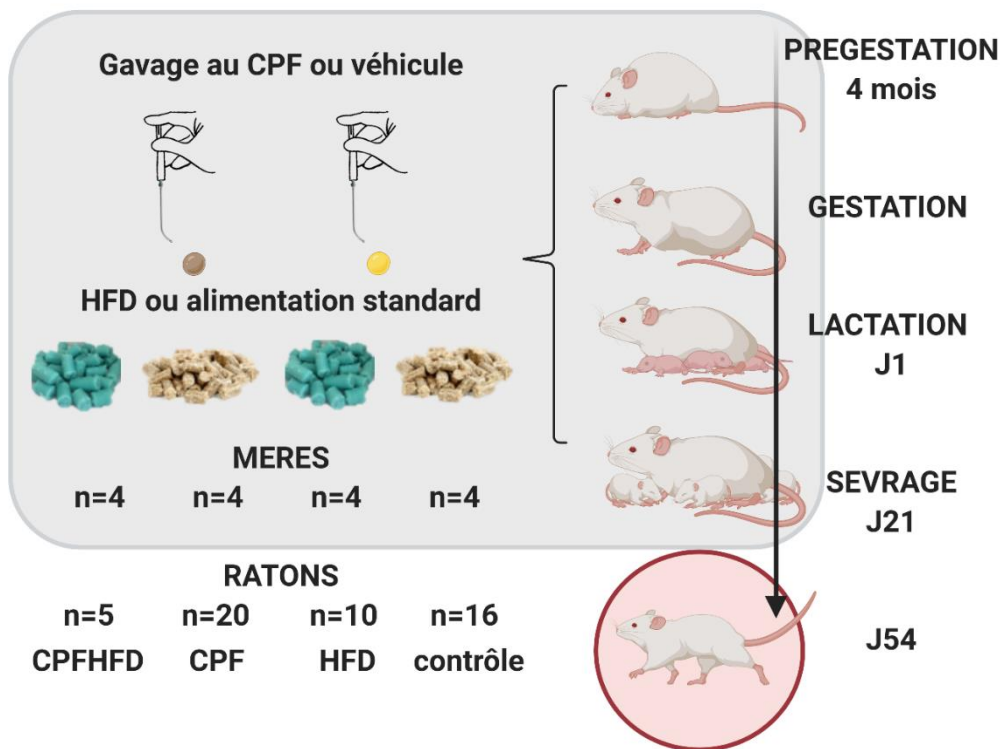


Figure 26 - Protocole expérimental du modèle animal (création personnelle sur BioRender.com)

2. Marqueurs de croissance corporelle de la descendance

Le poids des ratons a été mesuré tous les 3 jours du J3 à J54. La prise alimentaire des ratons a été évaluée tous les 3 jours pendant toute la durée de leur observation par pesée des refus. Cependant, pour le bien-être des animaux, nous avons privilégié un élevage non individuel, ne nous permettant pas de définir la prise alimentaire individuelle des rats. Ces données n'ont donc pas pu être exploitées et présentées.

3. Evaluation des lésions hépatiques chez la descendance

3.1. Evaluation de marqueurs sanguins de l'activité métabolique hépato-pancréatique

Afin de déterminer d'éventuelles modifications des activités hépato-pancréatiques chez la descendance, liées à l'absorption d'un régime hyperlipidique et/ou à l'exposition au CPF de leur mère, nous avons procédé à la détermination de différents marqueurs sanguins représentatifs de ces activités. Ainsi, nous avons réalisé la mesure des concentrations plasmatiques de marqueurs de l'altération de l'activité hépatique ALP, ASAT, ALAT et LDH. Nous avons aussi observé des marqueurs sanguins du métabolisme glucidique : glucose et insuline, et du métabolisme lipidique : leptine TG, CT, HDL et estimé la concentration de VLDL selon la formule de Friedewald (Friedewald *et al.* 1972). Ces mesures ont été réalisées grâce à une collaboration avec le laboratoire d'hormonologie de l'hôpital Cochin (Paris). Outre les marqueurs sanguins cités ci-dessus, les taux hépatiques des triglycérides (TGs) ont été évalués à l'aide d'un kit commercial.

3.2. Evaluation de l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme lipidique et glucidique

Après extraction des ARN totaux et transcription inverse, l'Acide DésoxyriboNucléique complémentaire (ADNc) a été amplifié par qPCR. La quantification relative de l'expression des gènes a été calculée par la méthode $2^{-\Delta\Delta CT}$. Cette méthode permet de calculer le facteur de variation normalisé de l'expression du gène cible dans un échantillon donné par rapport à un échantillon de référence. L'expression relative du gène est fixée à 1 pour les échantillons de référence.

La stabilité de l'expression des 4 gènes de ménage différents (*Gapdh*, *Hprt1*, *Ubc* et *Actb*) a été déterminée par RefFinder (Xie *et al.* 2012), le programme Normfinder (Andersen *et al.* 2004), le programme Genorm (Vandesompele *et al.* 2002) et le logiciel BestKeeper (Pfaffl *et al.* 2004) afin de ne retenir que le plus pertinent dans chaque tissu étudié.

Suite à cela, nous avons étudié les modifications de l'expression des gènes codant pour des protéines intervenant dans les processus de :

- Lipogenèse (*Srebf1*, *Acaca*, *Fasn*, *LPL*, *Mlxipl*) ;
- Métabolisme énergétique (*Prkaa1*) ;
- Gluconéogenèse (*G6pc*, *Slc2a2*) ;
- Néoglucogenèse (*Pck1*) ;
- Synthèse du cholestérol (*Hmgcr*) ;
- β -oxydation (*Ppara*) ;
- Accumulation lipidique (*Cd36*, *Pparg*, *Dgat1* et *Dgat2*) ;
- Fibrose (*Col1a1*) ;
- Réponse inflammatoire (*IL1b*).

3.3. Analyse histologique des perturbations hépatiques

Après sacrifice, un fragment de tissu hépatique a été fixé dans une solution de Carnoy (60 % d'alcool absolu, 30 % de chloroforme et 10 % d'acide acétique) pendant 48h. Les échantillons ont ensuite été coupés en sections de 5 μ m d'épaisseur et transférés sur une lame de verre afin de réaliser les différentes colorations d'intérêt.

Différentes colorations ont été effectuées afin d'évaluer les lésions hépatiques et l'apparition éventuelle de fibrose ou de stéatose hépatique.

La première coloration réalisée a été la coloration Periodic Acid Schiff (PAS) kit spécifique. Elle permet la mise en évidence d'aldéhydes et de substances mucoïdes et donc l'apparition de stéatose. La coloration de PAS permet de déterminer la richesse en glycogène sur la base du calcul du pourcentage d'hépatocytes PAS+. Le score de stéatose a été calculé selon la méthode Kleiner (Kleiner *et al.* 2005). La seconde coloration réalisée est celle du rouge Picro Sirius afin de visualiser les fibres de collagène I et III, dont l'altération est un signe de fibrose. Enfin, pour confirmer ces résultats, une coloration au trichrome de Masson a également été effectuée pour mettre en évidence les fibres des collagène (collagène de type I).

Les coupes histologiques ont été observées à l'aveugle par un histopathologiste. Les quantifications de coloration ont été effectuées sur cinq champs/lame (grossissement 100x) à l'aide du logiciel ImageJ.

4. Evaluation des perturbations de l'homéostasie intestinale de la descendance

4.1. Evaluation des modifications de la perméabilité intestinale

Le passage paracellulaire de l'Isothiocyanate de fluorescéine (FITC)-dextran dans la circulation sanguine a été mesuré par fluorimétrie comme marqueur de perturbation de la perméabilité intestinale. Les rats mâles ont été gavés avec 1mL de FITC dextran à la concentration de 60 mg/100g, 2h30 avant le sacrifice. La concentration de la molécule mesurée dans le sang reflète donc la quantité de FITC Dextran ayant traversé la barrière épithéliale digestive.

L'étude de l'expression des gènes codant pour des protéines des jonctions serrées : *Ocln*, *Cldn 4* et *Tjp1* a été réalisée par RT-PCR comme décrit précédemment. Les gènes de ménage retenus sont la *Gapdh* pour les segments de jéjunum et d'iléon, et la *Hprt1* pour le côlon.

4.2. Evaluation de l'induction d'une réponse inflammatoire

La mesure de la concentration plasmatique en LPS (dosage immunoenzymatique colorimétrique) visait à évaluer la translocation bactérienne témoignant elle aussi de l'altération de la perméabilité intestinale. A l'aide de la même approche nous avons également mesuré la modification de la concentration circulante de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , TNF α et IL-6) afin de mesurer l'apparition de signes inflammatoires systémiques.

4.3. Expression des gènes impliqués dans la protection immunitaire innée

Nous avons mesuré par RT-PCR l'expression de gènes codant pour :

- Les protéines d'immunité innée : *Defb1*, *Defb4*, *Tlr2* et *Tlr4* ;
- Les protéines mucines : *Muc1*, *Muc2* et *Muc3*.

4.4. Évaluation de la modification de la structure de la paroi intestinale

Les tissus digestifs ont été fixés dans une solution de Carnoy pendant 48h. Ce fixateur a été choisi car il est bénéfique pour la conservation du mucus (Johansson *et al.* 2015). Les échantillons ont ensuite été découpés en sections de 5 μm et transférés sur des lames de verre afin de procéder à la coloration. Les sections de tissus jéjunaux, iléaux et coliques ont été colorées au PAS.

Certains paramètres morphologiques ont été étudiés sur des zones de quatre champs/lame (grossissement 100 $\times$) à l'aide du logiciel ImageJ (Schneider *et al.* 2012) : évaluation de la couche de mucus par (zone positive colorée en rose par la coloration PAS/zone des villosités) et des zones positives pour la coloration du mucus (zone positive du PAS) ont été mesurées et le rapport des surfaces de sécrétion de mucus a été calculé (Elderman *et al.* 2017). Enfin, le nombre de cellules à mucus par villosité, exprimé en nombre de cellules à mucus/mm de villosité, a également été mesurée. De plus, l'épaisseur des différentes couches intestinales a été mesurée dans les segments intestinaux et coliques (jéjunum, iléon et côlon proximal). Nous avons déterminé l'épaisseur des couches intestinales sur tous les segments, épaisseur de la sous-muqueuse et de la muqueuse, épaisseur des couches musculaires circulaire et longitudinale, calcul de l'aire des villosités ont été mesurées sur tous les segments intestinaux de la descendance mâle. Les résultats ont été exprimés en μm^2 pour la zone de villosité et en μm pour les épaisseurs de la muqueuse, de la sous-muqueuse, des couches musculaires circulaires et longitudinales. L'ensemble des analyses de cette section est résumé en Figure 27.

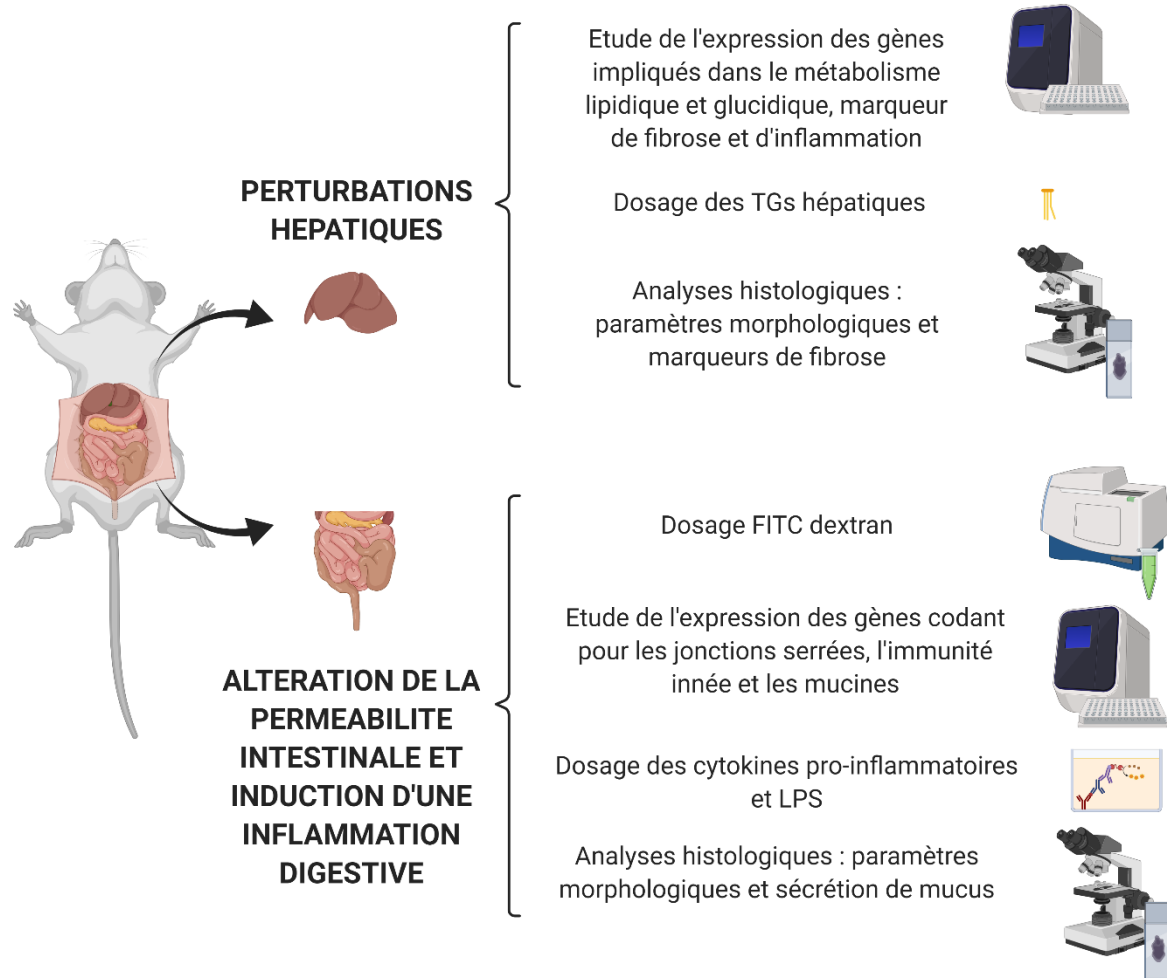


Figure 27 - Résumé des analyses de l'expérimentation animale (création personnelle sur BioRender.com)

EVALUATION DE LA PERTURBATION DE LA FONCTION BARRIERE INTESTINALE SUR UN MODELE CELLULAIRE REPRESENTATIF D'UN EPITHELIUM INTESTINAL HUMAIN EXPOSE A DES RESIDUS DE PESTICIDES

Notre épithélium intestinal est le premier à être exposé à des contaminants alimentaires. La difficulté aujourd'hui est de mettre au point un modèle pertinent permettant de reproduire *in vitro* la barrière épithéliale intestinale composée des bactéries adhérentes au mucus, du mucus lui-même et de l'épithélium composé de cellules absorbantes, les entérocytes et de cellules à mucus. Cette construction est complexe et aucune étude usant des deux lignées retenues dans ce travail, n'ont, à notre connaissance été publiées jusqu'à présent. L'objectif du travail présenté dans cette partie est d'évaluer sur une co-culture représentant un épithélium intestinal les conséquences de son exposition au CPF. Ce travail est pour partie repris dans la 3^{ème} publication. Les travaux concernant la N^ε-carboxyméthyllysine ne seront pas décrits ici car font partie d'un autre volet des collaborations entre le laboratoire PériTox_UMR I 01 et l'équipe PETALES.

1. Modèles d'étude de l'épithélium intestinal *in vitro*

Les cellules Caco-2, dérivées d'un adénocarcinome de colon humain à différenciation expriment le phénotype d'entérocytes (Tom *et al.* 1976) et forment spontanément un épithélium intestinal (Engle *et al.* 1998). Cette lignée cellulaire est hétérogène et dépendante des conditions de culture (Li *et al.* 2004). Le clone TC7 permet de reproduire la fonctionnalité de la cellule intestinale (Salvini *et al.* 2002) et d'étudier la fonction de barrière intestinale (Turco *et al.* 2011). Pour se rapprocher d'un modèle physiologiquement plus juste, nous avons fait le choix d'étudier ces cellules en présence de la lignée cellulaire HT29-MTX exprimant les caractéristiques des cellules caliciformes (Karlsson *et al.* 1993) ce qui permet d'associer le rôle de barrière du mucus au potentiel d'absorption des entérocytes. La co-culture de cellules

Caco-2 et HT29-MTX représentent un bon modèle d'épithélium intestinal (Wikman-Larhed et Artursson 1995 ; Walter *et al.* 1996 ; Hilgendorf *et al.* 2000 ; Mahler *et al.* 2009 ; Béduneau 2014) et permet de simuler la barrière épithéliale intestinale.

Elle permet également d'être plus proche de la réalité physiologique qu'une monoculture de Caco-2 (Pontier *et al.* 2001) même si la complexité des réponses de l'épithélium *in vivo* n'est pas totalement retrouvée. En associant la lignée Caco-2/TC7 à la lignée HT29-MTX, on associe le rôle de barrière du mucus au potentiel d'absorption des entérocytes. Ces modèles de co-culture permettent de simuler la barrière épithéliale intestinale afin de tester, par exemple, les effets de contaminants alimentaires sur cette muqueuse. Ils permettent, en amont ou en complément de modèles expérimentaux *in vivo*, de mieux comprendre les effets des pesticides par exemple, sur des perturbations de l'homéostasie intestinale.

2. Mise en place d'un modèle *in vitro* d'épithélium intestinal humain

Les cellules ont été cultivées séparément dans un milieu de croissance (DMEM Glutamax supplémenté avec 10 % de sérum foetal bovin inactivé (FBS) 1 % d'acides aminés non essentiels et 1 % de pénicilline/streptomycine dans un incubateur (37°C et 5 % de CO₂).

Les cellules ont ensuite été déposées (1×10^5) dans des inserts pour plaque de 6 puits semi-perméables en présence du milieu de croissance. Ce travail a été réalisé avec une monoculture de Caco-2/TC7 et une co-culture Caco-2/TC7 & HT29-MTX avec un ratio de 90/10. Au 20^{ème} jour, la culture mimant l'épithélium intestinal différencié a été placée dans un milieu sans sérum.

Nous avons commencé par tester la réactivité de ce clone cellulaire à un cocktail de cytokines pro-inflammatoires afin de nous rapprocher de données de la littérature décrivant la lignée mère Caco-2. Après 24h en milieu de survie, les cellules ont été exposées à un cocktail de cytokines pro-inflammatoires : TNF- α , IL-1 β et IFN- γ pendant 2, 6 ou 24h pour la monoculture et pendant 6 heures pour la co-culture, le temps d'exposition pour lequel nous avons obtenu la meilleure réponse des monocultures.

A l'issue des différents temps de stimulation, les milieux de l'insert (par la suite appelés « milieu apical ») et du puit (par la suite appelés « milieu basal ») ainsi que les tapis cellulaires ont été récoltés et conservés à -80°C en vue de réaliser les mesures de différents marqueurs d'intérêt.

3. Comparaison de l'évaluation de la sensibilité du modèle de monoculture et de co-culture à un stimulus inflammatoire induit par l'exposition à un cocktail de cytokines pro-inflammatoires

Grâce à la RT-PCR, nous avons analysé les variations de l'expression des gènes codant pour les voies de signalisation :

- Pro-inflammatoire : *MAPK14*, *MAPK8*, *MAP3K1*, *TNF- α* , *NF- κ B*, *CXCL8*, *STAT3* ;
- Pro-apoptotique : *CASP3*, *CASP9*.

Le gène *GAPDH* a été utilisé comme gène de ménage car c'est le plus stable dans nos conditions expérimentales comparé au gène *PPIA*.

La protéine pro-inflammatoire *CXCL8*, également connue sous le nom d'IL-8, a été dosée grâce à un kit immuno-enzymatique ELISA sur tous les échantillons de milieux basal et apical.

4. Evaluation des conséquences de l'exposition de la co-culture épithéliale intestinale au CPF

Suite à une étude préliminaire, nous avons retenu la dose de 300 μ M de CPF dissoute dans du méthanol (1 % final). En effet, ni le pesticide ni son solvant n'ont induit de cytotoxicité sur les monocultures et les co-cultures dans ces conditions.

Dans un premier temps, nous avons évalué la perturbation de la perméabilité intestinale *in vitro*. Afin d'évaluer l'effet du CPF sur la perméabilité paracellulaire, nous avons suivi, par fluorimétrie, les mouvements paracellulaires du FITC Dextran du milieu apical vers le milieu basal en présence du CPF.

Grâce à une RT-PCR, nous avons aussi mesuré l'évolution de l'expression des gènes codant pour la production des protéines intervenant dans :

- La constitution des jonctions serrées : *TJP1*, *OCLN*, *CLDN4* ;
- La constitution des microvillosités : *VIL1* ;
- La sécrétion de mucus : *MUC3*, *MUC5AC*.

Dans un second temps nous avons quantifié la sécrétion d'IL-8 (ELISA) dans les milieux apical et basal. En outre, nous avons également évalué, par RT-PCR, la variation de l'expression des gènes impliqués dans les voies de signalisation:

- Pro-inflammatoires: *CXCL8*, *MAPK14*, *MAPK8*, *MAP3K1*, *STAT3*, *NFκB*, *TNF-α*, *MyD88* ;
- Pro-apoptotiques: *CASP3* et *CASP9*.

L'ensemble de cette étude est résumé en figure 28.

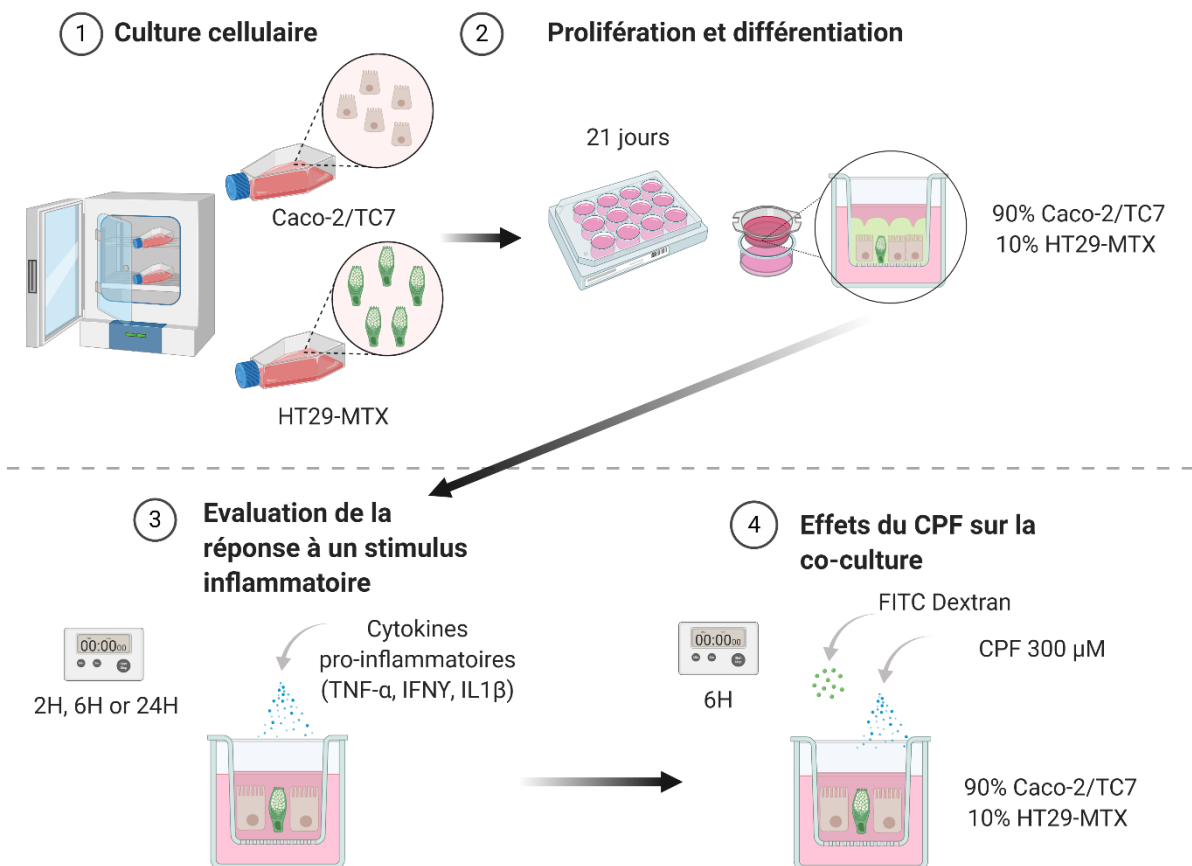


Figure 28 - Protocole expérimental de mise au point et d'induction d'une réponse inflammatoire dans un modèle *in vitro* d'épithélium intestinal puis exposé à un pesticide (création personnelle sur BioRender.com)

RESULTATS

**ETUDE 1 : L'EXPOSITION PERINATALE AU
CPF ET/OU A UN REGIME OBESOGENE
ENTRAINE DES LESIONS HEPATIQUES CHEZ
LA DESCENDANCE MALE**

Dans cette première étude, notre objectif était de déterminer si une exposition péri-gestationnelle (pré-gestation, gestation et lactation) au pesticide chlorpyrifos (CPF) et au régime riche en graisses (HFD) induirait chez la descendance mâle, un profil obésogène, des troubles métaboliques et des lésions hépatiques, à l'âge de jeune adulte.

Les altérations des activités métaboliques lipidiques et glucidiques au niveau hépatique ont été mesurées sur des biopsies hépatiques ou à l'aide de marqueurs sanguins sur la descendance mâle âgée de 8 semaines issue de mères exposées au CPF et/ou HFD.

Nous avons pu mettre en évidence grâce à ce travail qu'une exposition chronique à de faibles doses de CPF était responsable d'altérations du développement chez les rats mâles, caractérisées par un faible poids de naissance et une diminution des taux plasmatiques de facteur de croissance (IGF1) et du taux de leptine. Ces effets étaient encore présents au sevrage, alors que les animaux étaient encore exposés au pesticide via le lait maternel, et semblaient disparaître à l'âge de jeune adulte lorsque les animaux n'étaient plus exposés. Même si nous n'avons pas observé d'effet cumulatif du HFD sur les effets liés au CPF, il est intéressant de noter que l'exposition maternelle au HFD a augmenté le poids des rats exposés ou non au CPF, à tout âge.

L'exposition maternelle au CPF ou HFD a diminué l'expression de gènes clés de la lipogenèse (*Acaca* et *Fasn*) ainsi que l'expression de marqueurs d'accumulation lipidique (*Cd36*, *Dgat1* ou *Dgat2*). Cependant, nous avons observé une légère augmentation du taux de TG dans le tissu hépatique, qui peut être expliquée par une expression accrue de la *Lpl* après une exposition maternelle au CPF. Au niveau histologique, nous avons observé un aspect normal des hépatocytes, et l'absence de stéatose quel que soit le traitement. La descendance issue de mères exposées au CPF et/ou au HFD présentait donc une réduction globale du métabolisme lipidique, qui pourrait mettre en lumière une dérégulation des principales voies lipogéniques hépatiques, conduisant à un dysfonctionnement métabolique hépatique. Cependant, la co-exposition à la fois au CPF et au HFD a eu tendance à induire les mêmes effets que les expositions étudiées séparément. Nous n'avons donc pas observé d'effet synergique apparent.

L'exposition maternelle au CPF et au HFD a également modifié le métabolisme du glucose. En effet, nous avons noté une réduction de l'expression génique de *Slc2a2* et de *G6pc* impliqués dans la néoglucogenèse. Ces effets pourraient être liés à la fois à une hyperglycémie et à une

faible augmentation de l'insulinémie, observés chez les ratons issus de mères exposées au CPF. De plus, l'insuline inhibe la transcription du gène *Pck1*, acteur clé de la néoglucogenèse, phénomène observé chez la descendance de mères exposées au HFD. On pourrait donc s'attendre à une diminution de la captation du glucose par les cellules hépatiques entraînant une augmentation de la glycémie et une diminution de la synthèse des lipides. Dans notre étude, les TGs étaient peu synthétisés dans le foie alors que leur taux semble augmenter au niveau plasmatique. Cet aspect a été corrélé à l'augmentation de l'expression des gènes *Lpl* et *Ppara*, chez les ratons issus de mères exposées au CPF.

Pour aller plus loin, nous nous sommes intéressés à l'altération de l'architecture des tissus hépatiques et à l'induction d'une inflammation à bas bruit. Notre étude histologique n'a révélé aucune cirrhose ni fibrose chez les ratons à la fin de l'étude et ce, quel que soit le groupe étudié. Les taux d'enzymes hépatiques avaient tendance à être plus élevés après une exposition périnatale au CPF, ce qui suggère une augmentation des lésions de la membrane plasmique des cellules hépatiques. Cette hausse était significative pour l'ALP, le marqueur le plus sensible des atteintes hépatiques. Nous avons montré également une réduction de la taille des hépatocytes chez les ratons issus de mères exposées au CPF, reflétant des lésions hépatiques et potentiellement de la limitation de la croissance cellulaire. De plus, l'expression du gène *Col1a1*, était augmentée chez ces mêmes ratons, ce qui pourrait être un marqueur prédictif d'une fibrose ultérieure. Au contraire, l'exposition maternelle au HFD n'a entraîné aucune altération, chez la descendance, de l'expression des marqueurs de lésions hépatiques, à l'exception d'une légère tendance à la hausse des taux des enzymes hépatiques.

En l'absence de contact direct de la progéniture avec les facteurs délétères sauf par voie placentaire lors de la gestation et par le lait maternel jusqu'au sevrage, l'exposition de la mère au CPF et au HFD a entraîné des perturbations de l'activité métabolique du foie de la descendance âgée de 8 semaines. L'exposition maternelle au CPF a induit une réduction de la néoglucogenèse et de la lipogenèse *de novo* chez la descendance, avec un risque potentiel de future fibrose hépatique. L'exposition maternelle au HFD a quant à elle eu des effets très similaires au CPF, mettant en évidence la survenue de troubles métaboliques en l'absence de signes inflammatoires. La co-exposition à la fois au CPF et au HFD n'a pas augmenté les effets observés par rapport à chaque facteur pris séparément.



Perinatal exposure to chlorpyrifos and/or a high-fat diet is associated with liver damage in male rat offspring

Marion Guibourdenche^{a,b}, Hiba El Khayat El Sabbouri^a, Fideline Bonnet^c,
Narimane Djekkoun^a, Hafida Khorsi-Cauet^a, Aurélie Corona^a, Jean Guibourdenche^c,
Véronique Bach^a, Pauline M. Anton^b, Jérôme Gay-Quéheillard^{a,*}

^a Laboratoire PériTox-INERIS UMR_I 01, Université Picardie Jules Verne, Amiens, France

^b Institut Polytechnique UniLaSalle, Université d'Artois, ULR 7519, Beauvais, France

^c Laboratoire de Biologie Hormonale, CHU Cochin, Université Paris Descartes, AP-HP, Paris, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Chlorpyrifos
High-fat diet
Maternal exposure
Metabolic diseases
Liver
Rats

ABSTRACT

Metabolic impairments in childhood are known to promote the development of type 2 diabetes and/or obesity in adulthood. These impairments may result from perinatal exposure to harmful environmental factors, such as pesticide residues or the consumption of a “western” diet. In the present study, we sought to determine whether an obesogenic profile, metabolic disorders and liver damage in offspring (observed during young adulthood) were related to maternal exposure to the pesticide chlorpyrifos (CPF) and/or a high-fat diet (HFD) starting 4 months before conception and ending at weaning. After the end of exposure, 51 male rat pups were left to develop under normal conditions and were studied in young adulthood. Despite the absence of direct exposure to harmful factors (other than through the dam's milk), maternal exposure to CPF or an HFD was associated with changes in the offspring's metabolic activity in the liver in the offspring. This indirect exposure to CPF was associated with a relative reduction in the expression of genes coding for enzymes involved in lipid or glucose metabolism but did induce histopathological changes in the offspring at adulthood. Maternal exposure to an HFD alone or to CPF alone gave similar results in offspring, changes in the same direction. Exposure of the mother to HFD did not exacerbate CPF effects. Co-exposure to both CPF and HFD did not increase the observed effects compared to each factor taken separately.

1. Introduction

The prevalence of obesity or overweight in children is a serious, growing public health concern and is associated with greater morbidity and mortality in early adulthood. There is a genetic predisposition to obesity/overweight: parental obesity doubles the risk of adult obesity in

children under the age of 10 (Whitaker et al., 2009) and is therefore a major risk factor in this context. The biological mechanisms that underlie these effects have not yet been fully elucidated, although a growing body of evidence suggests that environmental factors during pregnancy may modulate foetal growth and development and thus predispose the offspring to metabolic diseases in later life (for a review,

Abbreviations: Acaca, acetyl-CoA carboxylase 1; *Actb*, beta actin; ALAT, alanine aminotransferase; ALP, alkaline phosphatase; ASAT, aspartate aminotransferase; BW, body weight; *Cd36*, fatty acid translocase; cDNA, complementary DNA; *Col1a1*, collagen alpha-1; CPF, chlorpyrifos; *Dgat1*, diglyceride O-acyltransferase 1; *Dgat2*, diglyceride O-acyltransferase 2; DOHAD, Developmental Origins of Health and Disease; *Fasn*, fatty acid synthase; *Gapdh*, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; *G6pc*, glucose-6-phosphatase; HDL, high-density lipoprotein; HF, high-fat diet; *Hmgcr*, 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A reductase; *Hprt1*, hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1; IGF1, insulin-like growth factor-1; *IL1b*, interleukin 1 beta; *Lpl*, lipoprotein lipase; LDH, lactate dehydrogenase; *Mlxip1/Chrebp*, carbohydrate response element binding protein; NOAEL, no observable adverse effect level; OP, organophosphate; PAS, periodic acid Schiff; *Pck1/Pepck*, phosphoenolpyruvate carboxykinase; PND, postnatal day; *Ppara*, peroxisome proliferator-activated receptor alpha; *Pparg*, peroxisome proliferator-activated receptor gamma; *Prkaa1/Ampka*, AMP-activated protein kinase catalytic subunit alpha; RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction; SC, standard chow diet; SEM, standard error of the mean; *Slc2a2/Glut2*, solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 2; *Srebf1/Srebp1c*, sterol regulatory element binding factor 1 variant 2; TC, total cholesterol; TG, triglyceride; T2DM, type 2 diabetes; *Ubc*, Ubiquitin C; VLDL, very-low-density lipoprotein.

* Corresponding author at: PériTox, Université Picardie Jules Verne, CURS, Chemin du Thil, F-80025 Amiens, France.

E-mail address: jerome.gay@u-picardie.fr (J. Gay-Quéheillard).

<https://doi.org/10.1016/j.cdev.2021.203678>

Received 28 November 2020; Received in revised form 28 March 2021; Accepted 28 March 2021

Available online 19 April 2021

2667-2901/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

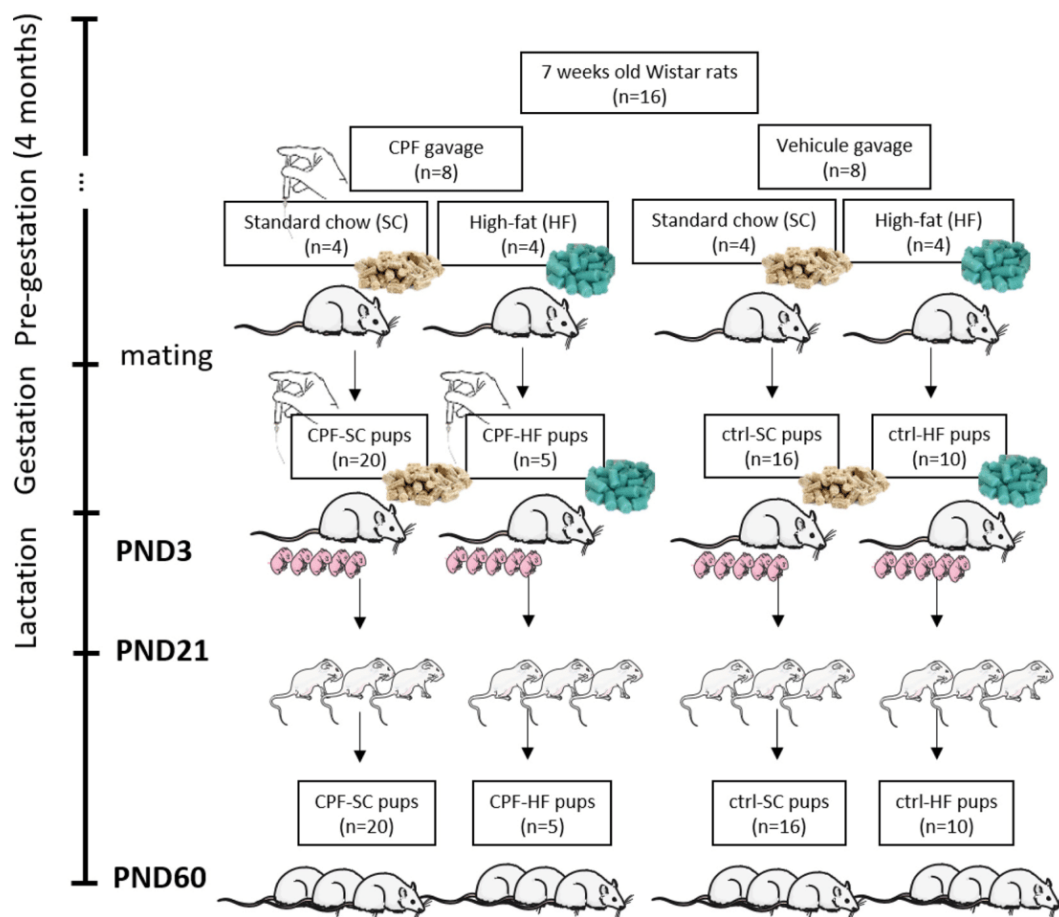


Fig. 1. The experimental plan.

The left-hand panel shows the experiment's timeline, and the main panel shows the groups and events for the dams and the offspring. CPF, chlorpyrifos; HF, high-fat diet; SC, standard chow diet; PND, postnatal day.

see Sarron et al., 2020). These environmental factors include pesticides, i.e. substances used to control organisms that are harmful for plants and animals in agriculture. Even though the use of pesticides increases yields in agriculture, it is increasingly clear that these compounds have detrimental health effects - particularly during highly sensitive periods of life. The perinatal period comprises several highly plastic developmental phases, during which sensitivity to environmental factors is at its highest. The maternal environment (including exposure to chemical agents) might therefore influence foetal growth. Most of these factors are likely to influence growth directly through changes in nutrient transfer or damage to the thyroid gland, or indirectly through foetal immunotoxicity and neurotoxicity (Kamai et al., 2019). Indeed, prenatal pesticide exposure is likely to contribute to the occurrence of obesity and type 2 diabetes later in life, exemplifying the "Developmental Origins of Health and Disease" concept. Organophosphates (OPs) are still the most widely used category of pesticides worldwide, although their known consequences on both animal and human health means that use in France and other countries is currently decreasing. The OPs' main mechanism of action is the irreversible inhibition of acetylcholinesterase activity in both insects and mammals. However, other mechanisms are probably involved in the long-term effects of foetal or neonatal OP exposure (Slotkin, 2004). Most human exposure is due to the oral ingestion of pesticide residues present on fruits and vegetables. Since OPs and their metabolites cross the placenta easily, a foetus can be exposed throughout pregnancy (Fish, 1966). The OP chlorpyrifos-ethyl (CPF) has been widely used to protect cereal crops against pests. However, CPF's use has been questioned because a large body of evidence shows that this compound can disrupt embryonic development (Slotkin

et al., 2005b) and affect the foetal nervous system (Hunter et al., 1999; Akhtar et al., 2006) - phenomena that have repercussions in postnatal life (Slotkin, 1999). Early-life CPF exposure alters glucose and lipid metabolism (culminating in prediabetes) (Slotkin, 2011) and induces oxidative stress and lipid peroxidation. The persistence of these alterations into adulthood suggests that adverse effects can be transgenerational (Ndonwi et al., 2019). This type of exposure is a known risk factor for obesity (Lassiter and Brimijoin, 2008) and is responsible for maternal and developmental toxicity (Maurissen et al., 2000). We have reported previously that repeated, low-level, oral maternal exposure to CPF was altering foetal development resulting in long-term neurological effects on the offspring with later consequences in adulthood (Laporte et al., 2018). We also showed that CPF exposure during gestation and development has both short- and long-term impacts on the digestive tract (Joly Condette et al., 2015). Furthermore, we suggested that various types of pre- and post-natal exposure could impair adult metabolism and biochemical status and thus predispose the individual to metabolic syndrome. This hypothesis was developed further in a recent review; the researchers hypothesized that OP exposure is hepatotoxic, induces inflammation and oxidative stress, and leads to hyperglycaemia and other impairments in glucose metabolism (including increased glycogenolysis and gluconeogenesis) thus directly associating OPs with obesity and diabetes (Czajka et al., 2019). In particular, CPF exposure was shown to impair lipid metabolism and induce histopathological changes in the liver (Elsharkawy et al., 2013).

Furthermore, the mother's diet and body composition before pregnancy have a great influence on her child's future health (Barker, 2003). A study of 97 overweight or obese pregnant women found the latter's

weaning (PND21; 73.5 g $\pm$ 5.65 g in the ctrl-HF group, vs. 55.5 g $\pm$ 1.50 g in the ctrl-SC group; relative increase: 32%; $p = 0.0317$). At the end of the study (PND54), the body weight was greater (but not significantly) in the ctrl-HF group (322.2 g $\pm$ 12.99 g) than in the ctrl-SC group (288.8 g $\pm$ 4.36 g; relative increase: 12%; $p = 0.1932$). Furthermore, perinatal HF diet exposure was associated with a significantly greater body weight in CPF-HF rats soon after birth (PND3; 10.09 g $\pm$ 0.13 g, vs. 7.99 g $\pm$ 0.11 g in CPF-SC; relative increase: 26%; $p = 0.0015$), at weaning (PND21; 71.27 g $\pm$ 0.99 g in CPF-HF vs. 47.20 g $\pm$ 2.60 g in CPF-SC; relative increase: 51%; $p = 0.0017$) and at early adulthood (PND54; 313.2 g $\pm$ 7.08 g in CPF-HF vs. 285.0 g $\pm$ 3.64 g in CPF-SC; relative

respectively) in male offspring of dams from the CPF-SC group, relative to the ctrl-SC offspring. However, these differences were not statistically significant. Perinatal HFD exposure was also associated with a higher hepatic TG content (by 35%, vs. the ctrl-SC offspring; $p = \text{NS}$). There were no significant intergroup differences in the lipid profile (Table 3).

Plasma levels of insulin-like growth factor-1 (IGF1) and leptin were significantly lower in the CPF-SC offspring than in the ctrl-SC offspring (relative decreases: 49.11%, $p = 0.0043$, and 57.80%, $p = 0.0321$, respectively). The insulin level and glycaemia were slightly but not significantly higher (relative increases: 20% and 23%, respectively) in

the incidence of obesity independently of dietary factors (Adigun et al., 2010). Lastly, it has been reported that an obese phenotype can exacerbate the toxicity of CPF exposure in mice (Kondakala et al., 2017). Hence, the primary objective of the present study was to determine whether, in rats, exposure of dams to CPF and an HF diet, from 4 months before gestation to weaning, increased the occurrence of obesity, metabolic disorders and liver damage among their male offspring.

2. Methods

2.1. Animal housing

We studied 51 male offspring of 16 female Wistar rats (Janvier laboratory - Saint Berthevin, France). All animals were pair-housed in stainless-steel, enriched cages (with a roller, a sizzle pad, and hardwood chip bedding) at a controlled temperature ($23 \pm 1^\circ\text{C}$), at constant relative humidity (26%) with a 12-hour/12-hour dark/artificial light cycle (El Khayat El Sabbouri et al., 2020).

The animals' welfare was monitored daily. All experimental protocols had been audited by the local animal care and use committee (C2EA#96, Amiens, France) and approved by the French Ministry of Research (reference: APAFIS # 8207-2016121322563594 v2). All animal experiments complied with the European Union Directive 2010/63/EU.

2.2. Animal experiments

The male offspring of dams exposed to the different environmental conditions were monitored from birth until early adulthood, i.e. post-natal day (PND) 60. The offspring were not exposed to chemical treatments or non-standard environmental factors and had ad libitum access to a standard chow diet (SCD, Serlab 3436 maintenance chow, Serlab, Montataire, France) and water (Fig. 1) throughout the study. After one week of acclimation, the 16 dams (mean $\pm$ standard error of the mean body weight: 225 ± 17 g at 8 weeks of age) were assigned at random to the two experimental groups: one group ($n = 8$) received chlorpyrifos-ethyl (CPF, O,O-diethyl O-(3,5,6-trichloro-2-pyridinyl) phosphorothioate (LGC Standards Laboratory, Molsheim, France), 1 mg/kg BW/day per os in 1 mL/kg rapeseed oil vehicle (MP Biomedicals, Illkirch, France)) and the other group ($n = 8$) received vehicle alone (1 mL/kg) (Fig. 1).

The CPF and non-CPF groups were each subdivided into an HF group ($n = 4$, in which 60% of the energy came from fat; D12492 chow; Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Germany) or an SCD group ($n = 4$, with Serlab 3436 maintenance chow or, during gestation and lactation, Serlab 3336 breeding chow) (Fig. 1). This model has been shown to induce metabolic alterations (elevated BW, hyperinsulinemia, programming of adiposity, etc.) in the offspring at adulthood (7 months of age) (Lecoutre et al., 2016). A recent study showed that standard maintenance chow (as used in the present experiment) is a suitable control for a 16- to 18-week HFD study; a low-fat diet is not necessarily required for effects on the phenotype (weight gain), metabolism (glucose tolerance, levels of high-density lipoprotein (HDL), triglycerides (TGs), plasma cytokines and adipocytokines) and behavioural outcomes (Almeida-Suhett et al., 2019).

Furthermore, we studied the HFD's transgenerational influence on

6

Gross energy (GE)	25	16.1	17
MJ/kg			
Metabolizable energy (ME) MJ/kg	21.6	13.1	14.3
Metabolizable energy density (Kcal/g)	5.16	3.13	3.41
Major nutrients (%)			
Crude protein	24.4	18.5	23.5
Crude fat	34.6	4.5	5.5
Crude fibre	6.0	4.5	3.0
Crude ash	5.3	6.5	5.7
Starch	0.1	35	36
Sugar	9.4	Unknown	Unknown
N-free extracts	26.3	54	51.3
Minerals (%)			
Calcium	0.92	1.05	1.00
Phosphorus	0.64	0.80	0.74
Magnesium	0.23	0.20	0.20
Sodium	0.20	0.20	0.20
Potassium	0.97	0.78	0.80
Chlorine	Unknown	0.36	0.33
Amino acids (%)			
Arginine	0.95	1.10	1.50
Lysine	2.02	1.00	1.40
Methionine	0.86	0.39	0.60
Methionine + cysteine	1.31	0.76	0.60
Tryptophan	0.33	0.20	0.27
Threonine	1.07	0.65	0.87
Vitamins (/kg)			
Vitamin A	15,000 IU	14,000 IU	14,000 IU
Vitamin D3	1,500 IU	1,000 IU	1,000 IU
Vitamin E	150 mg	110 mg	110
Vitamin K	20 mg	2 mg	2 mg
Thiamine (B1)	25 mg	30 mg	32 mg
Riboflavin (B2)	16 mg	20 mg	21 mg
Pyridoxine (B6)	16 mg	14 mg	14 mg
Cobalamin (B12)	30 µg	50 µg	50 µg
Nicotinic acid	47 mg	70 mg	70 mg
Pantothenic acid	55 mg	33 mg	33 mg
Folic acid	16 mg	2 mg	2.4 mg
Biotin	300 µg	220 µg	220 µg
Choline	920 mg	2000 mg	2000 mg
Vitamin C	Unknown	40 mg	40 mg
Trace elements (mg/kg)			
Iron	168	250	200
Zinc	65	60	68
Copper	13	14	15
Iodine	1.2	1	1
Manganese	95	60	40
Selenium	0.2	0.3	0.27

^a Contains (in g/kg, totalling 1000): pork lard (315), casein (277), maltodextrin (156), sucrose (85), cellulose powder (60), mineral premix (60), soybean oil (31), vitamin premix (10), L-cystine (3.5), choline chloride (2.5), dye (blue) (0.3), butylated hydroxytoluene (0.1), corn starch (0). Fatty acid composition of the HFD: lauric acid (0.07%), myristic acid (0.44%), palmitic acid (7.93%), stearic acid (4.37%), arachidic acid (0.11%), linolenic acid (0.49%), linoleic acid (4.64%), palmitoleic acid (0.94%), and oleic acid (13.97%).

^b Contains: wheat middling, wheat, barley, soybean meal (non-GMO), corn (non-GMO), poultry meal, wheat starch, whey powder, soybean oil (2.13%), sunflower cake, brewer's dried yeast, minerals, vitamins, and amino acids.

^c Contains: flaked oats, soybean meal (non-GMO), poultry meal, wheat middling, wheat starch, barley, herring meal, grass meal, whey powder, corn (non-GMO), soybean oil, minerals, vitamins, and amino acids.

the offspring (all of which received a SC diet), rather than on the exposed dams. Further details of the diets are given in Table 1.

At the age of 24 weeks (i.e. after 4 months of exposure), the 16 dams (mean body weight: 316 ± 33 g BW) were mated. Pregnancy was confirmed by the presence of spermatozoa and/or a plug in the vagina, checked twice with a smear early on the following morning. After fertilization, pregnant females were individually housed in clean plastic cages. The various treatments and diets (CPF vs. vehicle, and HF diet vs. SC diet) were continued until the end of the lactation period. PND1 was defined as the day of parturition. On average, a litter comprised 10 ± 5 pups, with 4 ± 3 males. There were no intergroup differences in the litter size. Male pups accounted for 54% of the offspring. Each pup was tattooed on the leg with a special veterinary ink (Centravet, Nancy, France) for individual identification. The pups were counted, sexed and weighed at PND3. To limit potential maternal separation stress in early life, the pups were not weighed at PND1. At weaning (PND21), the pups were separated from their mothers and were fed tap water and standard chow (Serlab 3436) ad libitum (Fig. 1). In order to avoid potentially confounding factors (such as menstrual cycles and the impact of hormones

on physiological functions), only male pups were studied further (Fig. 1) in the following four groups: (i) the ctrl-SCD group (maternal exposure to SCD and vehicle, $n = 16$); (ii) the CPF-SCD group (maternal exposure to SCD and CPF, $n = 20$), (iii) the ctrl-HFD group (maternal exposure to an HFD and vehicle, $n = 10$), and (iv) the CPF-HFD group: maternal exposure to both CPF and HFD ($n = 5$).

Due to poor fertility, the number of male pups was lower in the co-exposure group (CPF-HF) than in the other groups. Pups were weighed every 3 days until PND54 (early adulthood). Animals were fasted on the night before sacrifice. Rats were euthanized at PND60 (8 weeks of age) with a single, lethal, intraperitoneal injection of pentobarbital sodium (EXAGON®, Axience SAS, Pantin, France; 140 mg/kg - 0.35 mL/kg). Tissue samples and blood were immediately harvested under sterile conditions and stored at -80°C . For the gene expression study, liver tissue samples were harvested and dived into the Invitrogen RNAlater Stabilization Solution (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France) - a non-toxic tissue storage reagent that rapidly permeates tissues to stabilize and protect cellular RNA. Plasma samples were obtained by centrifugation and immediately frozen at -80°C .

Table 2
Metabolic genes assessed in the study.

		Gene name	Forward primer	Reverse primer	Tm	Accession number and reference
Housekeeping genes	<i>Gapdh</i>	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase	AGACAGCCGCATCTTCTTGT	CTTGCCGTGGGTAGAGTCAT	60	NM_017008.4 (Melgar-Rojas et al., 2015)
	<i>Actb</i>	Beta actin	ACGTCGACATCCGCAAAGACCTC	TGATCTCCTTCTGCATCCGGTCA	60	(Li et al., 2018)
	<i>Hprt1</i>	Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1	TCGTACCTTTCTCACCACAGTATCTAG	GAAACTAAGACACCTCCCCATCA	60	NM_017314.1 (Long et al., 2019)
	<i>Ubc</i>	Ubiquitin C	CTCATGGACTGATTATGGACAGGAC	GCAGGTCAGCAAAGAACTTATAGCC	60	NM_012583 (Hermier et al., 2017)
Lipogenesis	<i>Srebf1</i>	Sterol regulatory element binding protein 1 c	GCTGTTGGCATCCTGCTATC	TAGCTGGAAGTGACGGTGGT	60	NM_011480 (Li et al., 2018)
	<i>Acaca</i>	Acetyl-CoA carboxylase 1	TGTCTATTCGGGGTGACTTTCG	CCGTTCAATTATCACCACGTAGG	60	NM_022193 (Ahmed et al., 2015)
	<i>Fasn</i>	Fatty acid synthase	GAGCTGCGGCTACGTGGCTA	GCCGCCGTGAGGTTGCTGTT	60	NM_017332 (Ahmed et al., 2015)
	<i>Lpl</i>	Lipoprotein lipase	CAAGATTCACCTTTCTGGGACTGA	GCCACTGTGCCGTACAGAGA	60	NM_012598.2 (Mukherjee et al., 2008)
Energy metabolism	<i>Mlxipl</i>	Carbohydrate response element binding protein	ACAACCCTGCCTTACACAG	GAGGTGGCCTAGGTGGTGTGA	60	NM_133552.1 (Vida et al., 2014)
	<i>Prkaa1</i>	AMP-activated protein kinase α	ATTTGCCAGTTACCTCTTTCC	GCTTGGTTCATTATTCTCCGAT	60	NM_023991.1 (Li et al., 2018)
	<i>G6pc</i>	Glucose-6-phosphatase	CGTGGAAGAAAAAGTCAAC	GTAAATCCAAGTGCGAAAC	60	NM_013098 (Seo et al., 2010)
	<i>Slc2a2</i>	Glucose transporter 2	AAGGATCAAAGCCATGTTGG	GGAGACCTTCTGCTCAGTGG	60	NM_012879 (Ahmed et al., 2015)
Cholesterol synthesis	<i>Pck1</i>	Phosphoenolpyruvate carboxykinase	GAAAGTTGAATGTGTGGGTGAT	TTCTGGGTTGATGCCCTTA	60	NM_198780 (Stepien et al., 2011)
	<i>Hmgcr</i>	3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A reductase	ACTATGGTTCITTTCCGTGCC	AAAACACCAGCTTCCAGCTT	60	NM_013134 (Seo et al., 2010)
	<i>Ppara</i>	Peroxisome proliferator activated receptor alpha	ATTGGCGTTCGCAGCTGTTT	CTCGTGTGCCCTCCCTCAAG	60	NM_013196 (Zhang et al., 2018)
	<i>Cd36</i>	Cluster of differentiation 36 also known as fatty acid translocase	AACCAGAGGAAGTGGCAAAG	GACAGTGAAGGCTCAAAGATGG	60	NM_031561.2 (Chen et al., 2016)
Lipid accumulation	<i>Pparg</i>	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma	GCTGGCCTCCCTGATGAATA	GCTTCCGCAGGCTTTTGA	60	XM_032905882.1 (Sloop et al., 2004)
	<i>Dgat1</i>	Diacylglycerol O-acyltransferase 1	GGACAAAGACCGGCAGACCA	CAGCATCACCACGCACCAAT	60	NM_053437 (Chen et al., 2016)
	<i>Dgat2</i>	Diacylglycerol O-acyltransferase 2	CCTGGCAAGAACGCAGTCAC	GAGCCCTCCTCAAAGATCACC	60	NM_001012345 (Chen et al., 2016)
	<i>Col1a1</i>	Collagen type I alpha 1 chain	TACAGCACGCTTGTGGATGG	CAGATTGGGATGGAGGGAGTT	60	NM_053304.1 (Seo et al., 2010)
Inflammation	<i>IL1b</i>	Interleukin 1 beta	CTTCCTTGTGCAAGTGTCTGAAGC	AAGAAGTCTTGGGTCTCATCC	60	NM_031512.2 (Shih et al., 2005)

2.3. Evaluation of possible impairment of lipid and glucose metabolism in offspring exposed perinatally to CPF and/or an HF diet

2.3.1. Gene expression of proteins involved in lipid and carbohydrate metabolism, as measured in a reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total RNA was isolated from liver samples using the FastGene Basic® RNA kit (NIPPON Genetics Europe, Dueren, Germany). The total RNA concentration was measured spectrophotometrically using a Nanodrop 1000 spectrophotometer (Life Technologies). cDNA was generated by reverse transcription of 1 µg mRNA with the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor (Life Technologies), as described previously (Joly Condette et al., 2015). The expression of genes coding for proteins involved in lipid and carbohydrate metabolism was measured using RT-PCRs (Table 2).

Primers and SYBR™ Green Master Mix were purchased from Life Technologies. PCRs were run on a 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Reactions were performed in duplicate.

Four housekeeping genes (*Gapdh*, *Hprt1*, *Ubc*, and *Actb*) were tested under the same conditions. Expression stability was determined using RefFinder (Xie et al., 2012) BestKeeper (Pfaffl et al., 2004), Normfinder (Andersen et al., 2004) and Genorm (Vandesompele et al., 2002) programs with the help of the delta-Ct method (Silver et al., 2006). After a comparison of the results, *Gapdh* was selected as the best housekeeping gene (Supplementary material 1). Levels of amplified cDNA were quantified using the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method ($\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T_{\text{exposed}}} - \text{mean } \Delta C_{T_{\text{control}}}$), relative to *Gapdh*.

2.3.2. Assays of lipid and carbohydrate metabolic markers in plasma

Plasma glucose and lipids (TGs, total cholesterol (CT), and HDL) were assayed on a Roche COBAS analyser (Roche Diagnostic, Meylan, France). The concentrations of very-low-density lipoprotein (VLDL) and low-density lipoprotein (LDL) were calculated as $VLDL = TG / 2.2$ and $LDL = CT - HDL - VLDL$. Liver enzymes: alkaline phosphatase (ALP), aspartate aminotransferase (ASAT), alanine aminotransferase (ALAT), and lactate dehydrogenase (LDH), were also assayed on a Roche COBAS analyser. Lastly, leptin and insulin were assayed using the specific rat ELISA Kit (# KRC2281 and #ERINS; Life Technologies) with detection ranges of 62.5–4000 pg/mL and 4.69–300 µIU/mL respectively. All plasma assays were performed in the Endocrinology Laboratory at Cochin Hospital (Paris, France).

2.4. Evaluation of impairments in hepatic metabolism in offspring exposed perinatally to CPF and/or an HF diet

2.4.1. Hepatic TG levels

Hepatic TG levels were evaluated in 10 mg of liver tissue, using the PicoProbe Triglyceride Quantification Assay Kit (Fluorometric) ab178780 from Abcam, Cambridge, United Kingdom, according to the manufacturer's instructions. Liver TG levels (expressed in mg/g liver tissue) were determined in a microplate-based fluorometric assay (excitation/emission = 535/587 nm). In order to relate the well fluorescence intensity to the TG level, a standard curve (from 0 to 4000 pmol/mL) was generated. All assays were performed in duplicate.

2.4.2. Liver tissue structure

Immediately after sacrifice, pieces of liver left lobe were fixed in Carnoy's solution (60% absolute alcohol, 30% chloroform, and 10% acetic acid v/v) during 48 h before being embedded into xylene and then paraffin. Samples were then sliced into 5 µm sections and transferred to glass slides for staining with three different reagents. The first set of slides was stained with periodic acid Schiff (PAS) reagent (395B-1KT, Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Germany), in order to (i) highlight carbohydrates (mucins, basal lamina, glycogen...) in the liver tissue, and (ii) estimate liver glycogen levels (based on the proportion of

PAS-positive hepatocytes). The second set of slides was stained with Picro Sirius Red, in order to visualize collagen type I and III fibres and evaluate fibrosis (if present). The third set of slides was treated with Masson's trichrome stain, to reveal collagen fibres. Histological sections were observed under the light microscope (Olympus U TV1 X, Olympus, Japan) by a histopathologist who was blinded to the group assignment. Photos were taken using a camera attached to the microscope (Olympus DP-10 Digital Camera, Olympus America, New York). Staining was quantified on two fields/slide (100× magnification) with the help of ImageJ software (Schneider et al., 2012).

2.5. Statistical analysis

Data were expressed as the mean ± standard error of the mean (SEM) and were analysed using GraphPad Prism software (version 5.04 for Windows, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA www.graphpad.com). Groups were compared using a non-parametric Kruskal-Wallis test; if the intergroup difference was statistically significant, Dunn's post-hoc test was then applied. The threshold for statistical significance was set to $p < 0.05$.

For additional information, please refer to the Key Resources Table.

2.6. Key resources table

Reagent or resource	Source	Identifier
Antibodies		
Bacterial and virus strains		
Biological samples		
Chemicals, peptides, and recombinant proteins		
Chlorpyrifos-ethyl (CPF) (O, O-diethyl-O-(3,5,6-trichloro-2-pyridinyl))	LGC Standards Laboratory, Molsheim, France	IPO 141
phosphorothioate solution		
Rapeseed oil (1 mL/kg/day)	MP Biomedicals, Illkirch, France	ICN 0296005501 CAS 8002-13-9
HFD; 60% energy from fat Table 1	laboratory Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Germany	D12492
Standard chow diet (SCD): maintenance chow - Serlab 3436 see Table 1	Serlab, Montataire, France	3436
Standard chow diet (SCD): breeding chow during gestation and lactation - Serlab 3336 see Table 1		3336
EXAGON® FR/V/3138222 7/2014 - 26/02/2014	Axience SAS, Pantin, France	GTIN: 03760087152524 Classification ATC Vet: QN51AA01
RNAlater Stabilization Solution	Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France	AM7021
Critical commercial assays		
FastGene Basic® ARN kit	NIPPON Genetics Europe, Dueren, Germany	FG-80050
The High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor	Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France	4368814
Insulin rat ELISA Kit	Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France	# ERINS
Leptin rat ELISA Kit	Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France	# KRC2281
Fluorometric Triglyceride Quantification Assay Kit	Abcam, Cambridge MA	ab178780
PAS specific kit	Sigma-Aldrich. Merck KGaA. Darmstadt, Germany	395B-1KT
Deposited data		
Experimental models: Cell lines		

(continued on next page)

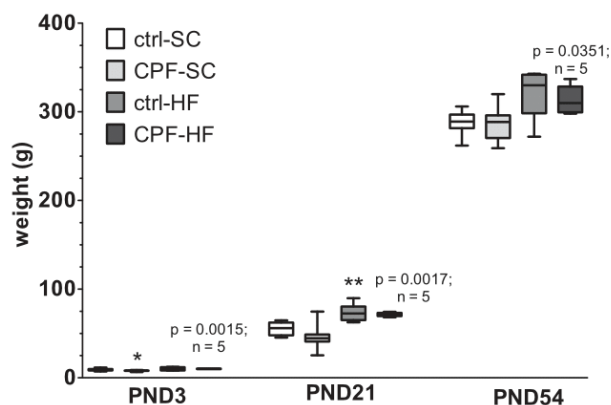


Fig. 2. Body weight (g) at birth (PND3), after weaning (PND21) and in early adulthood (PND54) in male offspring born to mothers exposed to CPF and/or an HF diet.

Data were expressed as the mean $\pm$ SEM (n = 5–20). *, ** significant difference ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively) vs. ctrl-SC offspring. ctrl, control; CPF; chlorpyrifos; HF, high-fat diet; SC, standard chow diet; PND; postnatal day.

(continued)

Reagent or resource	Source	Identifier
Experimental models: Organisms/strains Wistar rat	Janvier Labs, Saint Berthevin, France	RN-WI-F
Oligonucleotides Primers see Table 2	Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France	Custom Standard DNA Oligos
Recombinant DNA Software and algorithms GraphPad Prism software	GraphPad Prism for Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com (Xie et al., 2012)	Prism Windows 5.04
ReFinder ImageJ software Other	(Schneider et al., 2012)	

3. Results

3.1. Perinatal exposure to CPF with an SC or an HF diet is associated with alterations in the growth rate and glycaemia but not in lipemia

3.1.1. Perinatal exposure to CPF is associated with slower pup growth from birth until weaning

Male pups from mothers exposed to CPF had a significantly lower mean $\pm$ SEM body weight immediately after birth (PND3; 7.99 ± 0.11 g in the CPF-SC group, vs. 9.04 ± 0.32 g in the ctrl-SC group; relative decrease: 12%; $p = 0.0196$) (Fig. 2). In contrast, perinatal exposure to an HF diet was associated with a significantly greater body weight at weaning (PND21: 73.3 ± 3.03 g in the ctrl-HF group, vs. 55.5 ± 1.90 g in the ctrl-SC group; relative increase: 32%; $p = 0.0317$). At the end of the study (PND54), the body weight was greater (but not significantly) in the ctrl-HF group (322.2 ± 12.99 g) than in the ctrl-SC group (288.8 ± 4.36 g; relative increase: 12%; $p = 0.1932$). Furthermore, perinatal HF diet exposure was associated with a significantly greater body weight in CPF-HF rats soon after birth (PND3; 10.09 ± 0.13 g, vs. 7.99 ± 0.11 g in CPF-SC; relative increase: 26%; $p = 0.0015$), at weaning (PND21; 71.27 ± 0.99 g in CPF-HF vs. 47.20 ± 2.60 g in CPF-SC; relative increase: 51%; $p = 0.0017$) and at early adulthood (PND54; 313.2 ± 7.08 g in CPF-HF vs. 285.0 ± 3.64 g in CPF-SC; relative

Table 3

Lipid and carbohydrate metabolism in 8-week-old male offspring of dams exposed to CPF and/or an HFD.

	ctrl-SC	CPF-SC	ctrl-HF	CPF-HF
TC ($\mu\text{mol/L}$)	2214 ± 72.6	2252 ± 92.0	2064 ± 86.4	1987 ± 63.3
TG ($\mu\text{mol/L}$)	951 ± 73.7	1139 ± 103.1	960 ± 94.4	1463 ± 69.8
TG (mg/g liver)	24.21 ± 3.5	27.37 ± 1.4	32.89 ± 4.0	36.06 ± 8.21
HDL ($\mu\text{mol/L}$)	1533 ± 62.1	1573 ± 74.1	1470 ± 69.7	1323 ± 57.8
LDL ($\mu\text{mol/L}$)	478.3 ± 32.3	426.6 ± 25.2	759.7 ± 25.7	370.7 ± 15.8
Fasting glycaemia (mmol/L)	11.69 ± 0.8	14.43 ± 0.8	13.53 ± 1.3	14.99 ± 2.4
Fasting leptin (pg/mL)	622.3 ± 86.3	$305.6 \pm 33.6^*$	759.7 ± 163.1	469.1 ± 63.9
Fasting insulin (mIU/L)	10.12 ± 0.9	12.19 ± 1.3	9.73 ± 0.7	10.33 ± 3.8
Fasting IGF1 (ng/mL)	6.47 ± 0.33	$3.74 \pm 0.57^{**}$	6.00 ± 0.50	4.61 ± 1.73

Plasma samples were assayed for total cholesterol (TC), plasma and hepatic triglycerides (TGs), high-density lipoprotein (HDL), low-density lipoprotein (LDL), and glycaemia-associated hormones. The data were quoted as the mean $\pm$ SEM (n = 5–20). ctrl, control; CPF; chlorpyrifos; HF, high-fat diet; SC, standard chow diet; IGF1, insulin-like growth factor-1.

* Significant difference ($p < 0.05$) vs. ctrl-SC offspring.

** Significant difference ($p < 0.01$) vs. ctrl-SC offspring.

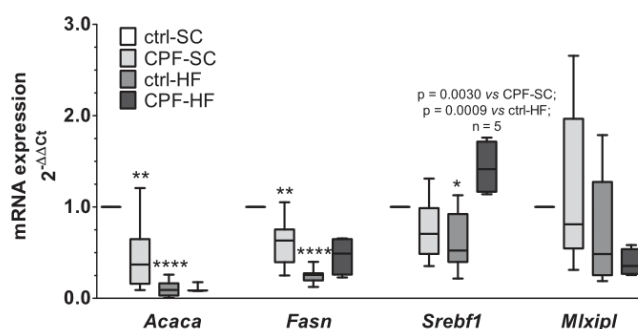


Fig. 3. mRNA expression (RT-PCR) of lipogenesis markers in 8-week-old male offspring of dams exposed to CPF and/or an HF diet.

The mRNA gene expression levels were quantified as the fold induction over the control group (set to 1). Data were expressed as the mean $\pm$ SEM (n = 5–20), using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ calculation method with the *Gapdh* housekeeping gene. *, ** and **** statistically significant difference ($p < 0.05$, $p < 0.01$, and $p < 0.0001$, respectively) vs. ctrl-SC offspring. ctrl, control; CPF; chlorpyrifos; HF, high-fat diet; SC, standard chow diet; *Acaca*, acetyl-CoA carboxylase 1; *Fasn*, fatty acid synthase; *Mlxip1*, carbohydrate response element binding protein; *Srebf1*, sterol regulatory element binding factor 1 variant 2.

increase: 10%; $p = 0.0351$) (Fig. 2).

3.1.2. Perinatal CPF exposure alters regulation of the energy balance

The hepatic and plasma TG levels were higher (by 14% and 20%, respectively) in male offspring of dams from the CPF-SC group, relative to the ctrl-SC offspring. However, these differences were not statistically significant. Perinatal HFD exposure was also associated with a higher hepatic TG content (by 35%, vs. the ctrl-SC offspring: $p = \text{NS}$). There were no significant intergroup differences in the lipid profile (Table 3).

Plasma levels of insulin-like growth factor-1 (IGF1) and leptin were significantly lower in the CPF-SC offspring than in the ctrl-SC offspring (relative decreases: 49.11%, $p = 0.0043$, and 57.80%, $p = 0.0321$, respectively). The insulin level and glycaemia were slightly but not significantly higher (relative increases: 20% and 23%, respectively) in

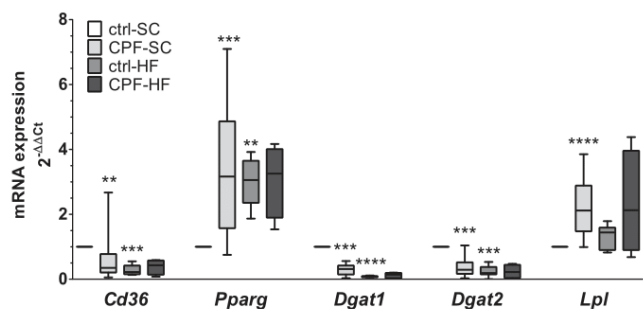


Fig. 4. mRNA expression (RT-PCR) of markers of lipid accumulation in 8-week-old male offspring of dams exposed to CPF and/or an HF diet. The mRNA gene expression levels were quantified as the fold induction, relative to the control group (set to 1). Data were expressed as the mean $\pm$ SEM (n = 5–20), using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ calculation method with the *Gapdh* housekeeping gene. **, *** and **** statistically significant difference ($p < 0.01$, $p < 0.001$ and $p < 0.0001$, respectively) vs. ctrl-SC offspring. ctrl, control; CPF, chlorpyrifos; HF, high-fat diet; SC, standard chow diet; *Cd36*, fatty acid translocase; *Dgat1*, Diacylglycerol O-acyltransferase 1; *Dgat2*, diacylglycerol O-acyltransferase 2; *Lpl*, lipoprotein lipase; *pparg*, peroxisome proliferator-activated receptor gamma.

the CPF-SC offspring than in the ctrl-SC offspring. Perinatal HFD exposure was associated with a slightly but not significantly higher glycaemia value (relative increase vs. ctrl-SC: 16%). However, there were no significant differences between the CPF-HF and ctrl-HF groups with regard to glycaemia or hormone levels (Table 3).

3.2. Perinatal exposure to CPF (but not to an HFD) is associated with significantly lower expression of genes coding for lipid metabolism

Perinatal CPF exposure was associated with significantly lower mRNA expression of acetyl-CoA carboxylase 1 (*Acaca*; relative decrease vs. ctrl-SC: 58%; $p = 0.0019$) and fatty acid synthase (*Fasn*, responsible for the synthesis of malonyl-CoA from acetyl CoA) (relative decrease: 39%; $p = 0.0023$). Exposure to both CPF and an HFD was associated with significantly greater expression of *Srebf1/Srebp1c* (coding for sterol regulatory element binding protein, a central regulator of lipogenesis) than for exposure to CPF alone (relative increase: 230%; $p = 0.0009$ vs. CPF-SC; Fig. 3).

Furthermore, perinatal HFD exposure was associated with significantly greater expression of *Acaca* (relative increase vs. ctrl-SC: 90%; $p < 0.0001$); *Fasn* (relative increase: 75%; $p < 0.0001$) and *Srebf1/Srebp1c* (relative increase: 37%; $p = 0.0340$). Exposure to both CPF and an HFD was associated with significantly lower expression of *Srebf1/Srebp1c* than for exposure to CPF alone (relative decrease vs. CPF-SC: 197%; $p = 0.0030$). However, we did not observe any significant intergroup differences in the expression of *Mlxip1/Chrebp* (carbohydrate response element binding protein, another major transcription factor involved in lipid synthesis) (Fig. 3).

Perinatal CPF exposure was associated with significantly greater mRNA expression of the *Pparg* gene (coding for peroxisome proliferator-activated receptor gamma, a nuclear receptor involved in lipid storage; relative increase in the CPF-SC group vs. ctrl-SC: 238%; $p = 0.0002$) and the lipoprotein lipase (*Lpl*) gene (relative increase: 126%; $p < 0.0001$). This exposure was associated with significantly lower mRNA expression of the fatty acid transporter *Cd36* (relative decrease vs. ctrl-SC: 38%; $p = 0.0015$) and the diacylglycerol O-acyltransferases *Dgat1* and *Dgat2* involved in lipid transport (relative decreases vs. ctrl-SC: 70% and 65%, respectively; $p = 0.0005$ and $p = 0.0002$, respectively).

Perinatal HFD exposure was associated with significantly greater mRNA expression of the nuclear receptor *Pparg* (relative increase vs. ctrl-SC: 238%; $p = 0.0033$). In contrast, this exposure was associated significantly lower mRNA expression of *Cd36* (relative decrease vs. ctrl-

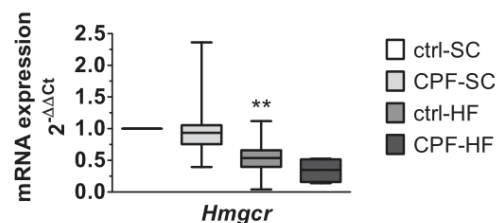


Fig. 5. mRNA expression (RT-PCR) of markers of cholesterol synthesis in 8-week-old male offspring of dams exposed to CPF and/or an HF diet. The mRNA gene expression levels were quantified as the fold induction, relative to the control group (set to 1). Data were expressed as the mean $\pm$ SEM (n = 5–20), using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ calculation method with the *Gapdh* housekeeping gene. ** statistically significant difference ($p < 0.01$) vs. ctrl-SC offspring. ctrl, control; CPF, chlorpyrifos; HF, high-fat diet; SC, standard chow diet; *Hmgcr*, 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A reductase.

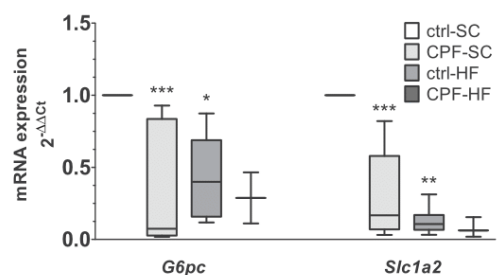


Fig. 6. mRNA expression (RT-PCR) of markers of carbohydrate metabolism in 8-week-old male offspring of dams exposed to CPF and/or an HF diet. The mRNA gene expression levels were quantified as the fold induction, relative to the control group (set to 1). Data were expressed as the mean $\pm$ SEM (n = 5–20), using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ calculation method with the *Gapdh* housekeeping gene. *, ** and *** statistically significant difference ($p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively) vs. ctrl-SCD offspring. CPF, chlorpyrifos; ctrl, control; HF, high-fat diet; SC, standard chow diet; *G6pc*, glucose-6-phosphatase; *Slc1a2*, solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 2.

SC: 73%; $p = 0.0003$), *Dgat1* (relative decrease: 92%; $p < 0.0001$) and *Dgat2* (relative decrease: 76%; $p = 0.0002$) (Fig. 4).

Perinatal exposure to an HF diet was associated with significantly

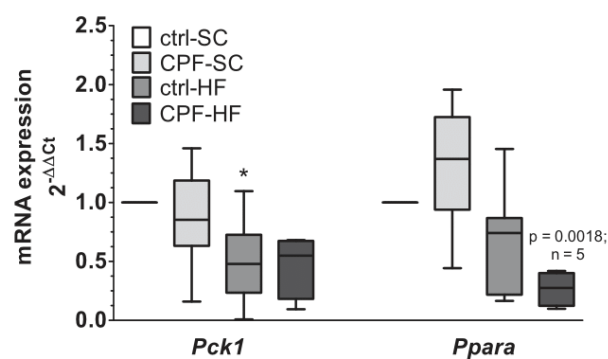


Fig. 7. mRNA expression (RT-PCR) of markers of gluconeogenesis and fatty acid oxidation in 8-week-old male offspring of dams exposed to CPF and/or an HF diet. The mRNA gene expression levels were quantified as the fold induction, relative to the control group (set to 1). Data were expressed as the mean $\pm$ SEM (n = 5–20), using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ calculation method with the *Gapdh* housekeeping gene. * statistically significant difference ($p < 0.05$) vs. ctrl-SCD offspring. ctrl, control; CPF, chlorpyrifos; HF, high-fat diet; SC, standard chow diet; *Pck1*, phosphoenolpyruvate carboxykinase; *Ppara*, peroxisome proliferator activated receptor alpha.

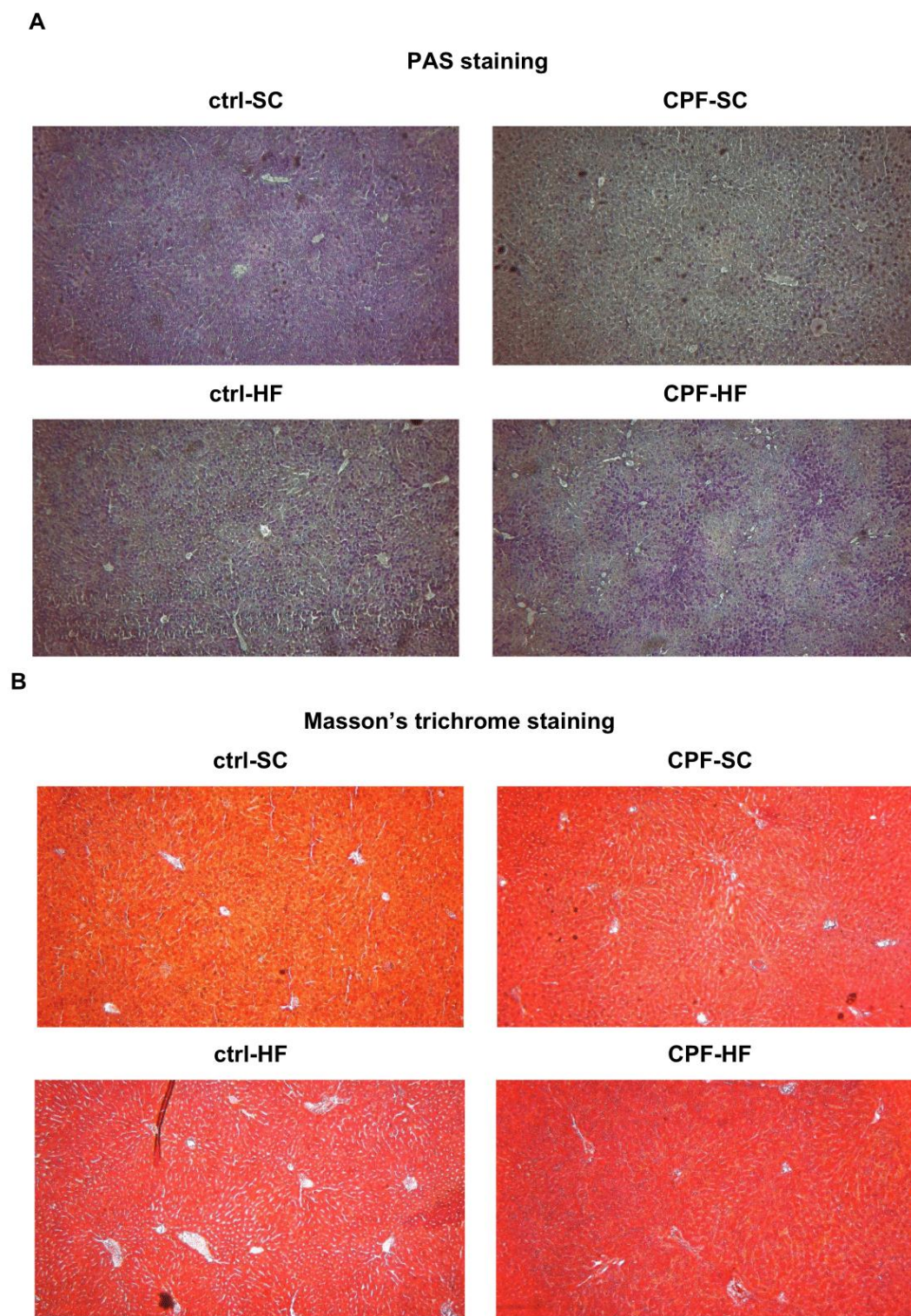


Fig. 8. PAS, Masson's trichrome and Sirius Red staining of liver tissue in the 8-week-old male offspring of mothers exposed to CPF and/or an HF diet. (A) PAS staining (magnification: 100 $\times$), (B) Masson trichrome staining of collagen fibres (100 $\times$), (C) Sirius Red staining of collagen I and III fibres (100 $\times$). Data were expressed as the mean $\pm$ SEM ($n = 5-20$): there were no significant intergroup differences. ctrl, control; CPF; chlorpyrifos; HF, high-fat diet; SC, standard chow diet; PAS; periodic acid Schiff. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

lower mRNA expression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase (*Hmgcr*, a major involved in lipid (cholesterol) synthesis), relative to the ctrl-SC offspring (relative decrease: 39%; $p = 0.0069$) (Fig. 5).

C

Sirius Red staining

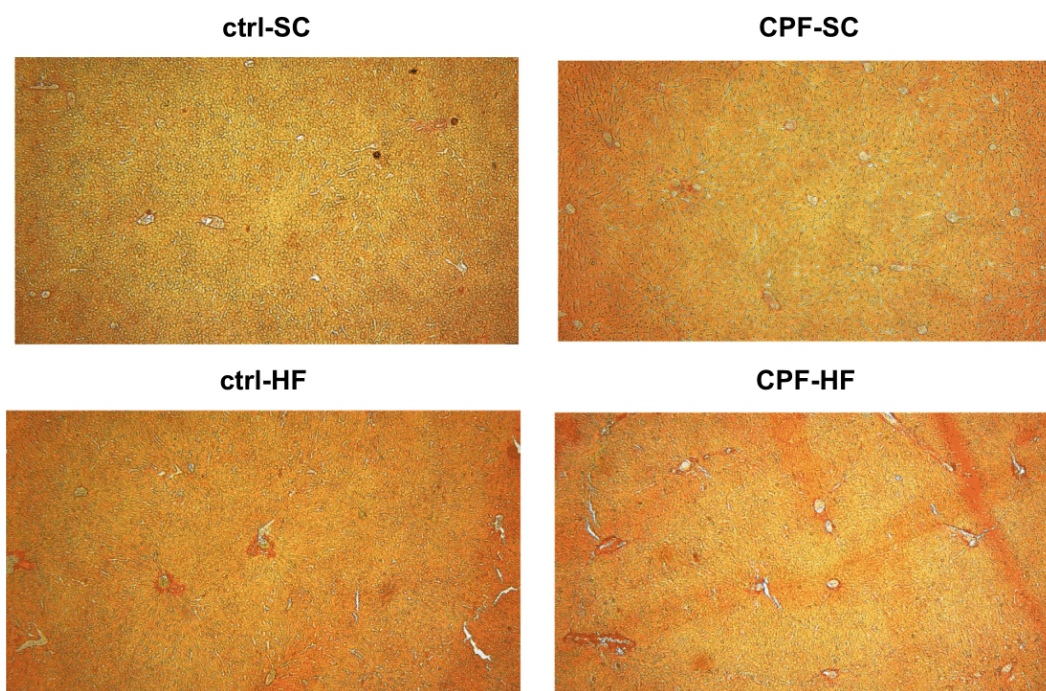


Fig. 8. (continued).

3.3. Perinatal exposure to CPF is associated with significantly lower expression of genes coding for enzymes in glucose metabolism but this influence is not exacerbated by perinatal exposure to HF diet

Perinatal CPF exposure was associated with significantly lower mRNA expression of *G6pc* (coding for glucose-6-phosphatase; relative decrease vs. ctrl-SC: 60%; $p = 0.0002$) and *Slc2a2/Glut2* (coding for a hepatic glucose transporter; relative decrease: 72%; $p = 0.0002$). Perinatal HF diet exposure was associated with significantly lower mRNA expression of *G6pc* (relative decrease vs. ctrl-SC: 58%; $p = 0.0396$) and *Slc2a2/Glut2* (relative decrease: 87%; $p = 0.0014$) (Fig. 6).

Lastly, perinatal HFD exposure was associated with significantly lower mRNA expression of *Pck1/Pepck* (coding for phosphoenolpyruvate carboxykinase; relative decrease vs. ctrl-SC: 50%; $p = 0.0207$). Perinatal exposure to both HFD and CPF was associated with significantly lower mRNA expressed of *Ppara*, relative to CPF exposure alone (relative decrease vs. CPF-SC: 80%; $p = 0.0018$) (Fig. 7).

3.4. Perinatal exposure to an HF diet and/or CPF was not associated with changes in liver tissue structure

3.4.1. Perinatal exposure to CPF and/or an HF diet was not associated with histopathological changes in the offspring's liver

In all histopathological analyses, the offspring's liver tissues sections had a normal structure and composition (a central vein, and well-organized hepatocytes) (Fig. 8A). Indeed, no histopathological changes (portal area hypertrophy, dilatation of bile duct or the branch of the hepatic artery, mononuclear cell infiltration, vacuolization, etc.) were observed in liver sections in any of the groups studied. PAS staining of liver sections showed that exposure of CPF and/or HFD was not associated with steatosis or inflammation (Fig. 8A): the liver's tissue architecture (e.g. percentage of steatosis) was not modified, relative to ctrl-SCD offspring (data not shown). However, the hepatocyte surface area was significantly lower (by 17%; $p = 0.0145$) in the CPF-SCD

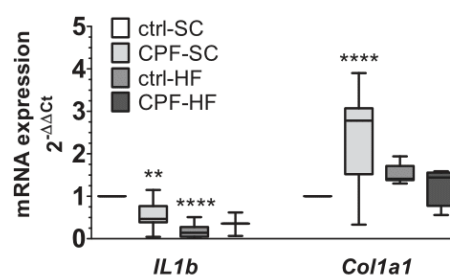


Fig. 9. mRNA expression (RT-PCR) of markers of inflammation and fibrosis in 8-week-old male offspring of dams exposed to CPF and/or an HF diet. The mRNA gene expression levels correspond to the fold-induction over the control group (set to 1). Data were expressed as the mean $\pm$ SEM ($n = 5-20$), using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ calculation method with the *Gapdh* housekeeping gene. **, **** statistically significant difference ($p < 0.01$ and $p < 0.0001$, respectively) vs. ctrl-SC offspring. ctrl, control; CPF, chlorpyrifos; HF, high-fat diet; SC, standard chow diet; *Col1a1*; collagen alpha-1; *IL1b*; interleukin 1 beta.

offspring than in the ctrl-SCD offspring. No collagen fibres could be seen between the hepatocytes – suggesting that the amount of collagen was below the staining methods' limits of detection. Therefore, we did not observe any characteristic features of hepatic fibrosis (Fig. 8B and C).

3.4.2. Perinatal CPF exposure might be associated with subsequent fibrosis

Perinatal exposure of dams to CPF was associated with significantly lower mRNA expression of the *IL1b* gene (an inducer of the inflammatory response) (relative decrease vs. ctrl-SC: 46%; $p = 0.0071$) and significantly greater mRNA expression of *Col1a1* (coding for one of the two main collagen fibres; relative increase vs. ctrl-SC: 160%; $p < 0.0001$) (Fig. 9). Maternal exposure to an HFD was associated with significantly lower *IL1b* gene expression (relative decrease vs. ctrl-SC:

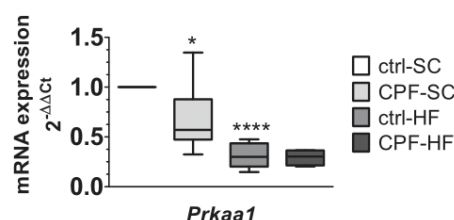


Fig. 10. mRNA expression (RT-PCR) of markers of energy metabolism in 8-week-old male offspring of dams exposed to CPF and/or an HF diet. The mRNA gene expression levels were quantified as the fold induction, relative to the control group (set to 1). Data were expressed as the mean $\pm$ SEM ($n = 5-20$), using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ calculation method with the *Gapdh* housekeeping gene. *, **** statistically significant difference ($p < 0.05$ and $p < 0.0001$, respectively) vs. ctrl-SCD offspring. ctrl, control; CPF; chlorpyrifos; HF, high-fat diet; SC, standard chow diet; *Prkaa1*; AMP-activated protein kinase catalytic subunit alpha.

Table 4

Plasma levels of markers of hepatic metabolic activity in 8-week-old male offspring of dams exposed to CPF and/or an HF diet.

	ctrl-SC	CPF-SC	ctrl-HF	CPF-HF
ALP (UI/L)	94.4 $\pm$ 21.2	159.1 $\pm$ 7.0*	126.1 $\pm$ 7.8	147.6 $\pm$ 22.1
ALAT (UI/L)	41.12 $\pm$ 9.7	71.79 $\pm$ 8.4	77.96 $\pm$ 10.7	67.52 $\pm$ 4.9
ASAT (UI/L)	116.3 $\pm$ 32.1	207.5 $\pm$ 35.1	243.0 $\pm$ 59.7	251.8 $\pm$ 72.0
ASAT/ALAT (UI/L)	2.51 $\pm$ 0.3	2.74 $\pm$ 0.2	2.84 $\pm$ 0.29	3.62 $\pm$ 0.9
LDH (UI/L)	539.9 $\pm$ 256.1	673.8 $\pm$ 103.6	585.8 $\pm$ 124.5	1145 $\pm$ 343.4

The data were expressed as the mean $\pm$ SEM ($n = 5-20$). ctrl, control; CPF; chlorpyrifos; HF, high-fat diet; SC, standard chow diet; ALP; Alkaline phosphatase, ALAT; alanine aminotransferase, ASAT; aspartate aminotransferase, ASAT/ALAT; aspartate aminotransferase/alanine aminotransferase and LDH; lactate dehydrogenase.

* Statistically significant difference ($p < 0.05$) vs. ctrl-SCD offspring.

82%; $p < 0.0001$) (Fig. 9).

The mRNA expression of *Prkaa1/Ampka* (coding for a sensor of the cell's energy homeostasis) was significantly lower (by 33%) in the CPF-SC offspring than in the ctrl-SC offspring ($p = 0.0448$). Perinatal HFD exposure was associated with significantly lower mRNA expression of *Prkaa1/Ampka* (relative decrease vs. ctrl-SC: 69%) (Fig. 10).

3.4.3. Perinatal CPF exposure is associated with an elevation of liver damage markers

The plasma levels of liver enzymes tended to be higher in the offspring of mothers treated with CPF. This difference was significant (relative increase vs. ctrl-SC: 68%; $p = 0.0347$) for ALP - one of the most sensitive markers of liver damage (Table 4).

4. Discussion

Perinatal exposure to OPs might be associated with abnormalities in body weight gain and with changes in the expression of certain genes involved in the regulation of glucose and lipid homeostasis in adulthood. Here, we studied the consequences of maternal metabolic disorders and pesticide exposure during critical windows of development on the offspring's metabolism and liver tissue architecture.

We exposed the dams to a 1 mg/kg/d dose of CPF which is the oral No Observable Adverse Effect Level in the rat for this pesticide. According to the literature, this dose can depress acetylcholinesterase activity (Cochran et al., 1995). To ensure that all the animals were exposed to the same amount of CPF and to mimic natural exposure in humans (residues on fruits and vegetables), the animals were gavaged.

When performed by an experienced handler, gavaging does not generate stress or behavioural or metabolic changes in the dam or the offspring (McDonnell-Dowling et al., 2017). In the HF diet used in the present experiments, 60% of the energy content came from fat; the literature data show that this type of diet induces metabolic alterations in the offspring in adulthood (at 7 months of age) (Lecoutre et al., 2016).

We found that chronic, repeated exposure of dams to CPF was associated with developmental impairments in the male offspring, as characterized by a lower birth weight and lower plasma levels of growth factors (such as IGF1) and leptin. As leptin is produced mainly in adipose tissue, a low level of this hormone decrease might be linked to low body fat deposition or dysregulated leptin secretion in the male pups. Furthermore, CPF exposure in the dams appeared to induce intrauterine growth restriction, since we observed a significant relative reduction in birthweight. This might be due to CPF's toxic effect on placental nutrition of the foetus, as suggested by studies of rats exposed orally to CPF during the pre- and postnatal periods (Akhtar et al., 2006; Joly Condette et al., 2015, 2014; Mattsson et al., 2000; Maurissen et al., 2000). Moreover, the CPF exposure in our experiments continued after birth via lactation. It has been reported that CPF concentrates in the mother's milk and that pups are exposed to measurable amounts of CPF during lactation (Mattsson et al., 2000). These impairments appeared to have disappeared by adulthood (PND54), when the offspring were no longer exposed to CPF. In contrast, perinatal exposure to an HFD was associated with greater body weight at weaning and in early adulthood, although the differences vs. control animals were not statistically significant. Our results are in line with those of some other studies (Ribaroff et al., 2017; Tellechea et al., 2017). Even though we did not observe a cumulative effect of perinatal HF diet and CPF exposures, we did find that the HF diet was associated with a significantly greater body weight from birth into young adulthood in pups exposed to CPF - as described previously by other researchers (Cortés-Álvarez et al., 2020). Indeed, the nutritional composition of breast milk is related to maternal obesity and diet during pregnancy and lactation. Ingestion of an HF diet increases the lipid concentration in the mother's milk (Purcell et al., 2011) and modulates the metabolic defects associated with early-life exposure to various OPs. For example, neonatal exposure to parathion and an HF diet was associated with a greater incidence of obesity, diabetes, liver problems and metabolism perturbations in the rat (Adigun et al., 2010; Lassiter and Brimijoin, 2008). In our experiments, maternal CPF exposure was associated with statistically higher plasma levels of insulin and glucose and a clear trend of higher TG. These results were linked to previous studies (Slotkin, 2011; Slotkin et al., 2005a). Unexpectedly, we found that dams in the CPF-HF group were less fertile than the other dams. A recent review reported that an HF diet impairs female reproductive function by altering the hypothalamic-pituitary-ovarian axis (Hohos and Skaznik-Wikiel, 2017), and a late study revealed that CPF also induces reproductive problems (changes in sperm, serum hormone levels, oxidative stress in the testis, and the activity of enzymes related to spermatogenesis) in the rat (Li et al., 2019). Since all the animals in the present study were raised in the same environment, the observed difference can only be explained by the cumulative effect of the two harmful factors studied here. To clarify this point, the cumulative impacts of CPF and an HFD on reproductive functions (with a focus on putative follicular atresia in the dams' ovaries) shall be investigated further.

The low weight gain described above was correlated with alterations in lipid and glucose metabolism. Perinatal exposure to CPF or an HF diet was associated with lower expression of key genes in lipogenesis, such as *Acaca* (coding for an enzyme that produces malonyl-CoA for fatty acid synthesis) and *Fasn* (coding for an enzyme that catalyses the last step in fatty acid biosynthesis). In contrast, expression of *Srebp1/Srebp1c* (coding for the main transcription factor for *Acaca* and *Fasn*) was only affected by HF diet exposure. Perinatal exposure to CPF or an HF diet also led to a relative decrease in the expression of lipid accumulation markers such as *Cd36*, *Dgat 1*, and *Dgat2*; the latter two enzymes catalyse

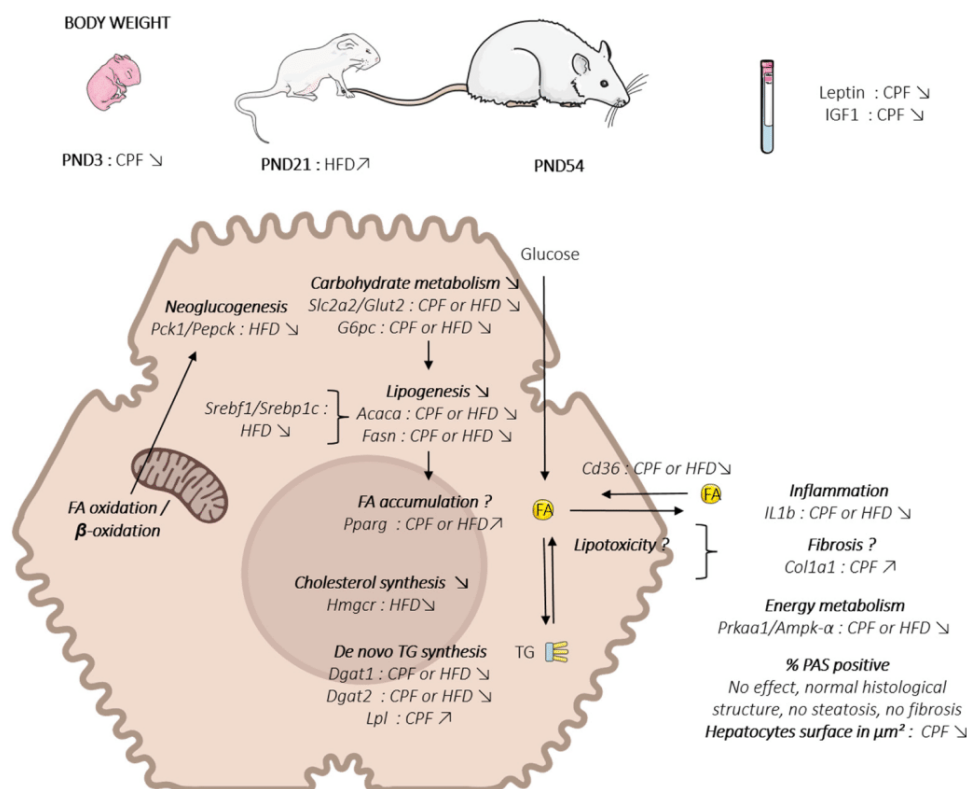


Fig. 11. Hypothetical changes in the liver during the development of the male offspring of dams exposed to CPF alone and/or combined with an HFD. CPF; chlorpyrifos; HFD, high-fat diet; *Acaca*, acetyl-CoA carboxylase 1; *Cd36*; fatty acid translocase; *Col1a1*; collagen alpha-1; *Dgat1*; Diacylglycerol O-acyltransferase 1; *Dgat2*; Diacylglycerol O-acyltransferase 2; FA, fatty acids; *Fasn*, fatty acid synthase; *G6pc*, glucose-6-phosphatase; *Hmgcr*; 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A reductase; *IL1b*; interleukin 1 beta; *Lpl*; lipoprotein lipase; *Pck1*, phosphoenolpyruvate carboxykinase; *Ppara*, peroxisome proliferator activated receptor alpha; *Pparg*, peroxisome proliferator activated receptor gamma; *Prkaa1*; AMP-activated protein kinase catalytic subunit alpha; *Slc2a2*, solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 2; *Srebf1*, sterol regulatory element binding factor 1 variant 2.

the final step in TG synthesis. Although this decrease might conceivably lead to a lower TG content in the liver, we actually observed a slight increase. We hypothesize that fewer fatty acids were synthesized from acetyl CoA and so fewer TGs were stored in the liver. This difference was associated with greater expression of *Lpl* following perinatal CPF exposure. Moreover, perinatal exposures to CPF alone or an HF diet alone were both associated with greater mRNA expression of *Pparg* (a nuclear receptor and transcription factor involved in lipid storage) in the male pups. Likewise, perinatal HF diet exposure was also associated with lower mRNA expression of *Hmgcr* - the main gene related to lipid (cholesterol) synthesis - in these animals. The lower level of hepatic lipid storage in the offspring exposed to CPF and HFD was probably due to an overall reduction in lipid metabolism, as suggested by the lower gene expression of key factors. However, it remains to be seen whether protein expression and function are modified. The mechanism(s) underlying differences in gene expression will also have to be characterized. A change in protein levels would indicate dysregulation of the main hepatic lipogenic pathways and thus an impairment in hepatic metabolism. In line with the literature data, concomitant perinatal co-exposure of the dams to both CPF and HFD tended to have the same consequences as each factor separately; although synergistic effects were not observed (Adigun et al., 2010).

Maternal CPF exposure was associated with greater mRNA expression of *Ppara* in the pups' liver, whereas maternal HF diet exposure was associated with lower expression of the gene in its offspring. *Ppara* is involved in the inflammatory response and in fatty acid oxidation. *Ppara* targeted genes control the release of fatty acids from TG-rich lipoproteins, chylomicrons, and VLDL. In our study, the lower plasma TG level reflected lower hepatic synthesis and greater catabolism in the plasma; this may have been related to regulation of the *Lpl* gene. This hypothesis was confirmed by the significantly greater mRNA expression of *Lpl* and *Ppara* genes and the elevation (albeit non-significant) in the plasma TG level in the offspring of CPF-exposed dams. Perinatal CPF and HF diet exposure was also associated with differences in glucose metabolism.

We noted lower expression of *Slc2a2/Glut2* (a glucose transporter) and *G6pc* (a major regulatory enzyme in gluconeogenesis and which catalyses the hydrolysis of glucose-6-phosphate to D-glucose). A lower level of gluconeogenesis might be related to the elevation (albeit non-significant) in glycaemia after perinatal exposure of dams to CPF or an HF diet. Moreover, insulin inhibits the transcription of *Pck1/Pepck* gene, which is involved in gluconeogenesis and the transformation of oxaloacetate into phosphoenolpyruvate. Perinatal HFD exposure was associated with lower *Pck1/Pepck* gene expression in the offspring. We hypothesize that lower glucose uptake by liver cells resulted in an elevation of glycaemia and a relative decrease in lipid synthesis in general and TG synthesis in particular.

We also looked at potential tissue changes and inflammation in the liver. The plasma levels of liver enzymes went higher after perinatal CPF exposure (relative to controls), with a relative reduction in hepatocyte size (in agreement with the literature (Mansour and Mossa, 2010)); these differences were suggestive of damage to the hepatocyte membrane. The relative increase associated with CPF exposure was statistically significant for ALP - the most sensitive marker of liver damage. No histological alterations in young adult rats were noted in any of the experimental groups. Maternal exposure to CPF was also associated with greater expression of the *Col1a1* gene (coding for one of the two main components of collagen fibres); this might predict the subsequent development of fibrosis. In contrast, maternal exposure to an HF diet was not associated with any differences in markers of liver damage in the offspring, except a slight but nonsignificant elevation of plasma levels of liver enzymes. Nevertheless, concomitant maternal exposure to both an HF diet and CPF was associated with lower mRNA expression of *Prkaa1/Ampka*, a sensor of the cell's energy homeostasis. This enzyme switches on fatty acid oxidation and glycolysis and switches off lipogenesis via short-term effects on regulatory protein phosphorylation and long-term effects on gene expression (Foretz et al., 2006). We expected to observe greater expression of this gene in the offspring of dams exposed to both an HF diet and CPF; this would have explained the lower

level of lipogenesis. The observed impacts might only be predictive of more severe impairments later in life; the age of 8 weeks was a probably too early to observe such metabolic effects. Even though the exact fat content of an HF diet is not correlated with any outcomes in offspring, other factors (such as the species, the effects of the interventional diet on the mother, the intervention time point, and the micronutrient and macronutrient content of the control diet) might account for the differences in outcomes between studies in which HF diets were used to induce obesity (Ribaroff et al., 2017).

The primary objective of the present study was to assess the potential impact of a harmful maternal environment (an obesogenic diet and/or exposure to the pesticide CPF) in the offspring. Even in the absence of direct contact between the offspring and the harmful factors (except through lactation), we found that exposure had an impact on metabolic activity in the liver. Indirect exposure to CPF was associated with alterations in the mRNA expression of several liver enzymes, which in turn might have reduced neoglucogenesis and de novo lipogenesis. Exposure to an HF diet alone during the perinatal period induced the same type of effect as CPF alone - showing that long-term metabolic disorders can occur in the absence of inflammatory signs (Fig. 11).

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.cdev.2021.203678>.

CRedit authorship contribution statement

Marion Guibourdenche: Data curation, Investigation, Formal analysis, Visualization, Methodology, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Hiba El Khayat El Sabbouri:** Investigation, Methodology. **Fideline Bonnet:** Investigation, Writing – review & editing. **Narimane Djekkoun:** Investigation, Methodology. **Hafida Khorsi-Cauet:** Methodology, Supervision. **Aurélien Corona:** Investigation. **Jean Guibourdenche:** Writing – review & editing. **Véronique Bach:** Supervision. **Pauline M. Anton:** Validation, Supervision, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Jérôme Gay-Quéhailard:** Conceptualization, Visualization, Funding acquisition, Methodology, Project administration, Supervision, Validation, Writing – original draft, Writing – review & editing.

Acknowledgement

The authors thank J. Le Ber and her staff in the animal facility for their help monitoring animals and Dr. D. Fraser (Biotech Communication SARL, Ploudalmézeau, France), for his extensive English editing.

Funding

This work was funded by the University of Picardie Jules Verne, the Hauts-de-France Regional Council, and the Hospital-University Federative Project “1000 Days for Health” (PROGHOMEO grant – 2017).

References

Adigun, A.A., Wrench, N., Levin, E.D., Seidler, F.J., Slotkin, T.A., 2010. Neonatal parathion exposure and interactions with a high-fat diet in adulthood: adenylyl cyclase-mediated cell signaling in heart, liver and cerebellum. *Brain Res. Bull.* 81, 605–612. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2010.01.003>.

Ahmed, M.M., Samir, E.-S.A., El-Shehawi, A.M., Alkafafy, M.E., 2015. Anti-obesity effects of Taif and Egyptian pomegranates: molecular study. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 79, 598–609. <https://doi.org/10.1080/09168451.2014.982505>.

Akhtar, N., Srivastava, M.K., Raizada, R.B., 2006. Transplacental disposition and teratogenic effects of chlorpyrifos in rats. *J. Toxicol. Sci.* 31, 521–527. <https://doi.org/10.2131/jts.31.521>.

Almeida-Suhett, C.P., Scott, J.M., Graham, A., Chen, Y., Deuster, P.A., 2019. Control diet in a high-fat diet study in mice: regular chow and purified low-fat diet have similar effects on phenotypic, metabolic, and behavioral outcomes. *Nutr. Neurosci.* 22, 19–28. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2017.1349359>.

Andersen, C.L., Jensen, J.L., Ørntoft, T.F., 2004. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data

sets. *Cancer Res.* 64, 5245–5250. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0496>.

Barker, D.J.P., 2003. The developmental origins of adult disease. *Eur. J. Epidemiol.* 18, 733–736. <https://doi.org/10.1023/a:1025388901248>.

Cantoral, A., Montoya, A., Luna-Villa, L., Roldán-Valadez, E.A., Hernández-Ávila, M., Kershennobich, D., Perng, W., Peterson, K.E., Hu, H., Rivera, J.A., Téllez-Rojo, M.M., 2020. Overweight and obesity status from the prenatal period to adolescence and its association with non-alcoholic fatty liver disease in young adults: cohort study. *BJOG Int. J. Obstet. Gynaecol.* <https://doi.org/10.1111/1471-0528.16199> n/a.

Chen, T., Yao, L., Ke, D., Cao, W., Zuo, G., Zhou, L., Jiang, J., Yamahara, J., Li, Y., Wang, J., 2016. Treatment with *Rhodiola crenulata* root extract ameliorates insulin resistance in fructose-fed rats by modulating sarcolemmal and intracellular fatty acid translocase/CD36 redistribution in skeletal muscle. *BMC Complement. Altern. Med.* 16 <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1176-z>.

Cochran, R.C., Kishiyama, J., Aldous, C., Carr, W.C., Pfeifer, K.F., 1995. Chlorpyrifos: hazard assessment based on a review of the effects of short-term and long-term exposure in animals and humans. *Food Chem. Toxicol.* 33, 165–172. [https://doi.org/10.1016/0278-6915\(94\)00124-7](https://doi.org/10.1016/0278-6915(94)00124-7).

Cortés-Álvarez, N.Y., Vuelvas-Olmos, C.R., Pinto-González, M.F., Guzmán-Muñoz, J., González-Pérez, O., Moy-López, N.A., 2020. A high-fat diet during pregnancy impairs memory acquisition and increases leptin receptor expression in the hippocampus of rat offspring. *Nutr. Neurosci.* 1–13. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2020.1728473>.

Czajka, M., Matysiak-Kucharek, M., Jodłowska-Jędrzych, B., Sawicki, K., Fal, B., Drop, B., Kruszewski, M., Kapka-Skrzypczak, L., 2019. Organophosphorus pesticides can influence the development of obesity and type 2 diabetes with concomitant metabolic changes. *Environ. Res.* 178, 108685 <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108685>.

El Khayat El Sabbouri, H., Gay-Quéhailard, J., Joumaa, W.H., Delanaud, S., Guibourdenche, M., Darwiche, W., Djekkoun, N., Bach, V., Ramadan, W., 2020. Does the perigestational exposure to chlorpyrifos and/or high-fat diet affect respiratory parameters and diaphragmatic muscle contractility in young rats? *Food Chem. Toxicol.* 140, 111322 <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111322>.

Elsharkawy, E.E., Yahia, D., El-Nisr, N.A., 2013. Sub-chronic exposure to chlorpyrifos induces hematological, metabolic disorders and oxidative stress in rat: attenuation by glutathione. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 35, 218–227. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2012.12.009>.

Fish, S.A., 1966. Organophosphorus cholinesterase inhibitors and fetal development. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 96, 1148–1154. [https://doi.org/10.1016/0002-9378\(66\)90526-6](https://doi.org/10.1016/0002-9378(66)90526-6).

Foretz, M., Taleux, N., Guigas, B., Horman, S., Beauloye, C., Andreelli, F., Bertrand, L., Viollet, B., 2006. Régulation du métabolisme énergétique par l'AMPK - Une nouvelle voie thérapeutique pour le traitement des maladies métaboliques et cardiaques. *Med. Sci. (Paris)* 22, 381–388. <https://doi.org/10.1051/medsci/2006224381>.

Hermier, D., Mathé, V., Lan, A., Santini, C., Quignard-Boulangé, A., Huneau, J.-F., Mariotti, F., 2017. Postprandial low-grade inflammation does not specifically require TLR4 activation in the rat. *Nutr. Metab. (Lond.)* 14, 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12986-017-0220-4>.

Hohos, N.M., Skaznik-Wikiel, M.E., 2017. High-fat diet and female fertility. *Endocrinology* 158, 2407–2419. <https://doi.org/10.1210/en.2017-00371>.

Hunter, D.L., Lassiter, T.L., Padilla, S., 1999. Gestational exposure to chlorpyrifos: comparative distribution of trichloropyridinol in the fetus and dam. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 158, 16–23. <https://doi.org/10.1006/taap.1999.8689>.

Joly Condette, C., Khorsi-Cauet, H., Morlière, P., Zabjajk, L., Reygnier, J., Bach, V., Gay-Quéhailard, J., 2014. Increased gut permeability and bacterial translocation after chronic chlorpyrifos exposure in rats. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102217>.

Joly Condette, C., Bach, V., Mayeur, C., Gay-Quéhailard, J., Khorsi-Cauet, H., 2015. Chlorpyrifos exposure during perinatal period affects intestinal microbiota associated with delay of maturation of digestive tract in rats. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 61, 30–40. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000000734>.

Kamai, E.M., McElrath, T.F., Ferguson, K.K., 2019. Fetal growth in environmental epidemiology: mechanisms, limitations, and a review of associations with biomarkers of non-persistent chemical exposures during pregnancy. *Environ. Health* 18. <https://doi.org/10.1186/s12940-019-0480-8>.

Kondakala, S., Lee, J.H., Ross, M.K., Howell, G.E., 2017. Effects of acute exposure to chlorpyrifos on cholinergic and non-cholinergic targets in normal and high-fat fed male C57BL/6J mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 337, 67–75. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2017.10.019>.

Laporte, B., Gay-Quéhailard, J., Bach, V., Villégier, A.-S., 2018. Developmental neurotoxicity in the progeny after maternal gavage with chlorpyrifos. *Food Chem. Toxicol.* 113, 66–72. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.01.026>.

Lassiter, T.L., Brimijoin, S., 2008. Rats gain excess weight after developmental exposure to the organophosphorothionate pesticide, chlorpyrifos. *Neurotoxicol. Teratol.* 30, 125–130. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2007.10.004>.

Lecoutre, S., Deracinois, B., Laborie, C., Eberlé, D., Guineé, C., Panchenko, P.E., Lesage, J., Vieau, D., Junien, C., Gabory, A., Breton, C., 2016. Depot- and sex-specific effects of maternal obesity in offspring's adipose tissue. *J. Endocrinol.* 230, 39–53. <https://doi.org/10.1530/JOE-16-0037>.

Li, T.-T., Liu, Y.-Y., Wan, X.-Z., Huang, Z.-R., Liu, B., Zhao, C., 2018. Regulatory efficacy of the polyunsaturated fatty acids from microalgae *Spirulina platensis* on lipid metabolism and gut microbiota in high-fat diet rats. *Int. J. Mol. Sci.* 19 <https://doi.org/10.3390/ijms19103075>.

Li, J., Pang, G., Ren, F., Fang, B., 2019. Chlorpyrifos-induced reproductive toxicity in rats could be partly relieved under high-fat diet. *Chemosphere* 229, 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.05.020>.

- Long, C., Xiao, Y., Li, S., Tang, X., Yuan, Z., Bai, Y., 2019. Identification of optimal endogenous reference RNAs for RT-qPCR normalization in hindgut of rat models with anorectal malformations. *PeerJ* 7. <https://doi.org/10.7717/peerj.6829>.
- Mansour, S., Mossa, A., 2010. Adverse effects of lactational exposure to chlorpyrifos in suckling rats. *Hum. Exp. Toxicol.* 29, 77–92. <https://doi.org/10.1177/0960327109357276>.
- Mattsson, J.L., Maurissen, J.P.J., Nolan, R.J., Brzak, K.A., 2000. Lack of differential sensitivity to cholinesterase inhibition in fetuses and neonates compared to dams treated perinatally with chlorpyrifos. *Toxicol. Sci.* 53, 438–446. <https://doi.org/10.1093/toxsci/53.2.438>.
- Maurissen, J.P., Hoberman, A.M., Garman, R.H., Hanley, T.R., 2000. Lack of selective developmental neurotoxicity in rat pups from dams treated by gavage with chlorpyrifos. *Toxicol. Sci.* 57, 250–263. <https://doi.org/10.1093/toxsci/57.2.250>.
- McDonnell-Dowling, K., Kleefeld, S., Kelly, J.P., 2017. Consequences of oral gavage during gestation and lactation on rat dams and the neurodevelopment and behavior of their offspring. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 56, 79–83.
- Melgar-Rojas, P., Alvarado, J.C., Fuentes-Santamaría, V., Gabaldón-Ull, M.C., Juiz, J.M., 2015. Validation of reference genes for RT-qPCR analysis in noise-induced hearing loss: a study in Wistar rat. *PLoS One* 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138027>.
- Mukherjee, R., Locke, K.T., Miao, B., Meyers, D., Monshizadegan, H., Zhang, R., Search, D., Grimm, D., Flynn, M., O'Malley, K.M., Zhang, L., Li, J., Shi, Y., Kennedy, L.J., Blanner, M., Cheng, P.T., Tino, J., Srivastava, R.A., 2008. Novel peroxisome proliferator-activated receptor α agonists lower low-density lipoprotein and triglycerides, raise high-density lipoprotein, and synergistically increase cholesterol excretion with a liver X receptor agonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 327, 716–726. <https://doi.org/10.1124/jpet.108.143271>.
- Ndonwi, E.N., Atogho-Tiedeu, B., Lontchi-Yimagou, E., Shinkafi, T.S., Nanfa, D., Balti, E. V., Indusmita, R., Mahmood, A., Katte, J.-C., Mbanya, A., Matsha, T., Mbanya, J.C., Shakir, A., Sobngwi, E., 2019. Gestational exposure to pesticides induces oxidative stress and lipid peroxidation in offspring that persist at adult age in an animal model. *Toxicol. Res.* 35, 241–248. <https://doi.org/10.5487/TR.2019.35.3.241>.
- Pfaffl, M.W., Tichopad, A., Prgomet, C., Neuvians, T.P., 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol. Lett.* 26, 509–515. <https://doi.org/10.1023/B:BILE.0000019559.84305.47>.
- Purcell, R.H., Sun, B., Pass, L.L., Power, M.L., Moran, T.H., Tamashiro, K.L.K., 2011. Maternal stress and high-fat diet effect on maternal behavior, milk composition, and pup ingestive behavior. *Physiol. Behav.* 104, 474–479. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.05.012>.
- Ribaroff, G.A., Wastnedge, E., Drake, A.J., Sharpe, R.M., Chambers, T.J.G., 2017. Animal models of maternal high fat diet exposure and effects on metabolism in offspring: a meta-regression analysis: maternal HFD and offspring metabolism. *Obes. Rev.* 18, 673–686. <https://doi.org/10.1111/obr.12524>.
- Sarron, E., Pérot, M., Barbezier, N., Delayre-Orthez, C., Gay-Quéheillard, J., Anton, P.M., 2020. Early exposure to food contaminants reshapes maturation of the human brain-gut-microbiota axis. *World J. Gastroenterol.* 26, 3145–3169. <https://doi.org/10.3748/wjg.v26.i23.3145>.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W., 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* 9, 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>.
- Seo, E., Park, E.-J., Park, M.-K., Kim, D.K., Lee, H.-J., Hong, S.-H., 2010. Differential expression of metabolism-related genes in liver of diabetic obese rats. *Kor. J. Physiol. Pharmacol.* 14, 99–103. <https://doi.org/10.4196/kjpp.2010.14.2.99>.
- Shih, H.-C., Lee, C.-H., Wei, Y.-H., 2005. Differential gene expression after hemorrhagic shock in rat lung. *J. Chin. Med. Assoc.* 68, 468–473. [https://doi.org/10.1016/S1726-4901\(09\)70076-0](https://doi.org/10.1016/S1726-4901(09)70076-0).
- Silver, N., Best, S., Jiang, J., Thein, S.L., 2006. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC Mol. Biol.* 7, 33. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-7-33>.
- Sloop, K.W., Cao, J.X.-C., Siesky, A.M., Zhang, H.Y., Bodenmiller, D.M., Cox, A.L., Jacobs, S.J., Moyers, J.S., Owens, R.A., Showalter, A.D., Brenner, M.B., Raap, A., Gromada, J., Berridge, B.R., Monteith, D.K.B., Porksen, N., McKay, R.A., Monia, B.P., Bhanot, S., Watts, L.M., Michael, M.D., 2004. Hepatic and glucagon-like peptide-1-mediated reversal of diabetes by glucagon receptor antisense oligonucleotide inhibitors. *J. Clin. Invest.* 113, 1571–1581. <https://doi.org/10.1172/JCI20911>.
- Slotkin, T.A., 1999. Developmental cholinotoxicants: nicotine and chlorpyrifos. *Environ. Health Perspect.* 107, 71–80.
- Slotkin, T.A., 2004. Cholinergic systems in brain development and disruption by neurotoxins: nicotine, environmental tobacco smoke, organophosphates. *Toxicol. Appl. Pharmacol. Spec. Pediatr.* 198, 132–151. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2003.06.001>.
- Slotkin, T.A., 2011. Does early-life exposure to organophosphate insecticides lead to prediabetes and obesity? *Reprod. Toxicol.* 31, 297–301. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2010.07.012>.
- Slotkin, T.A., Brown, K.K., Seidler, F.J., 2005a. Developmental exposure of rats to chlorpyrifos elicits sex-selective hyperlipidemia and hyperinsulinemia in adulthood. *Environ. Health Perspect.* 113, 1291–1294. <https://doi.org/10.1289/ehp.8133>.
- Slotkin, T.A., Oliver, C.A., Seidler, F.J., 2005b. Critical periods for the role of oxidative stress in the developmental neurotoxicity of chlorpyrifos and terbutaline, alone or in combination. *Dev. Brain Res.* 157, 172–180. <https://doi.org/10.1016/j.devbrainres.2005.04.001>.
- Srinivasan, M., Katewa, S.D., Palaniyappan, A., Pandya, J.D., Patel, M.S., 2006. Maternal high-fat diet consumption results in fetal malprogramming predisposing to the onset of metabolic syndrome-like phenotype in adulthood. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 291, E792–E799. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00078.2006>.
- Stepien, M., Gaudichon, C., Fromentin, G., Even, P., Tomé, D., Azzout-Marniche, D.D., 2011. Increasing protein at the expense of carbohydrate in the diet down-regulates glucose utilization as glucose sparing effect in rats. *PLoS One* 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014664> np.
- Tellechea, M.L., Menesque, M.F., Pirola, C.J., 2017. The association between high fat diet around gestation and metabolic syndrome-related phenotypes in rats: a systematic review and meta-analysis. *Sci. Rep.* 7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05344-7>.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F., 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3, research0034. <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-research0034>.
- Vida, M., Rivera, P., Gavito, A.L., Suárez, J., Pavón, F.J., Arrabal, S., Romero-Cuevas, M., Bautista, D., Martínez, A., de Fonseca, F.R., Serrano, A., Baixeras, E., 2014. CB1 blockade potentiates down-regulation of lipogenic gene expression in perirenal adipose tissue in high carbohydrate diet-induced obesity. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090016>.
- Whitaker, R.C., Wright, J.A., Pepe, M.S., Seidel, K.D., Dietz, W.H., 2009. Predicting Obesity in Young Adulthood From Childhood and Parental Obesity. <https://doi.org/10.1056/NEJM199709253371301>.
- Xie, F., Xiao, P., Chen, D., Xu, L., Zhang, B., 2012. miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant Mol. Biol.* 80, 75–84. <https://doi.org/10.1007/s11103-012-9885-2>.
- Zhang, Q., Xiao, X., Zheng, J., Li, M., Yu, M., Ping, F., Wang, T., Wang, X., 2018. Liraglutide protects cardiac function in diabetic rats through the PPAR α pathway. *Biosci. Rep.* 38. <https://doi.org/10.1042/BSR20180059>.

**ETUDE 2 : PROGRAMMATION PERINATALE
DE L'HOMÉOSTASIE INTESTINALE CHEZ LA
DESCENDANCE MALE APRES UNE
EXPOSITION MATERNELLE A UN PESTICIDE
ET UN REGIME RICHE EN LIPIDES**

Dans cette deuxième étude, notre objectif était de déterminer si l'exposition péri-gestationnelle (pré-gestation, gestation et lactation) de rats femelles au CPF et/ou à un régime riche en graisses (HFD) induirait des perturbations de la barrière épithéliale de la muqueuse intestinale (perméabilité paracellulaire, composition du mucus, morphologie intestinale, inflammation, immunité innée...) chez la descendance mâle à l'âge de jeune adulte.

Les altérations de la perméabilité intestinale, de la réponse inflammatoire et de la sécrétion de mucus ont été évaluées sur la descendance mâle âgée de 8 semaines issue de mères exposées au CPF et/ou HFD.

Dans cette étude, nous avons observé qu'une exposition maternelle répétée à des résidus de pesticides ou une alimentation déséquilibrée peut induire des effets précoces sur la fonction de barrière intestinale de la descendance mâle. Nous avons montré que l'exposition maternelle chronique au CPF réduit la croissance staturo-pondérale *in utero* sans différences significatives observées au niveau de la morphométrie digestive chez tous les groupes. Ces résultats sont d'autant plus surprenants que le CPF et le HFD sont connus pour induire une inhibition de l'AChE (Kondakala *et al.* 2017) et que l'activité de l'AChE était réduite chez la descendance mâle dans notre modèle d'étude (El Khayat El Sabbouri *et al.* 2020).

La barrière intestinale peut être perturbée au niveau de la couche de mucus, et notamment par sa composition en mucines. Dans notre modèle, l'exposition maternelle au CPF ou au HFD a diminué l'expression génique de *Muc2* et *Muc3* responsables des propriétés et de la composition du mucus. Par ailleurs, nous n'avons observé aucune modification de la sécrétion de mucus dans tous les segments intestinaux étudiés chez la descendance mâle dans nos conditions expérimentales. Cette réduction de l'expression des mucines est associée à une augmentation du nombre de cellules à mucus par mm de villosités uniquement dans l'iléon de la descendance issue de mères exposées au CPF. L'exposition maternelle au HFD a induit les mêmes résultats délétères que ceux observés avec le CPF.

Cependant, nous avons observé des changements dans l'expression des gènes codant pour les protéines des jonctions serrées, une composante majeure de la régulation de la perméabilité paracellulaire. Chez la descendance issue de mères exposées au CPF, nous avons mis en évidence une expression significativement réduite des gènes *Ocln* et *Cldn4* dans le jéjunum, *Tjp1* dans l'iléon et *Ocln* dans le côlon proximal, tandis que *Cldn4* était surexprimé à la fois

dans l'iléon et le côlon proximal. Cependant, nous n'avons mis en évidence aucun impact ni sur la perméabilité paracellulaire après mesure du FITC –dextran plasmatique ni sur le taux plasmatique de LPS, marqueur du passage excessif de produits bactériens à travers la barrière épithéliale intestinale. De plus, nous avons mesuré une réduction de l'expression des gènes *Cldn4* dans le jéjunum et *Ocln* dans le côlon proximal, ainsi qu'une surexpression iléale de *Cldn4* chez la progéniture mâle issue de mères exposées au HFD, sans association avec une altération de la perméabilité paracellulaire intestinale.

Nous avons ensuite évalué les effets de l'exposition maternelle au CPF et au HFD sur les marqueurs inflammatoires intestinaux chez la descendance. L'expression des gènes codant pour les TLR et les défensines était augmentée dans le jéjunum et le côlon proximal, sans aucun signe inflammatoire notable comme en attestent les taux de cytokines pro-inflammatoires plasmatiques chez les différents groupes d'animaux, quel que soit le traitement considéré.

L'exposition maternelle au CPF a ralenti la croissance fœtale et postnatale sans induire de modifications histologiques majeures de la muqueuse intestinale. L'exposition maternelle au CPF ou au HFD a partiellement altéré la fonction de la barrière intestinale sans perturbations de la perméabilité intestinale paracellulaire connue pour être à l'origine d'une inflammation. Une co-exposition maternelle à la fois au CPF et au HFD n'a pas augmenté les effets observés par rapport à chaque facteur pris séparément. Ces résultats suggèrent des changements dans le profil du microbiote intestinal chez la descendance mâle suite à une exposition maternelle à des facteurs environnementaux, comme déjà démontré dans des études précédentes suite à une exposition pré- et post-natale au CPF (Joly Condette *et al.* 2014, 2015). Les facteurs environnementaux sont connus pour influencer l'installation des maladies chroniques non transmissibles à l'âge adulte. Nos résultats mettent en évidence l'importance de l'exposition périnatale à ces perturbateurs comme potentiels facteurs de risque de développer de futures maladies.



OPEN

Programming of intestinal homeostasis in male rat offspring after maternal exposure to chlorpyrifos and/or to a high fat diet

Marion Guibourdenche^{1,2}, Hiba El Khayat El Sabbouri¹, Narimane Djekkoun¹, Hafida Khorsi-Cauet¹, Véronique Bach¹, Pauline M. Anton² & Jérôme Gay-Quéheillard^{1✉}

Alteration of programming of the intestinal wall maturation may be responsible for non-communicable chronic diseases in adulthood. It may originate from prenatal exposure of mothers to deleterious environmental factors such as pesticides or western diet. This work was undertaken to determine whether disturbances of the digestive tract function and of innate immunity of offspring at adulthood could be due to maternal exposure to a pesticide, chlorpyrifos (CPF) and a High Fat Diet (HFD) starting 4 months before gestation and lasting until weaning of offspring. Fifty-one male Wistar rats coming from 4 groups of dams exposed to CPF, HFD, both and control were followed from birth to 8 weeks of age. They were fed standard chow and received no treatment. The maternal pesticide exposure slows down fetal and postnatal weight gain without histological injuries of the gut mucosa. CPF or HFD both induced modifications of tight junctions and mucins genes expressions without inducing an increase in epithelial permeability or an inflammatory state. Co-exposure to both CPF and HFD did not exacerbate the effects observed with each factor separately. Despite the lack of direct contact except through breast milk until weaning, CPF or HFD maternal exposure have demonstrated preliminary gut barrier impacts on offspring.

Abbreviations

AChE	Acetylcholinesterase
<i>Actb</i>	Beta actin
BW	Body weight
cDNA	Complementary DNA
<i>Cldn4</i>	Claudin 4
CPF	Chlorpyrifos
d	Day
<i>Defb1</i>	Defensin β 1
<i>Defb4</i>	Defensin β 4
FITC	Fluorescein isothiocyanate
<i>Gapdh</i>	Glyceraldehyde 3-Phosphate dehydrogenase
HFD	High fat diet
<i>Hprt1</i>	Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1
IL-1 β	Interleukin 1 beta
IL-6	Interleukin 6
LPS	Lipopolysaccharide
<i>Muc1</i>	Mucin 1
<i>Muc2</i>	Mucin 2
<i>Muc3</i>	Mucin 3

¹PériTox, Périnatalité & Risques Toxiques, UMR-I 01, UPJV/INERIS, Université Picardie Jules Verne, CURS, Présidence UPJV, Chemin du Thil, 80025 Amiens, France. ²Institut Polytechnique UniLaSalle, Université d'Artois, ULR 7519, 19 rue Pierre Waguët, BP 30313, 60026 Beauvais, France. ✉email: Jerome.gay@u-picardie.fr

NOAEL	No observable adverse effect level
<i>Ocln</i>	Occludin
OPs	Organophosphates
PAS	Periodic acid schiff
PND	Postnatal day
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
SCD	Standard chow diet
SEM	Standard error to the mean
TJ	Tight junctions
<i>Tjp1</i>	Tight junction protein 1
<i>Tlr2</i>	Toll like receptor 2
<i>Tlr4</i>	Toll like receptor 4
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha
<i>Ubc</i>	Ubiquitin C
Zo-1	Zonula occludens protein-1

Settlement and maturation of a healthy gut is based on a complex series of events starting in utero and continuing beyond birth, suckling and weaning periods¹. It is based on genetic programming and modulated by epigenetic events² which take place mainly during the first 1000 days of life. Then, due to its immaturity and thus to a higher intestinal permeability, the mucosal barrier of the gastrointestinal system of neonates and young infants can be more easily penetrated by macromolecules than that of older individuals³ and, as a consequence, may be more prone to injury and inflammation. This may encourage the transfer of antigens and other xenobiotics through the gut wall and may favor the onset of intestinal inflammation or gastrointestinal diseases⁴. As thus, altered intestinal barrier function during the perinatal period may have long-term health impacts at intestinal and/or systemic levels. Furthermore, it is now clearly established that environmental factors, among which diet or food contaminants to which mother and offspring may be exposed to, will influence the settlement and maturation of the intestinal tract of offspring through epigenetic events known to alter permanently their gut function and increasing their risk to develop non-communicable chronic diseases in adulthood. Pesticides, defined as substances used to control organisms considered as harmful for plants and animals, represent a very important category of food contaminants. The widest category of pesticides used worldwide are Organophosphates (OPs) although their use in France is currently decreasing. Our exposure to these pesticides is mainly oral, through the ingestion of pesticides residues in food (fruits and vegetables). This type of pesticides is known to induce an irreversible inhibition of acetylcholinesterase (AChE) activity, involved in acetylcholine recycling. As OPs and their metabolites easily cross the placenta, mothers might also expose their fetus all along gestation⁵ and the long-term effects of fetal or neonatal OPs exposure of offspring will have, through different mechanisms, an incidence on health later in life⁶. Among OPs, Chlorpyrifos-ethyl (CPF) exposure is known to affect the fetal nervous system^{7,8}. It has been suggested that this molecule disrupts the embryonic development through perturbation of non-neuromuscular cell-to-cell interactions mediated by electrical events, such as intracellular ion concentration changes, similar to those involved in gametes interaction⁹. We have previously demonstrated a morphological modification of the intestinal villi, an alteration of the intestinal mucous barrier and stimulation of the intestine in pups exposed to pre- and post-natal CPF^{10–12}. Other studies with in vitro approaches showed that CPF increases intestinal permeability^{13,14} but at this time little is known about the mechanisms by which CPF impacts the intestinal epithelial barrier, host's first line of defense against potential deleterious exogenous agents.

Furthermore, apart from pesticides, our diet may also represent a risk for our gut health. It is now well recognized that maternal diet and body composition before pregnancy has a great influence on her child future health^{15–18}. Western diet may modify the digestive function and absorption of nutrients by influencing the architecture of the gut wall, mucus secretion or innate immunity¹⁹. However, the way by which mother's diet may have an incidence on offspring gut settlement and maturation is, today, not understood. In this study, our aim was to determine whether a peri-gestational (pre-gestation, gestation and lactation) exposure of female rats to CPF and/or High Fat Diet (HFD) leads to disturbances of digestive function (paracellular permeability, mucus composition, intestinal morphology, inflammation, innate immunity...) in their male offspring at young adult age to qualify the importance of mother exposure on offspring programming of the gut maturation.

Results

Reduction of in utero growth but no digestive morphology modifications in male offspring from mothers exposed to CPF and/or HFD. Male pups from mothers exposed to CPF had a significantly ($p=0.0196$) lower body weight immediately after birth (Post-Natal Day 3—PND3; 7.99 ± 0.11 g in the CPF-SC vs 9.04 ± 0.32 g in the ctrl-SC; -12%) (Fig. 1). By contrast, maternal HFD exposure significantly ($p=0.0317$) increased body weight at weaning (PND21; 73.3 ± 3.03 g in the ctrl-HF vs 55.5 ± 1.90 g in the ctrl-SC; $+32\%$). It remained noticeably larger while not significant ($p=0.1932$) until the end of the study (PND54; 322.2 ± 12.99 g in the ctrl-HF vs 288.8 ± 4.36 g in the ctrl-SC; $+12\%$). Furthermore, HFD exposure significantly ($p=0.0015$; $p=0.0017$ and $p=0.0351$ respectively) rose CPF rats body weight not only immediately after birth (PND3; 10.09 ± 0.13 g in the CPF-HF vs 7.99 ± 0.11 g in the CPF-SC; $+26\%$) but also at weaning (PND21; 71.27 ± 0.99 g in the CPF-HF vs 47.20 ± 2.60 g in the CPF-SC; $+51\%$) and at early adulthood (PND54; 313.2 ± 7.08 g in the CPF-HF vs 285.0 ± 3.64 g in the CPF-SC; $+10\%$) (Fig. 1).

Globally, in both the jejunum and the ileum at young adult age, area of the villi of the progeny from CPF exposed mothers were not significantly different ($p>0.05$) from non-exposed mothers. Maternal HFD exposure induced a non-significant ($p>0.05$) expansion for both the two segments compared with offspring from

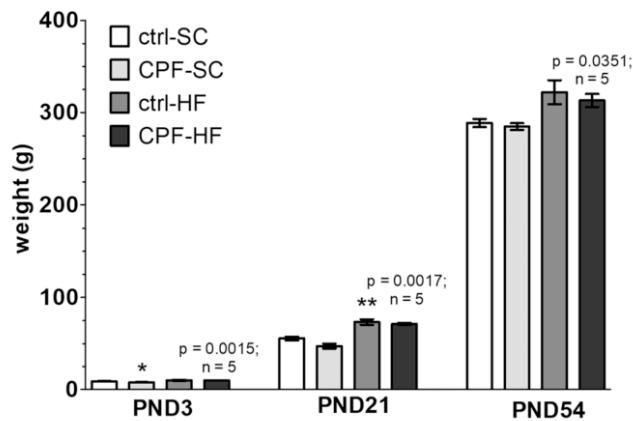


Figure 1. Body weight (g) at birth (PND3) after weaning (PND21) and at young adult age (PND54) of male offspring from CPF and/or HFD exposed mothers. Values are expressed as mean $\pm$ SEM ($n = 5-20$). ***Significantly different ($p < 0.05$; $p < 0.01$) compared with ctrl-SC using the analysis of variance (ANOVA) and a subsequent post hoc Bonferroni test. *ctrl* control, *CPF* Chlorpyrifos, *HF* high fat, *SC* standard chow, *PND* postnatal day.

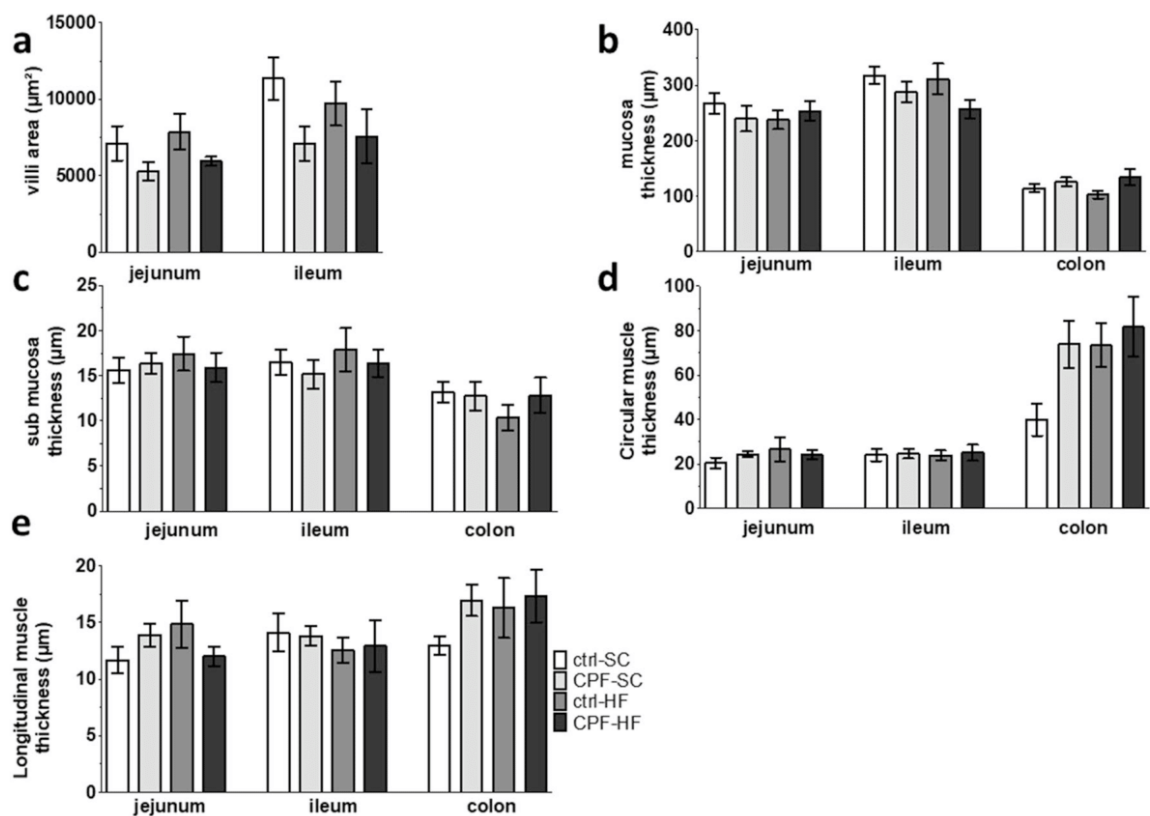


Figure 2. Histological measurements of digestive segments on male offspring at young adult age from CPF and/or HFD exposed mothers. (a) Villi area (μm^2), (b) Mucosa thickness (μm), (c) Submucosa thickness (μm), (d) Circular muscle thickness (μm), (e) Longitudinal muscle thickness (μm) in jejunal, ileal and proximal colon segments. Values are expressed as the mean $\pm$ SEM ($n = 5$) using the analysis of variance (ANOVA) and a subsequent post hoc Bonferroni test. *ctrl* control, *CPF* Chlorpyrifos, *HF* high fat, *SC* standard chow.

non-exposed mothers (Fig. 2a). However, we did not notice any significant difference ($p > 0.05$) between the offspring groups coming from mothers exposed to either CPF, HFD or both and the control groups regarding the digestive morphometric parameters studied: villi area, mucosa and submucosa thicknesses, circular and longitudinal muscle thicknesses (Fig. 2b–e).

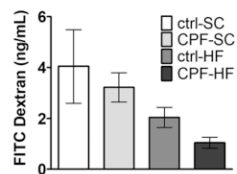


Figure 3. FITC dextran assays in plasma 2.5 h after oral administration in male offspring at young adult age from CPF and/or HFD exposed mothers. Values are expressed as the mean $\pm$ SEM ($n=5-20$) using the analysis of variance (ANOVA) and a subsequent post hoc Bonferroni test. *ctrl* control, *CPF* Chlorpyrifos, *HF* high fat, *SC* standard chow, *FITC* fluorescein isothiocyanate.

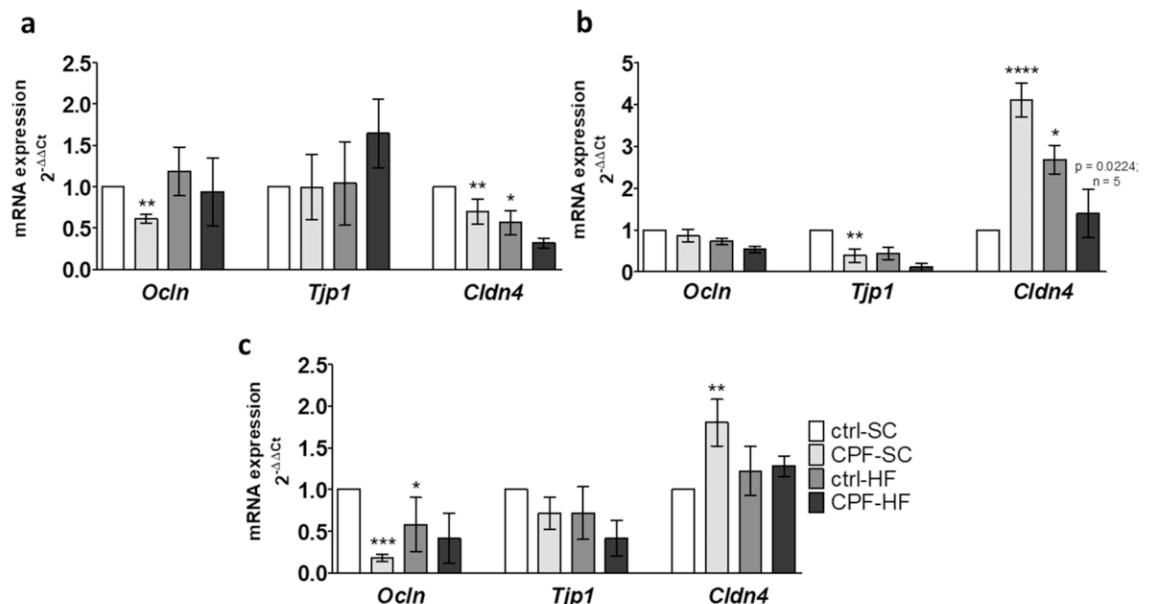


Figure 4. mRNA expression of genes coding for tight junctions' proteins by RT-PCR in male offspring at young adult age from CPF and/or HFD exposed mothers. The mRNA levels of gene expression in (a) jejunum, (b) ileum, (c) proximal colon are expressed as fold induction over the control group set at 1. Values are expressed as mean $\pm$ SEM ($n=5-20$) using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ calculation method with the housekeeping gene *Gapdh* for jejunum and ileum, and *Hprt1* for proximal colon segments. ****,****,****Significantly different ($p < 0.05$; $p < 0.01$; $p < 0.001$; $p < 0.0001$) from ctrl-SC using the analysis of variance (ANOVA) and a subsequent post hoc Bonferroni test. *ctrl* control, *CPF* Chlorpyrifos, *HF* high fat, *SC* standard chow, *Cldn4* Claudin 4, *Ocln* occludin, *Tjp1/Zo-1* Zonula occludens-1.

Partial alteration of markers of intestinal permeability in male offspring from mothers exposed to CPF and/or HFD. FITC-dextran concentration measurement in plasma 2.5 h after oral administration was not associated with any significant difference ($p > 0.05$) between the different groups (ctrl-SC: 4.04 $\mu\text{g/mL}$; CPF-SC: 3.21 $\mu\text{g/mL}$; ctrl-HF: 2.04 $\mu\text{g/mL}$; CPF-HF: 1.04 $\mu\text{g/mL}$) (Fig. 3).

Jejunal mRNAs expressions of the *Ocln* and *Cldn4* genes were significantly ($p = 0.0034$ and $p = 0.0038$ respectively) decreased (0.39-fold and 0.30-fold respectively) in the CPF-SC, but it did not change the expression of *Tjp1* gene in this group (Fig. 4a). In the ileum, we noted a significantly reduced ($p = 0.0010$; 0.6-fold) mRNA expression for the *Tjp1* gene and a clear overexpression of *Cldn4* mRNA ($p < 0.0001$; 4.1-fold) in the CPF-SC by comparison to ctrl-SC (Fig. 4b). Then in the proximal colon, there was a significant decrease in the expression of the *Ocln* mRNA ($p = 0.0007$; 0.8-fold), and a significant overexpression of *Cldn4* mRNA in the CPF-SC compared to the ctrl-SC ($p = 0.0064$; 0.8-fold) (Fig. 4c).

Offspring from mothers exposed to HFD resulted in a significant decrease of jejunal expression of the *Cldn4* mRNA ($p = 0.0178$; 0.4-fold) as compared to the ctrl-SC (Fig. 4a). At last, in the proximal colon, maternal HFD exposure clearly reduced the expression of the *Ocln* gene ($p = 0.0469$; 0.4-fold) in the ctrl-HF by comparison to the ctrl-SC (Fig. 4c).

By contrast, we observed in the ileum from the CPF-HF, a significant reduction of the expression of *Cldn4* mRNA ($p = 0.0224$; 0.7-fold) by comparison to the CPF-SC (Fig. 4b).

Modification of innate immunity reactivity and inflammatory markers in male offspring from mothers exposed to CPF and/or HFD. Absence of induction of an inflammatory reaction in the digestive tract on male offspring from mothers exposed to CPF and/or HFD. Whichever treatment received by moth-

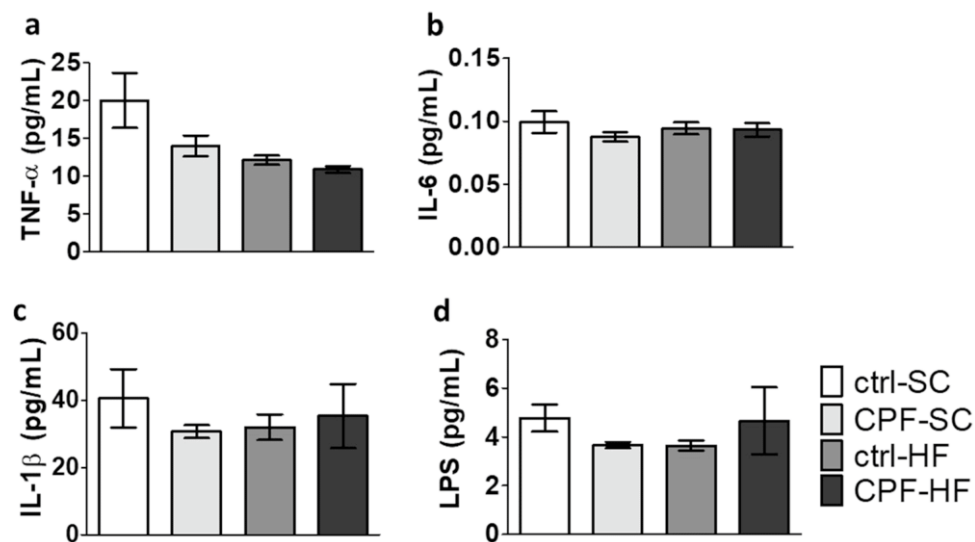


Figure 5. Blood pro-inflammatory cytokines and LPS levels (pg/mL) in male offspring at young adult age from CPF and/or HFD exposed mothers. IL-6. Plasma levels of (a) TNF-α (b) IL-6 (c) IL-1β (d) LPS were measured. Values are expressed as the mean $\pm$ SEM ($n = 5-20$) using the analysis of variance (ANOVA) and a subsequent post hoc Bonferroni test. *ctrl* control, *CPF* Chlorpyrifos, *HF* high fat, *SC* standard chow, *IL-1b* Interleukin 1 beta, *IL-6* Interleukin 6, *LPS* lipopolysaccharides, *TNF-α* tumor necrosis factor alpha.

ers, plasma cytokines levels (IL-1β, IL-6 and TNF-α) measured at young adult age were not different ($p > 0.05$) (Fig. 5a–c). Additionally, as a marker of potential excessive bacterial products transfer through the intestinal epithelial barrier, and thus of permeability alteration, the plasma LPS assay in the 4 groups of offspring was not associated to significant differences ($p > 0.05$) at young adult age (Fig. 5d).

Alteration of innate immunity markers at the intestinal and colonic mucosal levels in male offspring from mothers exposed to CPF and/or HFD. At the jejunal level, maternal CPF exposure significantly ($p = 0.0106$ and $p = 0.0001$ respectively) increased (6.1-fold and 7.7-fold; respectively) the expression of not only *Tlr2* and *Tlr4* mRNA but also significantly ($p = 0.0001$ and $p < 0.05$ respectively) increased (32.0-fold and 18.9-fold respectively) the expression of *Defb1* and *Defb4* mRNA as compared to the ctrl-SC (Fig. 6a). By contrast, maternal CPF exposure was responsible for a significant decrease ($p = 0.0025$; 0.8-fold) of ileal expression of *Defb1* mRNA by comparison to the ctrl-SC (Fig. 6b). At last, maternal CPF exposure resulted in a significant ($p = 0.0009$; $p = 0.0001$, $p < 0.0001$ and $p = 0.0012$ respectively) increase of the proximal colic mRNA expression of *Tlr2*, *Tlr4*, *Defb1* and *Defb4* (3.90, 2.67, 10.9 and 5.4-fold respectively) genes by comparison to the ctrl-SC (Fig. 6c).

On the other hand, maternal HFD exposure was at the origin of a significant ($p = 0.0039$, $p = 0.0009$ and $p < 0.001$; respectively) increase of *Tlr2*, *Defb1* and *Defb4* (8.6, 35.3 and 53.8-fold, respectively) mRNA expression in the jejunum by comparison to the ctrl-SC (Fig. 6a). By contrast, in the ileum, a significant reduction ($p = 0.0016$; 0.8-fold) of mRNA expression of *Defb1* was observed compared to the ctrl-SC. In the proximal colon, maternal HFD exposure was associated to a significant ($p = 0.0216$ and $p = 0.0467$ respectively) increase of mRNA expression of *Tlr4* and *Defb4* (2.6 and 3.8-fold) as compared to ctrl-SC (Fig. 6c).

Co-exposure of mothers to CPF and HFD (CPF-HF) resulted in a significant downregulation ($p = 0.0389$; 0.7-fold) of *Defb4* mRNA expression in the ileum as compared to the CPF-SC (Fig. 6b).

Maternal CPF or HFD exposure downregulated mucins mRNA expressions in the progeny at young adult age. Maternal exposure to CPF resulted in a significant downregulation of the expression of *Muc2* and *Muc3* genes both in the jejunum (0.6-fold; $p = 0.0058$ and $p < 0.0001$; 0.8-fold respectively) and the ileum (0.4-fold; $p = 0.0016$ and 0.8-fold; $p = 0.0039$ respectively) in the CPF-SC as compared to the ctrl-SC (Fig. 7a,b). By contrast, we did not notice, in this group of animals, any difference in the expression of genes coding for mucins in the proximal colon (Fig. 7c).

On the other hand, mothers exposure to HFD was associated to a significant lower expression of both *Muc2* and *Muc3* mRNA in the jejunum (0.8-fold, $p < 0.0001$ and 0.8-fold, $p = 0.0163$, respectively), in the ileum (0.6-fold, $p = 0.0009$ and 0.8-fold, $p = 0.0062$, respectively) and in the proximal colon (0.7-fold, $p = 0.0085$ and 0.9-fold, $p = 0.0041$ respectively) in the ctrl-HF as compared to the ctrl-SC (Fig. 7a–c).

Specific upregulation of goblet cell number in the ileum of offspring from mothers exposed to CPF. In the ileum of CPF-SC, we noticed a significant increase (+78%; $p = 0.0215$) of the number of goblet cells by mm of villus (100.6 ± 15.68 vs 56.5 ± 5.40 goblet cells/mm in the ctrl-SC) (Fig. 8a). By contrast, no significant difference was highlighted in the jejunum (Fig. 8a). Furthermore, evaluation of the secretion of mucus (PAS staining) did not point at any significant difference between the groups (Fig. 8b).

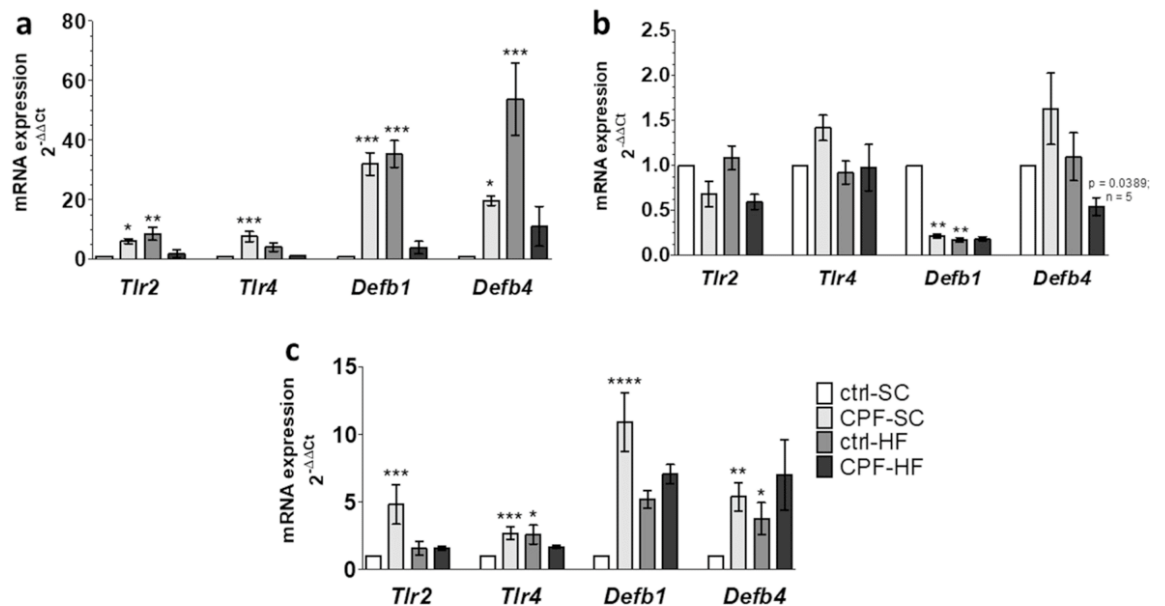


Figure 6. mRNA expression of genes coding for *Tlrs* and *B Defensins* by RT-PCR in male offspring at young adult age from CPF and/or HFD exposed mothers. The mRNA levels of gene expression in (a) jejunum, (b) ileum, (c) proximal colon are expressed as fold induction over the control group set at 1. Values are expressed as mean $\pm$ SEM (n = 5–20) using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ calculation method with the housekeeping gene *Gapdh* for jejunum and ileum, and *Hprt1* for proximal colon segments. *, **, ***, **** Significantly different (p < 0.05; p < 0.01; p < 0.001; p < 0.0001) from ctrl-SC using the analysis of variance (ANOVA) and a subsequent post hoc Bonferroni test. ctrl control, CPF Chlorpyrifos, HF high fat, SC standard chow, *Defb1* Defensin β 1, *Defb4* Defensin β 4, *Tlr2* Toll Like Receptor 2, *Tlr4* Toll Like Receptor 4.

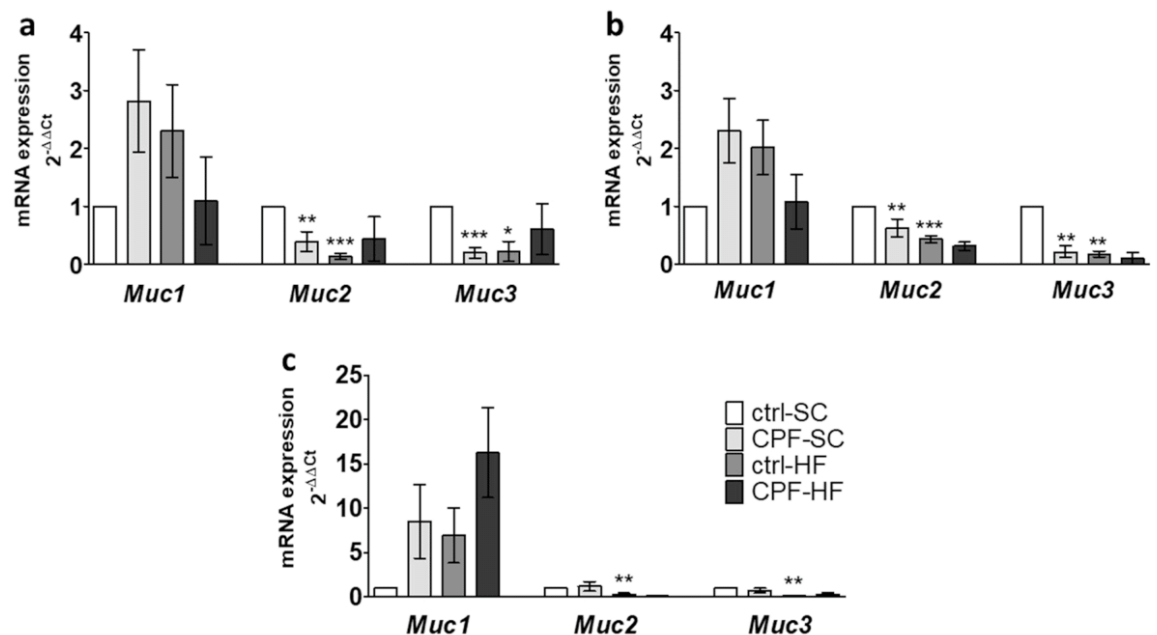


Figure 7. mRNA expression of genes coding for mucins' proteins by RT-PCR in male offspring at young adult age from CPF and/or HFD exposed mothers. The mRNA levels of genes expression in (a) jejunum, (b) ileum, (c) proximal colon are expressed as fold induction over the control group set at 1. Values are expressed as mean $\pm$ SEM (n = 5–20) using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ calculation method with the housekeeping gene *Gapdh* for jejunum and ileum, and *Hprt1* for proximal colon segments. *, **, ***, **** Significantly different (p < 0.05; p < 0.01; p < 0.001) from ctrl-SC using the analysis of variance (ANOVA) and a subsequent post hoc Bonferroni test. ctrl control, CPF Chlorpyrifos, HF high fat, SC standard chow, *Muc1* Mucin 1, *Muc2* Mucin 2, *Muc3* Mucin 3.

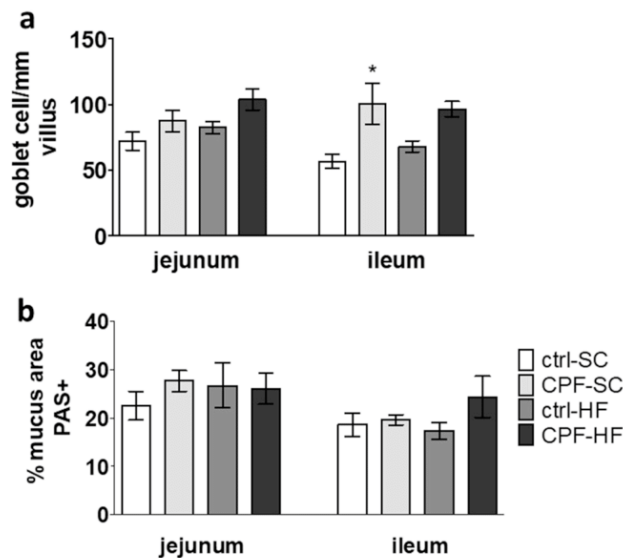


Figure 8. Histological measurements of digestive segments in male offspring at young adult age from CPF and/or HFD exposed mothers. (a) Goblet cells count/mm villus and (b) % of mucus area PAS⁺ in jejunal and ileal segments. Values are expressed as the mean $\pm$ SEM ($n = 5-20$). *Significantly different ($p < 0.05$) from ctrl-SC using the analysis of variance (ANOVA) and a subsequent post hoc Bonferroni test. ctrl control, CPF Chlorpyrifos, HF high fat, SC standard chow, PAS periodic acid schiff.

Discussion

In this study, we sought to determine the consequences of maternal long-term exposure (pre-gestation, gestation and lactation) to deleterious environmental factors such as pesticide residues associated to an unbalanced diet on the programming of body growth and of the intestinal wall function of its male offspring. A repeated contact with pesticides or through maternal unbalanced diet may have strong health consequences. Indeed, measurable pups lactational exposure to CPF (oral, 1 mg/kg/day) was previously confirmed, CPF being concentrated in the milk²⁰. In addition, rat relevant offspring NOAEL for CPF is 1 mg/kg/day which is the dose used in the study²¹. To guarantee a homogenous exposure of animals to CPF, we chose to expose animals to the pesticide by orogastric gavage to mimic the oral route which is the most frequent route of exposure to this pesticide. This technique won't generate neither stress nor behavioural or metabolic consequences on the mother or its progeny when realized by an experienced person²². The nutritional composition of breast milk could also be affected by maternal obesity or diet during pregnancy and lactation. Changes in milk composition of lipids during lactation might contribute to the long-term metabolic changes induced by maternal HFD²³.

We have shown that chronic maternal exposure to CPF reduces in utero growth. In link with these results, we studied potential disturbances of the digestive wall architecture of the offspring. We observed the consequences of these two factors at PND60 which corresponds to young adult rats²⁴ and is right after becoming sexually mature²⁵. Indeed, the development of the gastrointestinal tract starts in utero and maturation continues beyond weaning¹. However, in our model, we did not notice any difference between groups from mothers exposed to CPF and/or HFD and the control group regarding the digestive morphometry. This is surprising since both CPF and HFD are known to induce inhibition of AChE²⁶ and since we have recently confirmed that AChE activity was reduced in young adult male progeny (PND60) on this model²⁷. Indeed, AChE inhibition may cause structural defects in the digestive tract, as thanks to its expression in gut endoderm of the embryo, it plays a role in intestinal morphogenesis²⁸. As thus, these effects may impact nutrients absorption and induce growth deficiency. Furthermore, we have previously published that maternal CPF exposure (1 and 5 mg/kg/day from gestation until PND60) delayed maturation of the digestive system (villi height and width, epithelium thickness and muscular layers thickness). But the characteristics mentioned above were evident at PND21 at the highest dose used and when the offspring were directly exposed to the pesticide¹¹. In addition, maternal obesity (HFD exposure starting 8 weeks before pregnancy and lasting until the end of lactation) was at the origin of a reduction in villi height and of an increase of crypt depth in ileum of female mice offspring²⁹. The authors suggested that these impacts may come from a reduction from enhanced epithelial turnover due to observed inflammation. Such a difference may come from differences in the experimental model, as Xue et al. studied the effects of a maternal HFD exposure for 8 weeks on female mice at 16 weeks of age. In our model, species used was rats and the exposure timing was 16 weeks before mating, and the pups were studied at the age of 8 weeks.

Another striking point is the low fertility of CPF-HF mothers that was not expected. Indeed, although HFD is described as impairing female reproductive function through an alteration of the hypothalamic–pituitary–ovarian axis functionality on rats³⁰ and CPF as inducing reproductive problems (changed the sperm, serum hormones, oxidative stress in the testis, and enzyme activity related to spermatogenesis in rats)³¹, we did not observe such consequences in our model. Since animals were raised in the same environment, the only explanation may be

linked to the cumulative effect of both the deleterious factors studied. To clarify this point, further studies will have to be performed to evaluate the cumulative consequences of CPF and HFD on the reproductive function with special attention to putative follicular atresia in the ovaries of females.

Indeed, intestinal barrier may be disturbed at the mucus layer level, and particularly through its mucin composition. As a matter of facts, secretory mucins form a protective mucus gel barrier on the epithelia against potentially deleterious environment present in the lumen of the gastro-intestinal tract³². In our model, maternal exposure to CPF or HFD decreased, in their offspring, the expression of *Muc2* and *Muc3* responsible for mucus properties and secretion, although we did not observe any modification of mucus release in all the intestinal segments studied. There still remains to be established whether it results in a modification of protein expression and functionality but also to see which mechanism will therefore be at the origin of these genes expressions modifications. This reduction in mucins expression is associated with an increase in the number of mucus cells per mm of villus only in the offspring's ileum from CPF exposed mothers. These data are contradictory with a previous study of our laboratory in which we revealed that chronic maternal and postnatal CPF-exposure were associated with a higher expression of *Muc2* in the ileum and the proximal colon and that the effects were more relevant at weaning. Such a difference may be explained by the fact that progeny was directly exposed after weaning to CPF and to a higher dose (5 mg/kg/day)¹¹.

HFD maternal exposure induced the same deleterious results as those observed with CPF. This is corroborated by another work showing that, in an in vitro model of epithelial/mucus cells co-culture, an excess of nutrients increased mucus production and intestinal permeability without inducing any inflammation³³. The absence of effects on intestinal permeability in our model may be due to a more complex architecture of the epithelium in vivo. Furthermore, in another experiment, HFD-induced maternal obesity reduced the density of goblet cells per villus observed with Alcian blue staining in the ileum of 16 weeks old female offspring²⁹. One of the explanation could be that the alteration of mucus barrier may not be significant at PND60 (reduction of secreted mucins but not of mucus thickness) but could become significant later in life (thinner mucus layer) rendering the animals more prone to develop gut inflammation.

In this study, we also managed to evaluate the consequences of maternal exposure to a pesticide residue (CPF) together with an imbalanced (HF) diet on the intestinal mucosal barrier function. We observed changes in the expression of genes coding for TJ proteins, which maintain the strength of the mucosal barrier, a strong component of the regulation of paracellular permeability in relation to maternal exposure. In offspring from mothers exposed to CPF, we evidenced a significantly reduced expression of *Ocln* and *Cldn4* in the jejunum, of *Tjp1* in the ileum and of *Ocln* in proximal colon, while *Cldn4* was overexpressed in both the ileum and the proximal colon. However, we did not evidence any impact neither on paracellular permeability after measuring plasma-dextran nor on the plasma LPS level, a marker of excessive bacterial products passage through the intestinal epithelial barrier in these offspring. This is not surprising since in normal physiological conditions, these genes coding for TJ proteins encounter variations in their respective expression that appears to be dependent on the intestinal segment. As we have already described, all junctional proteins are not similarly influenced by the experimental conditions and this is in accordance with the fine regulation of junctional complexes¹². Furthermore, this study showed a rise in paracellular permeability at weaning (PND21), when the digestive system is still immature, but no more at PND60¹². This event was associated with a disturbance in the expression and/or the localization of TJ and with bacterial translocation and dysbiosis at weaning and at young adulthood^{11,12}.

Following HFD maternal exposure, a reduction of the expression of *Cldn4* in the jejunum and *Ocln* in the proximal colon, together with an ileal overexpression of *Cldn4* were observed in male offspring. It is not noteworthy that maternal HFD led to changes in the same direction as CPF effects without, however, exacerbating them. The observed impacts might only be predictive of more severe alterations later in life considering that 8 weeks old was a probably too early experimental timing to observe such effects. We could then suggest that may inhibit the bioactivation of CPF into its metabolites by decreasing cytochrome P450 (CYP450) isoforms^{26,34}. Moreover, since at birth, the bioactivation of CPF, catalyzed by CYP, is much higher than the detoxification³⁵, this may indicate a role for a downregulating effect of HFD on CPF toxic effects³⁶.

Indeed, perturbations of gene expression of TJ proteins were not associated to any clear alteration of intestinal paracellular permeability. These results are in agreement with previous results demonstrating a decrease of *Zo-2* and *Zo-3* gene expression and an increase of *Cldn2* at both mRNA and protein levels and an increase of plasma LPS level while they did not observe any alteration of intestinal permeability (plasma FITC) on 16 weeks old female mice offspring after maternal HFD²⁹. This difference on plasma LPS level may be explained by the fact that, in their work, authors studied female rodent. Indeed, females are known to have a greater magnitude of gut permeability than male³⁷.

Knowing that the presence of pro-inflammatory cytokines in the intestinal compartment could be able to modulate the expression of claudins proteins orchestrated by transcriptional regulation, we then evaluated the effects of mother exposure to CPF and HFD on gut inflammatory markers in their offspring. We observed that *Tlr* and *Defensin* gene expressions were increased in the jejunum and the proximal colon of offspring whereas we did not observe any inflammatory signs as shown by the plasma cytokines levels in the different groups of animals whichever treatment considered. It is well established that TLRs recognize harmful molecules from pathogens and activate the innate immune system and thus the adaptive immune response (for review see Ref.³⁸). For example, TLR2 and TLR4 specifically recognize bacterial LPS and their activation mainly lead to the synthesis of pro-inflammatory cytokines and chemokines³⁹. Their expression levels are increased in macrophages and dendritic cells during inflammation⁴⁰. Gut immune system is altered under HFD in link with induced inflammation. Furthermore, TLR4 upregulation may come from gut inflammation induced by HFD⁴¹. This upregulation is known to alter gut microbiota composition which is responsible for a disturbance of the homeostasis and of the development of the body's immune defense against some bacteria at the origin of the increased production of β defensins⁴². We were unable to detect any obvious sign of inflammation nor any morphological defect or

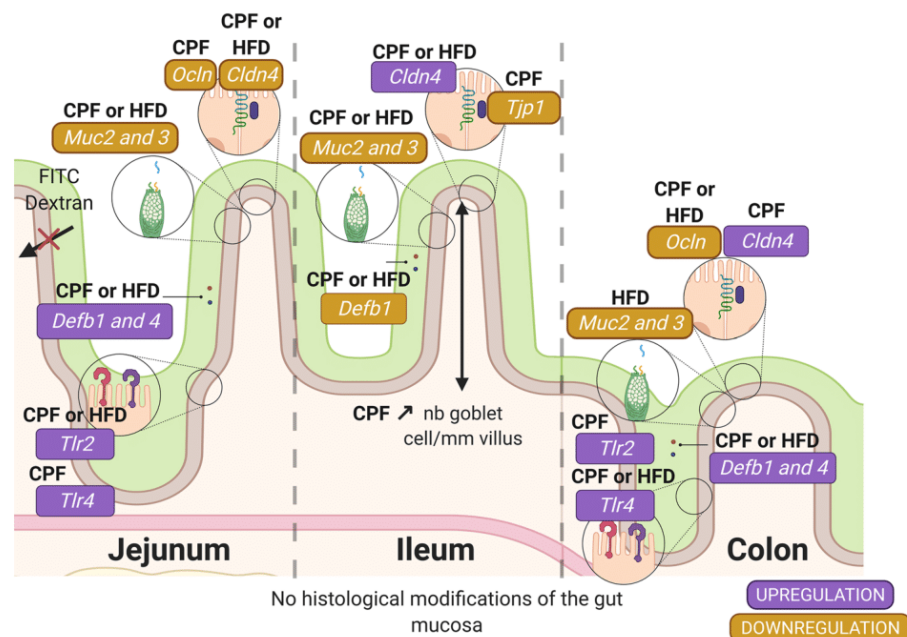


Figure 9. Effect on intestinal barrier in progeny from mothers submitted to CPF in the absence or presence of HFD. Created with BioRender.com; *CPF* Chlorpyrifos, *HFD* high fat diet, *Cldn4* Claudin 4, *Defb1* Defensin β 1, *Defb4* Defensin β 4, *Muc1* Mucin 1, *Muc2* Mucin 2, *Muc3* Mucin 3, *Ocln* Occludin, *Tjp1/Zo-1* Zonula occludens-1, *Tlr2* Toll Like Receptor 2, *Tlr4* Toll Like Receptor 4.

innate immune cells infiltration at the intestinal level. One of the reason why we saw no upregulation of pro-inflammatory cytokines may be linked with the fact that we measured circulating cytokines but not tissular ones. We cannot exclude, however, that pro-inflammatory cytokines may be moderately released in the mucosa inducing a modification of TJs composition and influence their overall balance and thus the barrier function⁴³.

This study was aimed at identifying the potential impacts on the intestinal barrier and integrity of the offspring of a harmful maternal environment, consisting in a food rich in saturated fat associated to pesticide residues during the perinatal period. Even in the absence of direct contact except through blood during the in utero period and breast milk until weaning, CPF or HFD maternal exposure started to modulate markers of gut barrier function in the progeny. Furthermore, maternal CPF exposure slowed down fetal and postnatal growth without inducing major histological modifications of the gut mucosa. CPF or HFD also partly altered some components of intestinal barrier function as observed by the decrease in expression of genes involved in maintaining tight junctions and mucus composition, despite of any observed perturbations in intestinal permeability known to be at the origin of inflammation (Fig. 9). A maternal HFD did not exacerbate CPF's observed effects. We can also suggest that the observed overexpression of TLRs in this model is probably a sign of intestinal dysbiosis and that the increase of mRNA expression of defensins might probably be due to bacterial components specific to TLR increased expression on enterocytes. This will have to be confirmed by the analysis of gut microbiota composition of the progeny. Altogether, results play in favor of a role of pesticide residues and western diet in the alteration of the settlement of gut barrier function in the progeny. If confirmed at a later stage, this could contribute to the characterization of early stage markers to predict the consequences of perinatal exposure to environmental factors on the settlement of chronic non-communicable diseases later in life.

Methods

Animal housing. Fifty-one male Wistar rats coming from sixteen females (Janvier laboratory—Saint Berthevin, France) were used. Animals were pair housed in stainless steel and enriched cage (presence of roller, sizzle pad and chips) in a controlled air-temperature (23 ± 1 °C). The room had a constant relative humidity of 26% and artificial lighting (12-h night/light cycle)²⁷.

Animals welfare was monitored daily. All experiments were performed according to the protocol reviewed by the local ethic committee (C2EA-96) and approved by the French Ministry of Research (reference APAFIS # 8207-2016121322563594 v2). All animals experiments comply with EU Directive 2010/63/EU and with the ARRIVE guidelines (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments).

Animals experiment. Male offspring coming from mothers submitted to different environmental conditions were followed from birth until early adult age (PND60). They received no treatment and had access to standard chow and water ad libitum (Fig. 10) throughout the study. After one week of acclimation, the 16 mothers (225 ± 17 g—8 weeks-old), were assigned randomly to different experimental conditions. Females were divided into 2 groups of 8 respectively receiving either CPF (O. O-diethyl-O-(3,5,6-trichloro-2-pyridinyl)

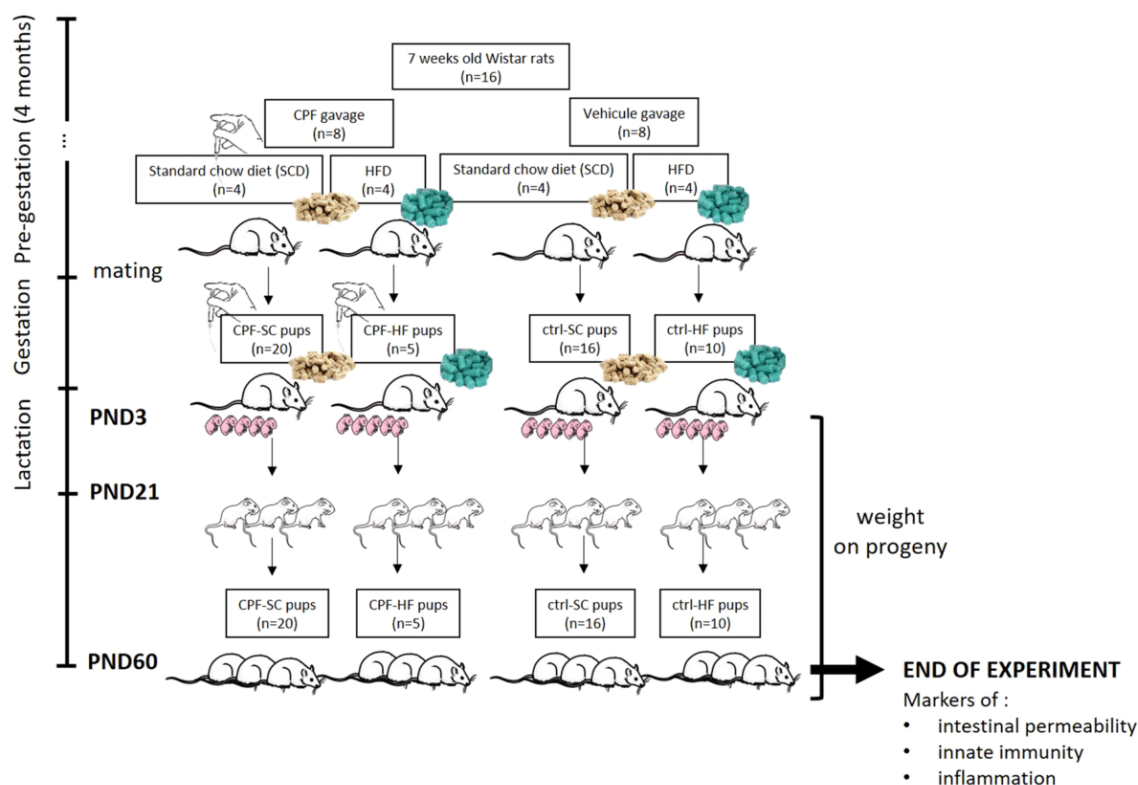


Figure 10. Experimental procedure. Created with BioRender.com; on the left-hand side of the figure is indicated the chronology of the experiments and on the main panel the events to which dams and progeny were submitted. *ctrl* control, *CPF* chlorpyrifos, *HFD* high fat diet, *SCD* standard chow diet, *PND* postnatal day.

phosphorothioate solution (1 mg/kg/day po—1 mL/kg/day) (LGC Standards Laboratory, Molsheim, France) or its vehicle rapeseed oil (1 mL/kg/day) (MP Biomedicals, Illkirch, France) (Fig. 10). Each group was further divided in 2 subgroups receiving either a high fat (HF) diet (60% energy from fat) (D12492; laboratory Sniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Germany) (n=4/group) or a standard chow (SC) diet (maintenance chow—Serlab 3436, or breeding chow during gestation and lactation—Serlab 3336) (Serlab, Montataire, France) (Fig. 10). This model has been shown to induce metabolic alterations (increased body weight (BW), hyperinsulinemia, programming of adiposity...) in the offspring at adulthood (7 months of age)⁴⁴. With this model, standard rodent chow was used as control diet because a recent study showed that both a purified low-fat diet or a regular chow may be appropriate as controls for an HFD study⁴⁵. In their work, authors demonstrated that the use of these diets during 16–18 weeks on mice had similar effects on phenotypic (weight gain), metabolic (glucose tolerance, levels of high-density lipoprotein, triglycerides, plasma cytokines and adipocytokines) and behavior outcomes. Furthermore, in our study, we did not study the incidence of these diets on mothers but rather specifically focused on their offspring which all were under Standard Chow Diet (SCD). Features of the diets are described in Supplementary Table S1.

After 4 months of exposure (24 weeks old), the 16 females (316 ± 33 g) were mated. Pregnancy was confirmed by the presence of spermatozoa and/or plug in the vagina checked twice with a smear on the following early morning. After fertilization, pregnant females were individually housed in clean plastic cages and treatments and diets were pursued [HFD vs SCD; CPF vs rapeseed oil (*ctrl*)] until the end of lactation. The day of parturition was considered as post-natal day 1 (PND1). A litter was composed of a mean of 10 ± 5 pups (4 ± 3 male pups per litter). The litter size was not significantly different between groups. Male pups represented 54% of the total offspring. Legs of each pup were tattooed with a veterinary ink (Centravet, Nancy, France) for individual identification. Pups were counted, sexed and weighed at PND3, to limit possible early-life maternal separation stressor; they were not weighed at PND1. Pups were weighed every 3 days until PND54. Animals were sacrificed at PND60, when young adults²⁴. At weaning (PND21), pups were separated from their mothers and fed tap water and SC diet (SCD) (Serlab 3436), ad libitum (Fig. 10). In order to avoid potentially confounding factors such as menstrual cycles and the impact of hormones on physiological functions, only male pups were studied. They were all coming from one of the following groups:

- Offspring *ctrl*-SC group: maternal exposure to SCD without CPF (n = 16)
- Offspring CPF-SC group: maternal exposure to SCD with CPF (n = 20)
- Offspring *ctrl*-HF group: maternal exposure to HFD without CPF (n = 10)
- Offspring CPF-HF group: maternal exposure to both HFD and CPF (n = 5)

Because of some fertility problems, the number of male pups from the co-exposition group (CPF-HF) was lower than other groups.

The night before sacrifice, animals were fasted. Pups were euthanized with a single intraperitoneal of sodic pentobarbital (EXAGON 140 mg/kg—0.35 mL/kg) (Axience SAS, Pantin, France). Blood was drawn and plasma was obtained by centrifugation (3000g, 15 min), immediately aliquoted and stored at -80°C until further analysis to determine plasma Fluorescein isothiocyanate (FITC)-dextran, cytokines levels and Lipopolysaccharides (LPS) concentrations. Intestinal samples (jejunum, ileum and proximal colon) were collected under sterile conditions. For gene expression study, at harvest, the digestive tissue samples were deeped in a RNA later Stabilization Solution (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France), a non-toxic tissue storage reagent allowing rapid tissue permeation and cellular RNA stabilization and protection. After a short stabilization period, the samples were immediately frozen at -80°C until RNA extraction procedure. Another set of digestive tissue sample was taken in order to proceed to mucins production and histopathological analysis and deeped into a Carnoy's fixative solution.

Evaluation of intestinal permeability modifications in male offspring from mothers submitted to CPF and/or HFD.

FITC Dextran transfer into blood circulation as a marker of paracellular permeability. Intestinal permeability was estimated from the amount of FITC-dextran that had crossed the intestinal epithelial barrier into the blood after oral ingestion. One hundred and fifty minutes before sacrifice, young fasted male rats received orally a solution of 1 mL of FITC Dextran (60 mg/100 g bw). Plasma FITC-dextran levels were estimated in plasma blood by fluorometric determination using GloMax Microplate Reader (Promega, Charbonnières-les-Bains, France). The sample emission spectrum from 480 nm to 600 was recorded upon excitation at 475 nm using a second-derivative spectroscopy which is a useful technique for eliminating background noise and light scattering. The FITC dextran concentration corresponded to the height of the peak detected at 514 nm. To perform this measurement, a calibration curve of FITC dextran ranging from 0.00 to 1.17 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ was realized. Results were expressed as ng/mL plasma circulating FITC.

Gene expression of proteins involved in gut barrier permeability by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Total RNA was isolated from digestive tract samples using the FastGene Basic RNA kit (NIPPON Genetics, Dutscher, Brumath, France). Its concentration was measured spectrophotometrically using a Nanodrop 1000 Spectrophotometer (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France). Complementary DNA (cDNA) was generated by reverse transcription of 1 μg mRNA with the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France) as previously described^{11,27}. Expression of genes coding for tight junctions (TJ) proteins: occludin (*Ocln*), claudin 4 (*Cldn4*) and TJ Protein 1 (*Tjp1*) coding for Zonula occludens protein-1 (*ZO-1*), was measured by quantitative real-time polymerase chain reactions (RT-PCRs) (Supplementary Table S2).

Primers were purchased from Life Technologies (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France) and SYBR Green Master Mix (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France) was used. PCRs were run on a 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA). Reactions were performed in duplicate.

Four genes were tested in the same conditions to keep the most robust housekeeping genes for each intestinal section: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*), hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1 (*Hprt1*), Ubiquitin C (*Ubc*) and beta actin (*Actb*). Expression stability was determined by RefFinder⁴⁶ using the BestKeeper program⁴⁷, Normfinder program⁴⁸ and Genorm program⁴⁹ and the comparative delta-Ct method⁵⁰. mRNA amounts were estimated using the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method ($\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{exposed}} - \text{mean } \Delta\text{Ct}_{\text{control}}$) compared to *Gapdh*, considered as the best housekeeping gene for jejunal and ileal segments, and *Hprt1* for proximal colon, after comparing the results of the 4 programs used.

Evaluation of intestinal innate immune modifications in male offspring from mothers submitted to CPF and/or HFD.

Measure of systemic markers of inflammation. Plasma lipopolysaccharides translocation from intestinal lumen. Plasma LPS is a useful marker for identification of increased intestinal permeability and thus of intestinal injury. Plasma assay was performed with the Rat Lipopolysaccharide ELISA kit according to the manufacturer instructions (#CSB E14247r, CliniSciences, Nanterre, France).

Secretion of pro-inflammatory circulating cytokines. Measurement of plasma concentration of 3 major circulating pro-inflammatory cytokines: Interleukin 1 beta (IL-1 β), Interleukin 6 (IL-6) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) were performed using DuoSet ELISA Kit according to the manufacturer instructions (respectively DY501, DY506, DY510—ELISA Kits; Bio-technie, Lille, France).

Gene expression of proteins involved in innate immune protection. Briefly and as already stated above, cDNA generated from extracted mRNA was amplified according to the conditions described in paragraph 2.3.2. Expression of genes coding for innate immunity proteins: (1) Defensin β 1 (*Defb1*), Defensin β 4 (*Defb4*), Toll Like Receptor 2 (*Tlr2*) and Toll Like Receptor 4 (*Tlr4*) and (2) mucins proteins: Mucin 1 (*Muc1*), Mucin 2 (*Muc2*) and Mucin 3 (*Muc3*) were measured by quantitative real-time polymerase chain reactions (RT-PCRs) (Supplementary Table S2) according to the conditions already mentioned. Reactions were also performed in duplicate.

Histological evaluation of intestinal goblet cells number and mucus secretion alterations. Jejunal, ileal and colonic tissue sections were fixed immediately after sacrifice into a Carnoy solution (60% absolute alcohol, 30% chlo-

reform and 10% acetic acid) for 48 h before being embedded into xylene and then paraffin. Samples were then sliced into 5 μm sections and transferred to glass slides in order to proceed to staining. The Periodic Acid Schiff (PAS) staining was used to highlight the presence of some carbohydrates in the digestive system as described below (mucins, basement membranes, glycogen as well as filaments and mycelial spores) thanks to a specific kit (395B-1KT, Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Photos were taken using a camera attached to the microscope (Olympus DP-10 Digital Camera; Olympus America, New York) and are presented in Supplementary Table S3. Staining quantifications were performed on areas from two fields/slide (100 $\times$ magnification) with the help of the ImageJ software⁵¹. Mucus stain positive areas (PAS positive area) were measured in a blinded manner and mucus secretion area ratio was determined according to a previous study⁵². Results were expressed as the ratio of mucus stain positive area/villus area. The density of goblet cells per villus, expressed as number of goblet cell/mm villus was also measured²⁹. Five measures per animal were made.

Systemic growth and intestinal development from mothers submitted to CPF and/or HFD. *Systemic growth alteration of male offspring.* Male pups were weight throughout the observation study from PND3 to PND54 as above stated. Three important time points were particularly observed: the neonatal time point (PND3), weaning (PND21) and the end of the experiment (PND54) in order to evaluate any alteration of the offspring weight gain depending on their mother exposure to CPF and/or HFD versus non-exposed offspring.

Modification of offspring intestinal and colonic layers thicknesses. On PAS stained 5 μm sections, thickness of the different intestinal layers was measured in both the intestinal and colic segments (jejunum, ileum and proximal colon). We determined the villi area and the thicknesses of the mucosa, submucosa, circular and longitudinal muscle layers. Photos were taken using a camera attached to the microscope (Olympus DP-10 Digital Camera, Olympus America, New York). Measures from two fields/slide (100 $\times$ magnification) and from five measures per animal were also analysed in a blinded manner with the help of the ImageJ software⁵¹. Results were expressed as μm^2 for villi area, and μm for thicknesses of the mucosa, submucosa, circular and longitudinal muscle layers.

Statistical analysis. Data were expressed as mean $\pm$ Standard Error to the Mean (SEM) and were analyzed using GraphPad Prism software (GraphPad Prism version 8.4.3 for Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com) Non-parametric Kruskal–Wallis tests were performed and when the difference was significant, a Dunn's post-hoc test was further realized with $n = 16$ for offspring ctrl-SC group; $n = 20$ for offspring CPF-SC group; $n = 10$ for offspring ctrl-HF group; maternal exposure to HFD without CPF and $n = 5$ for offspring CPF-HF group. A value of $p < 0.05$ was considered significant.

Data availability

The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Received: 14 January 2021; Accepted: 6 May 2021

Published online: 01 June 2021

References

- Pácha, J. Development of intestinal transport function in mammals. *Physiol. Rev.* **80**, 1633–1667 (2000).
- Elliott, E. N. & Kaestner, K. H. Epigenetic regulation of the intestinal epithelium. *Cell Mol. Life Sci.* **72**, 4139–4156 (2015).
- de Zwart, L. L. *et al.* Role of biokinetics in risk assessment of drugs and chemicals in children. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **39**, 282–309 (2004).
- Camilleri, M., Lasch, K. & Zhou, W. Irritable bowel syndrome: Methods, mechanisms, and pathophysiology. The confluence of increased permeability, inflammation, and pain in irritable bowel syndrome. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **303**, G775–G785 (2012).
- Fish, S. A. Organophosphorus cholinesterase inhibitors and fetal development. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **96**, 1148–1154 (1966).
- Slotkin, T. A. Developmental cholinotoxicants: Nicotine and chlorpyrifos. *Environ. Health Perspect.* **107**, 71–80 (1999).
- Hunter, D. L., Lassiter, T. L. & Padilla, S. Gestational exposure to chlorpyrifos: comparative distribution of trichloropyridinol in the fetus and dam. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **158**, 16–23 (1999).
- Akhtar, N., Srivastava, M. K. & Raizada, R. B. Transplacental disposition and teratogenic effects of chlorpyrifos in rats. *J. Toxicol. Sci.* **31**, 521–527 (2006).
- Slotkin, T. A., Oliver, C. A. & Seidler, F. J. Critical periods for the role of oxidative stress in the developmental neurotoxicity of chlorpyrifos and terbutaline, alone or in combination. *Dev. Brain Res.* **157**, 172–180 (2005).
- Darwiche, W. *et al.* Impact of prenatal and postnatal exposure to the pesticide chlorpyrifos on the contraction of rat ileal muscle strips: Involvement of an inducible nitric oxide synthase-dependent pathway. *Neurogastroenterol. Motil.* **29**, e12918 (2017).
- Joly Condette, C., Bach, V., Mayeur, C., Gay-Quéheillard, J. & Khorsi-Cauet, H. Chlorpyrifos exposure during perinatal period affects intestinal microbiota associated with delay of maturation of digestive tract in rats. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **61**, 30–40 (2015).
- Joly Condette, C. *et al.* Increased gut permeability and bacterial translocation after chronic chlorpyrifos exposure in rats. *PLoS One* **9**, e102217 (2014).
- Cook, T. J. & Shenoy, S. S. Intestinal permeability of chlorpyrifos using the single-pass intestinal perfusion method in the rat. *Toxicology* **184**, 125–133 (2003).
- Tirelli, V. *et al.* Effects of the pesticide clorpyrifos on an in vitro model of intestinal barrier. *Toxicol. In Vitro* **21**, 308–313 (2007).
- Barker, D. J. P. The developmental origins of adult disease. *Eur. J. Epidemiol.* **18**, 733–736 (2003).
- Buckley, A. J. *et al.* Altered body composition and metabolism in the male offspring of high fat-fed rats. *Metab. Clin. Exp.* **54**, 500–507 (2005).
- Shankar, K. *et al.* Maternal obesity at conception programs obesity in the offspring. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **294**, R528–R538 (2008).

18. Howie, G. J., Sloboda, D. M., Kamal, T. & Vickers, M. H. Maternal nutritional history predicts obesity in adult offspring independent of postnatal diet. *J. Physiol.* **587**, 905–915 (2009).
19. Mischke, M. & Plösch, T. More than just a gut instinct—The potential interplay between a baby's nutrition, its gut microbiome, and the epigenome. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **304**, R1065–R1069 (2013).
20. Mattsson, J. L., Maurissen, J. P. J., Nolan, R. J. & Brzak, K. A. Lack of differential sensitivity to cholinesterase inhibition in fetuses and neonates compared to dams treated perinatally with chlorpyrifos. *Toxicol. Sci.* **53**, 438–446 (2000).
21. EFSA. Statement on the available outcomes of the human health assessment in the context of the pesticides peer review of the active substance chlorpyrifos. *EFSA J.* **17**, e05809 (2019).
22. McDonnell-Dowling, K., Kleefeld, S. & Kelly, J. P. Consequences of oral gavage during gestation and lactation on rat dams and the neurodevelopment and behavior of their offspring. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* **56**, 79–83 (2017).
23. Purcell, R. H. *et al.* Maternal stress and high-fat diet effect on maternal behavior, milk composition, and pup ingestive behavior. *Physiol. Behav.* **104**, 474–479 (2011).
24. Sengupta, P. The laboratory rat: Relating its age with human's. *Int. J. Prev. Med.* **4**, 624–630 (2013).
25. Andreollo, N. A., dos Santos, E. F., Araújo, M. R. & Lopes, L. R. Rat's age versus human's age: What is the relationship?. *ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)* **25**, 49–51 (2012).
26. Kondakala, S., Lee, J. H., Ross, M. K. & Howell, G. E. Effects of acute exposure to chlorpyrifos on cholinergic and non-cholinergic targets in normal and high-fat fed male C57BL/6J mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **337**, 67–75 (2017).
27. El Khayat El Sabbouri, H. *et al.* Does the perigestational exposure to chlorpyrifos and/or high-fat diet affect respiratory parameters and diaphragmatic muscle contractility in young rats?. *Food Chem. Toxicol.* **140**, 111322 (2020).
28. Pickett, M. A., Dush, M. K. & Nascone-Yoder, N. M. Acetylcholinesterase plays a non-neuronal, non-esterase role in organogenesis. *Development* **144**, 2764–2770 (2017).
29. Xue, Y., Wang, H., Du, M. & Zhu, M.-J. Maternal obesity induces gut inflammation and impairs gut epithelial barrier function in non-obese diabetic (NOD) mice. *J. Nutr. Biochem.* **25**, 758–764 (2014).
30. Hohos, N. M. & Skaznik-Wikiel, M. E. High-fat diet and female fertility. *Endocrinology* **158**, 2407–2419 (2017).
31. Li, J., Pang, G., Ren, F. & Fang, B. Chlorpyrifos-induced reproductive toxicity in rats could be partly relieved under high-fat diet. *Chemosphere* **229**, 94–102 (2019).
32. Allen, A., Hutton, D. A. & Pearson, J. P. The MUC2 gene product: A human intestinal mucin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **30**, 797–801 (1998).
33. Bottani, M., Cornaghi, L., Donetti, E. & Ferraretto, A. Excess of nutrient-induced morphofunctional adaptation and inflammation degree in a Caco2/HT-29 in vitro intestinal co-culture. *Nutrition* **58**, 156–166 (2019).
34. Howell, G. E., Kondakala, S., Holdridge, J., Lee, J. H. & Ross, M. K. Inhibition of cholinergic and non-cholinergic targets following subacute exposure to chlorpyrifos in normal and high fat fed male C57BL/6J mice. *Food Chem. Toxicol.* **118**, 821–829 (2018).
35. Buratti, F. M., Volpe, M. T., Meneguz, A., Vittozzi, L. & Testai, E. CYP-specific bioactivation of four organophosphorothioate pesticides by human liver microsomes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **186**, 143–154 (2003).
36. Adigun, A. A., Wrench, N., Levin, E. D., Seidler, F. J. & Slotkin, T. A. Neonatal parathion exposure and interactions with a high-fat diet in adulthood: Adenylyl cyclase-mediated cell signaling in heart, liver and cerebellum. *Brain Res. Bull.* **81**, 605–612 (2010).
37. Zhou, Z. *et al.* Progesterone decreases gut permeability through upregulating occludin expression in primary human gut tissues and Caco-2 cells. *Sci. Rep.* **9**, 8367–8379 (2019).
38. Hug, H., Mohajeri, M. H. & La Fata, G. Toll-like receptors: Regulators of the immune response in the human gut. *Nutrients* **10**, 203 (2018).
39. Janssens, S. & Beyaert, R. Role of toll-like receptors in pathogen recognition. *Clin. Microbiol. Rev.* **16**, 637–646 (2003).
40. Hausmann, M. *et al.* Toll-like receptors 2 and 4 are up-regulated during intestinal inflammation. *Gastroenterology* **122**, 1987–2000 (2002).
41. Wang, N. *et al.* Expression and activity of the TLR4/NF- κ B signaling pathway in mouse intestine following administration of a short-term high-fat diet. *Exp. Ther. Med.* **6**, 635–640 (2013).
42. Kim, K.-A., Gu, W., Lee, I.-A., Joh, E.-H. & Kim, D.-H. High fat diet-induced gut microbiota exacerbates inflammation and obesity in mice via the TLR4 signaling pathway. *PLoS One* **7**, e47713 (2012).
43. Garcia-Hernandez, V., Quiros, M. & Nusrat, A. Intestinal epithelial claudins: Expression and regulation in homeostasis and inflammation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1397**, 66–79 (2017).
44. Lecoutre, S. *et al.* Depot- and sex-specific effects of maternal obesity in offspring's adipose tissue. *J. Endocrinol.* **230**, 39–53 (2016).
45. Almeida-Suhett, C. P., Scott, J. M., Graham, A., Chen, Y. & Deuster, P. A. Control diet in a high-fat diet study in mice: Regular chow and purified low-fat diet have similar effects on phenotypic, metabolic, and behavioral outcomes. *Nutr. Neurosci.* **22**, 19–28 (2019).
46. Xie, F., Xiao, P., Chen, D., Xu, L. & Zhang, B. miRDeepFinder: A miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant Mol. Biol.* **80**, 75–84 (2012).
47. Pfaffl, M. W., Tichopad, A., Prgomet, C. & Neuvians, T. P. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper—Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol. Lett.* **26**, 509–515 (2004).
48. Andersen, C. L., Jensen, J. L. & Ørntoft, T. F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* **64**, 5245–5250 (2004).
49. Vandesompele, J. *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* **3**, research0034 (2002).
50. Silver, N., Best, S., Jiang, J. & Thein, S. L. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC Mol. Biol.* **7**, 33 (2006).
51. Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* **9**, 671–675 (2012).
52. Elderman, M. *et al.* The effect of age on the intestinal mucus thickness, microbiota composition and immunity in relation to sex in mice. *PLoS One* **12**, e0184274 (2017).

Acknowledgements

The authors thank J. Le Ber and her team from the animal facility for their help in animals' monitoring and Aurelie Corona for the technical assistance in the realization of the study.

Author contributions

M.G.: Data curation; investigation; formal analysis; visualization; methodology; roles/writing—original draft; writing—review & editing; H.K.S.: Investigation; methodology; N.D.: Investigation; methodology; H.K.C.: Methodology; supervision; V.B.: Supervision; P.M.A.: Validation; supervision; roles/writing—original draft; writing—review & editing; J.G.Q.: Conceptualization; visualization; funding acquisition; methodology; project administration; supervision; validation; roles/writing—original draft; writing—review & editing. All authors reviewed the manuscript.

Funding

This work was supported by the University of Picardie Jules Verne and Hauts de France County and by the PROGHOMEO Grant 2017 from the Hospital-University Federative Project “1000 Days for Health”.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90981-2>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to J.G.-Q.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2021

**ETUDE 3 : L'EVALUATION DE
CONTAMINANTS ALIMENTAIRES PAR UN
MODELE DE CO-CULTURE EPITHELIALE
INTESTINALE**

Au cours des études précédentes, nous avons évalué l'incidence d'une exposition maternelle au CPF et ses conséquences sur la barrière intestinale d'une part et les perturbations métaboliques que cela pouvait entraîner d'autre part. Dans l'étude présentée ci-après, nous avons cherché à comprendre les mécanismes cellulaires associées à l'exposition de l'épithélium intestinal à des contaminants alimentaires à l'aide d'un modèle de co-culture. Nous avons d'une part étudié l'impact de doses résiduelles de CPF, et, d'autre part, les conséquences d'une exposition à une glycotoxine, la N^ε-carboxyméthyllysine (CML) en comparant ses effets à une glycotoxine de référence, l'acrylamide (CH₂CHCONH₂). Ces glycotoxines appartiennent aux produits avancés de la réaction de Maillard (AGEs) apparaissant suite à la glycation non enzymatique d'un sucre réducteur avec certains acides aminés (dont lysine et asparagine) au cours de la cuisson des aliments. L'effet cancérigène de l'acrylamide n'est plus à démontrer (Zuckerman 1995) alors que celui de la CML reste encore à explorer.

Après avoir déterminé les ratios de la co-culture Caco-2/TC7 & HT29-MTX, une mono-culture Caco-2/TC7 ainsi que la co-culture ont été soumises à un stimulus inflammatoire afin de vérifier que notre modèle répondait à un signe inflammatoire classique, à différents temps d'exposition. Suite à cela, les co-cultures ont été exposées à des contaminants alimentaires (acrylamide, CML et/ou CPF) et différents paramètres ont été mesurés afin d'étudier les altérations de la perméabilité intestinale, et les mécanismes d'action de l'induction potentielle d'une inflammation digestive.

Après 6h d'exposition au CPF (300 μM), la perméabilité paracellulaire de la co-culture n'a pas été modifiée. Le CPF a seulement augmenté l'expression de TJP1 et VIL1. Selon la littérature, l'inhibition des voies MAPK stimule l'assemblage des protéines des jonctions serrées (Chen *et al.* 2000), et l'activation de la MAP kinase ERK1/2 augmente la perméabilité paracellulaire et induit une rupture des jonctions serrées (Wang *et al.* 2004). Cependant, nous n'avons pas observé l'activation des voies de signalisation pro-inflammatoires MAPK dans notre modèle de co-culture. De plus, l'absence d'activation des gènes codant pour les caspases 3 et 9 semble indiquer que les voies apoptotiques mitochondriales ne soient pas encore stimulées après 6 h d'exposition aux contaminants.

Dans ce travail, nous avons également évalué les effets de l'acrylamide (5 mM) et de la CML (300 μ M) sur la co-culture. Alors que l'expression de l'ARNm de MUC3 était plus élevée après la stimulation de la CML, celle de MUC5AC était réduite à la fois par l'exposition à la CML et à l'acrylamide. Cela suggère que la composition du mucus peut être légèrement modifiée par la CML et dans une moindre mesure par l'acrylamide. Cependant, ni l'une ni l'autre n'a augmenté la perméabilité intestinale, alors que nous avons observé une diminution de l'expression de l'ARNm de TJP1 et VIL1 sous CML. Pour autant, nous avons observé une expression élevée du gène codant pour la CXCL8 après stimulation de la CML accompagnée d'une surexpression des gènes codant pour MEKK1 (MAP3K1), JNK1 (MAPK8) et p38- α (MAPK14). Cette étude indique également que l'acrylamide agit différemment de la CML sur l'épithélium intestinal puisque ni les voies NF- κ B ni les voies MAPK n'ont été activées par cette stimulation. Concernant les voies apoptotiques, la stimulation du modèle épithélial pendant 6 h aurait tendance à stimuler l'expression du gène CASP3 en présence d'acrylamide et de la CML mais pas les voies de la CASP9 ni les voies ERK.

Enfin, la co-exposition de la co-culture au CPF et à la CML n'a pas entraîné d'aggravation des signaux pro-inflammatoires. Cependant, les effets observés sous la CML ont été inhibés lors de la co-stimulation avec le CPF alors que nous nous attendions à des effets similaires à ceux observés avec la CML seule. Nous pouvons alors supposer que les effets du CPF et de la CML peuvent se produire via des voies antagonistes. Cela est particulièrement intéressant car les effets cocktails de substances toxiques induisent des réponses différentes de celles administrées séparément.

En conclusion, l'utilisation d'une co-culture Caco-2/TC7 avec HT29-MTX est un modèle adapté pour évaluer la réponse pro-inflammatoire de contaminants alimentaires. L'exposition au CPF ne semble affecter que l'expression des protéines des jonctions serrées, sans altérer ni la perméabilité intestinale paracellulaire, ni induire de réponse inflammatoire. L'exposition pendant 6h à des AGEs, tels que la CML et l'acrylamide diminuent l'expression des gènes des mucines, mais n'affectent pas la perméabilité intestinale paracellulaire. L'exposition à la CML semble activer certaines voies de signalisation intracellulaires inflammatoires. Cette étude peut nous permettre de mieux comprendre les effets de ces contaminants alimentaires sur la muqueuse intestinale humaine.

*Copie de l'article accepté en Mai 2021 pour publication
dans le journal Toxics (IF : 3.271).*

Food contaminants effects on *in vitro* model of human intestinal epithelium

Marion Guibourdenche ^{a,b}, Johanna Haug ^{a,b}, Noëllie Chevalier ^b, Madeleine Spatz ^b
Nicolas Barbezier ^b, Jérôme Gay-Quéheillard ^a, Pauline M Anton ^{b,*}.

^a PériTox. Périnatalité & Risques Toxiques, UMR-I 01 INERIS, Université Picardie Jules Verne. Amiens. France

^b Institut Polytechnique UniLaSalle, Université d'Artois, ULR 7519, 19 rue Pierre Waguet, BP 30313, 60026 Beauvais, France

* Corresponding author : Dr. Pauline M Anton pauline.anton@unilasalle.fr Institut Polytechnique UniLaSalle, Université d'Artois, ULR 7519, 19 rue Pierre Waguet, BP 30313, 60026 Beauvais, France

Declarations of interest: none



Article

Food contaminants effects on an *in vitro* model of human intestinal epithelium

Marion Guibourdenche ^{1,2}, Johanna Haug ², Noëllie Chevalier ², Madeleine Spatz ², Nicolas Barbezier ², Jérôme Gay-Quéheillard ¹, and Pauline M Anton ^{2,*}

¹ PériTox. Périnatalité & Risques Toxiques, UMR-I 01 INERIS, Université Picardie Jules Verne, Amiens, France

² Institut Polytechnique UniLaSalle-Université d'Artois, ULR 7519, Beauvais, France

* Correspondence: pauline.anton@unilasalle.fr; Tel.: +33 3.44.06.38.68 Institut Polytechnique UniLaSalle - 19 rue Pierre Waguët, BP 30313, 60026 Beauvais, France

Citation: Guibourdenche, M.; Haug, J.; Chevalier, N.; Spatz, M.; Barbezier, N.; Gay-Quéheillard, J.; Anton, P.M. Food contaminants effects on an *in vitro* model of human intestinal epithelium. *Toxics* **2021**, *9*, x. <https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Academic Editor: Firstname
Lastname

Received: date
Accepted: date
Published: date

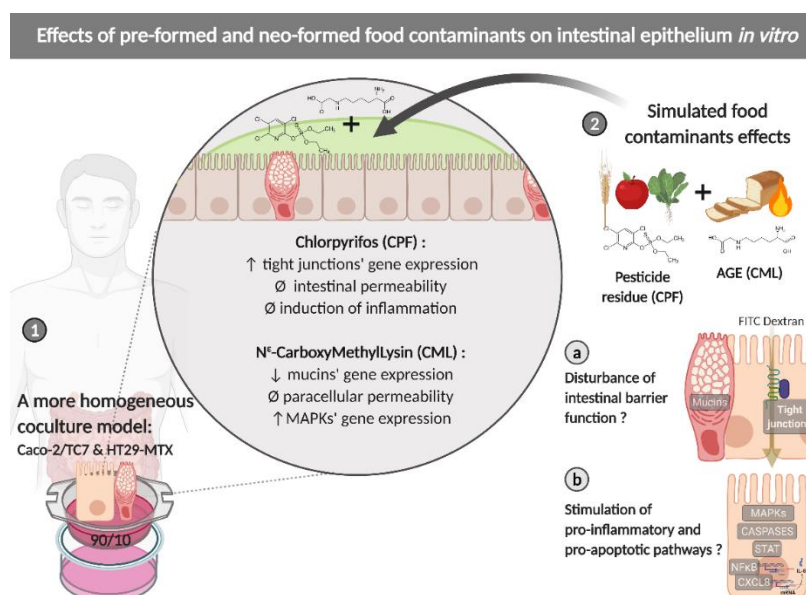
Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Pesticides residues represent an important category of food contaminants. Furthermore, during food process, some advanced glycation end-products resulting from the Maillard Reaction can be formed. They may have adverse health effects, in particular on the digestive tract function, alone and combined. We sought to validate an *in vitro* model of human intestinal barrier to mimic the effects of these food contaminants on the epithelium. A co-culture of Caco-2/TC7 cells & HT29-MTX has been stimulated for 6h with chlorpyrifos (300µM), acrylamide (5mM), N^ε(6)-Carboxymethyllysine (300µM) alone or in cocktail a mix of pro-inflammatory cytokines. Effects of those contaminants on the integrity of gut barrier and the inflammatory response were analyzed. Since the co-culture was responding to an inflammatory stimulation, we investigated if this model could be used to evaluate the consequence of food contaminants on the human intestinal epithelium. CPF alone affected tight junctions' gene expression, without inducing any inflammation or alteration of intestinal permeability. CML and acrylamide decreased mucins gene expression in the intestinal mucosa, but did not affect paracellular intestinal permeability. CML exposure activated the gene expression of MAPK pathways. The co-culture response was stable over time. This cocktail of food contaminants may thus alter the gut barrier function.

Keywords: Intestinal barrier; Caco-2/TC7; HT29-MTX; Chlorpyrifos; AGEs; Food contaminants.



Graphical abstract

1. Introduction

For years now, agricultural practice and increased consumption of processed foods have exposed Humans to a larger range of food contaminants which threaten the health and safety of consumers[1]. Indeed, on top of pesticides residues which are among the most common food contaminants, food processing, and particularly heat treatment, is at the origin of a non-enzymatic glycation reaction also called the Maillard reaction. This reaction generates a large bunch of compounds contributing to the odor, flavor and color of the food matrix [2] but also many others which may be considered as life threatening. One of the main challenges is to understand the consequences of the exposure to many food contaminants on our health and, more especially, to evaluate their impact on the digestive tract, the main route of exposure to food contaminants. The use of *in vitro* models to evaluate such effects is of prime importance to get objective information on their fate on our health.

Among pesticides, Chlorpyrifos (CPF) is an organophosphorus insecticide, still used worldwide in agriculture to protect fruits and vegetables crops and known to interfere with the intestinal function. In a previous work, we certainly showed that perinatal exposure to CPF alters the intestinal barrier function (tight junctions and mucus) [3–6]. Furthermore, CPF increases paracellular permeability on the human intestinal Caco-2 cell line, possibly through the transient modification of tight junction proteins structure [7]. As for Maillard Reaction which generally occurs between reduced sugars and some amino acids [8], it leads to the production of several compounds among which advanced glycation end products (AGEs). While their adverse effects on health is often suggested [9], it still remains difficult to confirm it [8]. For instance, the consumption of AGEs such as N^ε(6)-Carboxymethyllysine (CML) or of acrylamide has negative impacts on human health. Indeed, their increased presence in human tissues is correlated with oxidative stress, inflammation, and insulin resistance [10] and AGEs are involved in the development and progression of type 2 diabetes [11]. These food compounds may induce an intestinal inflammation and alter the mucosal barrier and the intestinal permeability but that has been hardly

documented and little is known on the effect of concomitant exposure to the two families of food contaminants on the intestinal barrier and on the cellular mechanisms they may alter.

Models of *in vitro* human intestinal epithelium have been described in the literature to evaluate the toxicity and the bioavailability of substances [12,13] based on a mix of adequate cell lines. Caco-2 is an immortalized cell line of human colorectal adenocarcinoma commonly used to evaluate the modification of epithelial permeability following exposure to specific compounds. Those cells have the ability to differentiate spontaneously to enterocytes [14]. Nevertheless, since, as for many tumor cell lines, their response tends to become heterogeneous after repeating passages [15]. This has prompted scientists to generate clones such as the TC7 one. This clone is known to better reproduce the functionality of intestinal cells *in vivo* with a more homogenous response over time [16]. Furthermore, to fully mimic the intestinal epithelial lining, there is a need of mixing enterocytes cells with goblet cells. The HT29-MTX cells are derived from HT29 cells fully differentiated into goblet cells [17]. As thus, the co-culture of Caco-2 and HT29-MTX cells may constitute an interesting model to investigate intestinal epithelial functions [18,19] if the response remains stable over time and cells replication.

We aimed to use a Caco-2/TC7 and HT29-MTX co-culture model [20] to characterize, on a more homogeneous fashion, the effects of a cocktail of food contaminants (pesticides residues and AGEs), on the intestinal epithelium. We evaluated the putative effects of those molecules on gut permeability and barrier function (mucins and tight junction proteins expressions) and on two of the key intracellular signaling pathways involved in gut homeostasis: JAK/STAT and MAPKs [21][22][23].

2. Materials and Methods

2.1. Cell culture conditions

The Caco-2 cells/TC7clone expresses an intestinal epithelial phenotype when fully differentiated; it was used between passage 70 and 83. The human colorectal adenocarcinoma cell line HT29-MTX cell line (European Collection of Authenticated Cell Cultures) was used between passage 85 and 93. This cell line expresses an intestinal goblet cell phenotype when fully differentiated. Cells were grown alone as a mono-culture (Caco-2/TC7) or as a co-culture (Caco-2/TC7 & HT29-MTX) to mimic the intestinal epithelial lining. The two cell lines were routinely grown in an atmosphere of 5% carbon dioxide at 37°C in DMEM GlutaMAX added with 10% (v/v) heat-inactivated Fetal Bovine Serum (FBS), 1% (v/v) Non-Essential Amino Acids and 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin (Fisher Scientific SAS, Illkirch, France). The medium was changed every other day. Cells were split below confluency using a trypsin solution (0.25% Trypsin EDTA - Thermofisher Scientific, Illkirch, France).

2.2. *Pro-inflammatory cytokines stimulation of the Caco2/TC7 & HT29/MTX co-culture*

2.2.1. Comparison of the mono-culture and the co-culture sensitivity to pro-inflammatory cytokines

Caco-2/TC7 (mono-culture) or Caco-2/TC7 & HT29-MTX (co-culture) were seeded on 6-well polycarbonate membrane cell culture inserts with HD 0.4 μm pore at a density of 4×10^5 cells (Corning, Dutscher, Issy-les-Moulineaux, France). Culture medium was distributed on the insert (1 mL) and in the well (2 mL) supporting the insert. This set of experiments was realized in order to assess the modification of the response of the co-culture to the induction of an inflammatory response observed with the mono-culture. Indeed, Caco-2 cells are known to be able to produce inflammatory mediators in response to pro-inflammatory stimuli [24], and particularly the TC7 clone [25]. Cells were grown 21 days to reach full differentiation. Culture medium was changed every other day. The day before the stimulation, cells were rinsed with phosphate buffered saline (PBS) and put into a serum-free medium. After 24h in the depleted medium, cells were stimulated with a cocktail of pro-inflammatory cytokines: TNF- α (20 ng/mL), IL-1 β (1 ng/mL) and IFN- γ (10 ng/mL) (BioTechne, Lille, France) during 2, 6 or 24h for the mono-culture and during 6 hours for the co-culture, the exposure timepoint for which we had the best stimulation of the mono-culture.

At the end of the stimulation, insert's medium (called below "apical medium"), well medium (called below "basal medium") were harvested and stored at - 80°C until further measurement of markers of intestinal inflammation and permeability. The cell layers were harvested in TriZOL and processed immediately.

2.2.1.1. Modulation by the cocktail of cytokines of the expression of genes coding for proteins of the pro-inflammatory and pro-apoptotic pathways

To confirm the pro-inflammatory stimulation of the mono and the co-culture by the cocktail of pro-inflammatory cytokines, we first measured the modification of the expression of genes involved: 1) in the pro-inflammatory signaling pathways: C-X-C motif chemokine ligand 8 (CXCL8) coding for IL-8, mitogen-activated protein kinase 14 (MAPK14) coding for p38- α , mitogen-activated protein kinase 8 (MAPK8) coding for JNK1, mitogen-activated protein kinase-kinase-kinase 1 (MAP3K1) coding for MEKK1, signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), nuclear factor-kappa B (NF- κ B), tumor necrosis factors α (TNF- α), myeloid differentiation primary myeloid response 88 (MyD88), and 2) in the pro-apoptotic pathways: Caspase 3 and Caspase 9 (CASP3 and 9).

Total RNA was isolated from cells using TriZOL (Fisher Scientific SAS, Illkirch, France) and RNA concentration was measured spectrophotometrically (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, Illkirch, France). cDNA was obtained from 1 μg RNA using the QuantiTect Reverse Transcription Kit following the manufacturer's instructions (Qiagen, Courtaboeuf, France). Absorbance ratios at 260/280 nm and at 260/230 nm were measured by spectrophotometry to assess the purity of the DNA samples.

Primers and SYBR Green PCR master mix were respectively purchased from Eurofins Scientific France (Nantes, France) and Qiagen (Courtaboeuf, France) (Table 1). QPCRs were run on a StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystem, Foster City, USA) and the data were processed with the OneStepPlus software. Reactions were performed in duplicate. Levels of amplified cDNA were quantified using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method ($\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{exposed}} - \text{mean } \Delta Ct_{\text{control}}$) compared to Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) considered as the best housekeeping gene from two different genes tested (*GAPDH* vs. *PPIA*).

Table 1 - List of primers used in the study

function	Gene	Name	Sequences 5'→3' or reference
HOUSEKEEPING GENE	<i>GAPDH</i>	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase	GTCAACGCTGAGAACGGGAA AAA TGAGCCCCAGCCTTCTC (Eurofins)
	<i>PPIA</i>	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	CCTATCCTAGAGGTGGCGGA TCATCGCAGAAGGAACCAGAC (Eurofins)
INFLAMMATORY	<i>CXCL8</i>	C-X-C Motif Chemokine Ligand 8	AGAGTGATTGAGAGTGGACC ACTTCTCCACAACCCTCTG (Eurofins)
	<i>MAPK14</i>	Mitogen-activated protein kinase 14, also called p38- α	QT00079345 (QIAGEN)
	<i>MAPK8</i>	Mitogen-Activated Protein Kinase 8	QT00091056 (QIAGEN)
	<i>MAP3K1</i>	Mitogen-activated protein kinase-kinase-kinase 1	QT00088998 (QIAGEN)
	<i>MyD88</i>	Myeloid 88	QT00203490 (QIAGEN)
	<i>NF-κB</i>	nuclear factor-kappa B	GGGGGCATCAACCTGAAGA GGAGAGAAGTCCCCAAAGGC (Eurofins)

	<i>STAT3</i>	Signal transducer and activator of transcription 3	QT00068754 (QIAGEN)
	<i>TNF-α</i>	tumor necrosis factors α	QT00029162 (QIAGEN)
APOPTOSIS	<i>CASP3</i>	Caspase 3	QT00997997 (QIAGEN)
	<i>CASP9</i>	Caspase 9	QT00036267(QIAGEN)
MICROVILLI	<i>VIL1</i>	Villin 1	AAGAAAGCCAATGAGCAGGAGAAG TTCTCAATGCGCCACACCTG (Eurofins)
TIGHT JUNCTIONS	<i>CLDN4</i>	Claudin 4	GGCGTGGTGTCTCTGTTG AGCGGATTGTAGAAGTCTTGG (Eurofins)
	<i>TJP1</i>	Tight Junction Protein 1	GAATGATGGTTGGTATGGTGCG TCAGAAGTGTGTCTACTGTCCG (Eurofins)
	<i>OCLN</i>	Occludin	QT00081844 (QIAGEN)
MUCINS	<i>MUC3</i>	Mucin 3	QT02309335 (QIAGEN)
	<i>MUC5AC</i>	Mucin 5AC	QT00088991 (QIAGEN)

2.2.1.2. Chemokine secretion following a cell stimulation

The level of IL-8 secretion in both the basal and the apical medium of mono- and co-culture after the stimulation with the cocktail of cytokines. Measurement of IL-8 in the media harvested at the end of stimulation was performed using an ELISA kit according to the manufacturer instructions (Human IL-8/CXCL8 DuoSet ELISA, #DY208, BioTechne, Lille, France) [26].

2.3. Effects of food contaminants on the co-culture model

The evaluation of the effects of contaminants in the co-culture of Caco-2/TC7 & HT29-MTX was realized as described previously. On a preliminary study, Caco-2/TC7 were stimulated with: i) Chlorpyrifos-ethyl (CPF) (O, O-diethyl-O- (3,5,6-trichloro-2-pyridinyl) phosphorothioate solution (LGC Standards Laboratories, Molsheim, France) at concentrations of 100 and 300 μ M in 1% methanol [7], ii) vehicle

alone, iii) N^ε(6)-Carboxymethyllysine (CML) in culture medium (PolyPeptide Laboratories France SAS, Strasbourg, France) at concentrations of 100 μ M and 300 μ M [27] or with iv) acrylamide in culture medium (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France) at concentrations of 1 and 5 mM [24]. Based on a preliminary set of experiments, only cells grown on inserts and stimulated for 6h with 5 mM of acrylamide, 300 μ M of CML or 300 μ M of CPF were further processed.

2.3.1. Viability of Caco2/TC7 mono-culture after exposure to food contaminants

The absence of cell death following the exposure to food contaminants was evaluated by comparing cell counts of viable Caco-2/TC7 cells (100 μ L of cell suspension) unstimulated and stimulated with the contaminants using flow cytometry (MACS Quant Analyzer, Miltenyi Biotec, Köln, Germany).

2.3.2. Assessment of the alteration of the barrier function by the food contaminants

2.3.2.1. Effects of the food contaminants on the paracellular permeability

Alteration of paracellular epithelial permeability was assessed by measuring the flux of the Fluorescein isothiocyanate (FITC)-dextran 4kDa (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France) from the apical to basal medium. FITC-Dextran was put in the apical medium (333.3 μ g/ μ L - 10 μ L/well) at the beginning of the stimulation [28]. Presence of FITC-dextran was quantified in duplicates from 100 μ L of the apical medium (1:50) and of the basal medium (1:1) at the end of the stimulation using a fluorimeter (SpectraMax M2, Molecular Devices, San Jose, USA). Sample emission spectrum (528 nm) was recorded upon excitation (485 nm) using a second-derivative spectroscopy to eliminate background noise and light scattering. Results were expressed as μ g/ μ L.

2.3.2.2. Effects of the food contaminants on the expression of genes coding for tight junctions and mucins

We also evaluated the alteration of the epithelial lining by measuring the expression of genes coding for 1) tight junction's and microvilli proteins: Occludin (*OCN*), Claudin 4 (*CLDN4*), Tight junction protein 1 (*TJP1*) and Villin 1 (*VIL1*) and 2) mucins: mucin 3 (*MUC3*) and mucin 5AC (*MUC5AC*). Briefly and as already stated above, cDNA generated from extracted RNA was amplified according to the conditions described above. Samples were measured in duplicate by qPCR using primers described in Table 1 as already mentioned.

2.3.3. Modulation of pro-inflammatory and pro-apoptotic signaling pathways by the food contaminants

The variation of expression of genes involved in 1) pro-inflammatory signaling pathways: *CXCL8*, *MAPK14*, *MAPK8*, *MAP3K1*, *STAT3*, *NF- κ B*, *TNF- α* , *MyD88*, and 2) pro-apoptotic pathways: *CASP3* and *CASP9* was evaluated by qPCR as described above and secretion of IL-8 cytokine by

epithelial cells was quantified using the human IL-8/CXCL8 DuoSet ELISA in response to a 6-hour CPF, CML or acrylamide stimulation. Measures were performed in duplicates.

2.4. Statistical analyses

Data were expressed as the mean $\pm$ Standard Error of the Mean (SEM) and were analyzed using the GraphPad Prism software (GraphPad Prism version 8.4.3 for Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com). The Student's test was performed for comparisons of mono-culture and co-culture sensitivity to pro-inflammatory cytokines stimulation. A parametric One-way ANOVA analysis of variance was performed and, when the difference was statistically significant, a Bonferroni *post-hoc* test was then applied for analyzing the effects of food contaminants on this *in vitro* model of human intestinal epithelium. The threshold for statistical significance was set to $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Pro-inflammatory cytokines stimulation of the mono-and the co-culture

3.1.1. Comparison of the mono and co-culture sensitivity to pro-inflammatory cytokines

Incubation for 2 and 6h of the Caco-2/TC7 mono-culture with pro-inflammatory cytokines was associated with a significantly ($p = 0.0021$ and $p < 0.0001$ respectively) greater expression of the *NF- κ B* gene (5-fold and 8-fold respectively) in comparison to the non-stimulated cells (CTL) (Figure 1a). Furthermore, *CXCL8* mRNA expression after 2, 6 and 24h of stimulation was also significantly ($p = 0.0003$, $p < 0.0001$ and $p = 0.0005$ respectively) higher (210, 180 and 29-fold respectively) (Figure 1b). IL-8 protein secretion was significantly ($p = 0.0012$, $p < 0.0001$ and $p < 0.0001$) greater in the apical medium after 2h ($1004 \text{ ng/mL} \pm 211 \text{ ng/mL}$ *vs.* $63 \text{ ng/mL} \pm 8 \text{ ng/mL}$; 16-fold), after 6h ($1713 \text{ ng/mL} \pm 41 \text{ ng/mL}$ *vs.* $45 \text{ ng/mL} \pm 5 \text{ ng/mL}$ in CTL; 38-fold) and after 24h ($2468 \pm 47 \text{ ng/mL}$ *vs.* $152 \text{ ng/mL} \pm 17 \text{ ng/mL}$ in CTL; 16-fold) and also in the basal medium ($p = 0.0287$ and $p = 0.0014$ respectively) after 2h ($434 \text{ ng/mL} \pm 159 \text{ ng/mL}$ *vs.* $27 \text{ ng/mL} \pm 1 \text{ ng/mL}$ in CTL; 12-fold) and after 24h ($522 \text{ ng/mL} \pm 110 \text{ ng/mL}$ *vs.* $43 \text{ ng/mL} \pm 3 \text{ ng/mL}$ in CTL; 16-fold) (Figures 1c and 1d respectively).

Incubation of the Caco-2/TC7 & HT29-MTX co-culture for 6h with the pro-inflammatory cytokines resulted in a statistically significant overexpression ($p < 0.0001$ and 34-fold; $p < 0.0001$ and 4-fold respectively) of *NF- κ B* and *CXCL8* mRNA in comparison to the non-stimulated cells (CTL) (Figure 1e and 1f). Moreover, IL-8 protein secretion after 6h of stimulation was also significantly ($p < 0.0001$ and $p = 0.0003$ respectively) greater in apical ($421 \text{ pg/mL} \pm 42 \text{ pg/mL}$ *vs.* $12 \text{ pg/mL} \pm 1 \text{ pg/mL}$ in CTL; 35-fold) and basal ($17 \text{ pg/mL} \pm 2 \text{ pg/mL}$ *vs.* $4 \text{ pg/mL} \pm 0.8 \text{ pg/mL}$ in CTL; 4.5-fold) media (Figures 1g and 1h respectively).

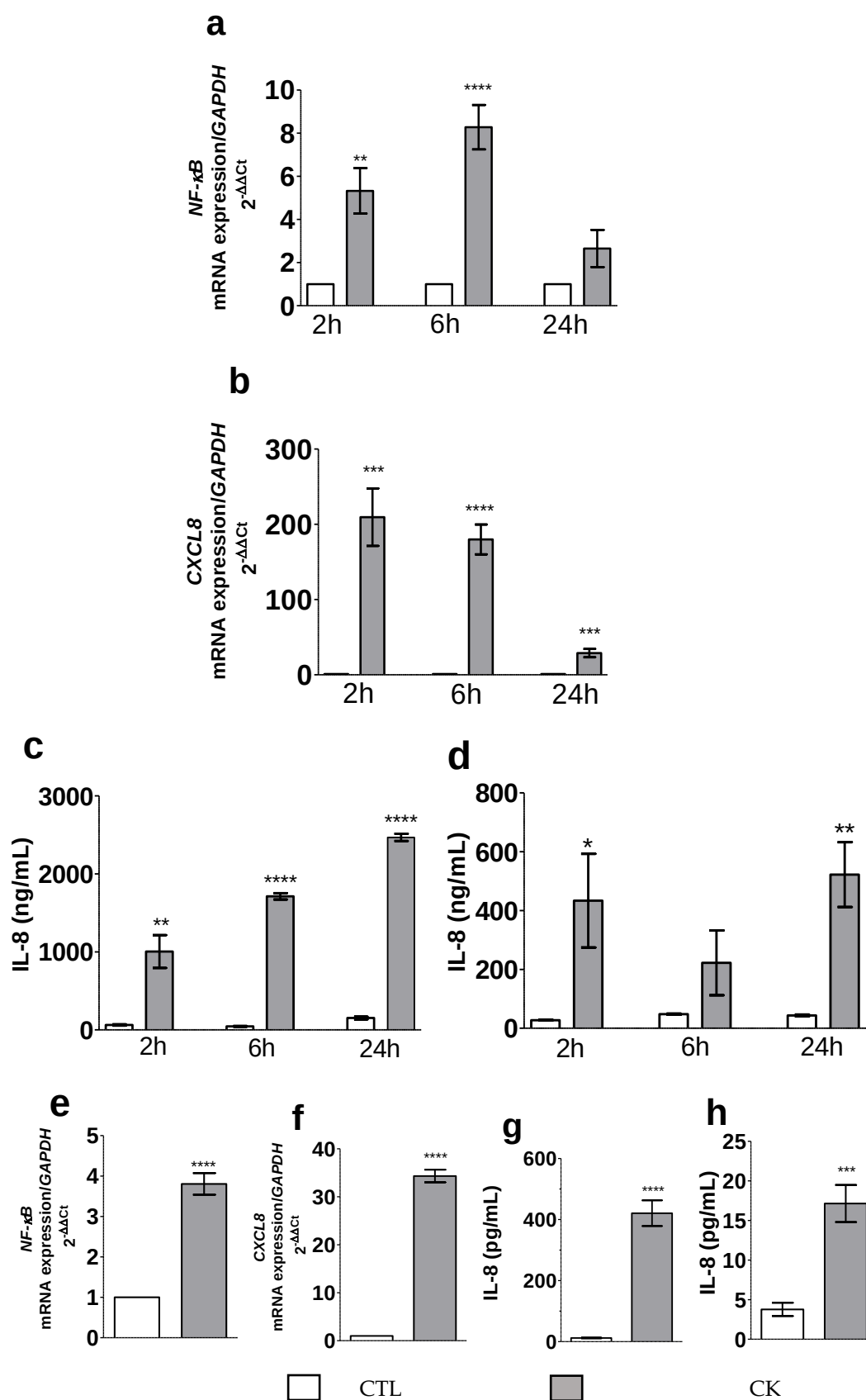


Figure 1: Kinetics (2h, 6h or 24h of incubation with the cocktail of pro-inflammatory cytokines - CK) of expression of *NF-κB* mRNA (a) and of *CXCL8* mRNA (b) measured by qPCR and of IL-8 secretion measured by ELISA in the apical (c) and basal (d) media from the *Caco-2/TC7* mono-

culture. Effect of a 6h-incubation with the cocktail of pro-inflammatory cytokines on *NF-κB* (e) and *CXCL8* (f) mRNA relative expressions measured by qPCR and on IL-8 secretion measured by ELISA in the apical (g) and basal (h) media from the Caco-2/TC7 & HT29-MTX co-culture.

Data were expressed as the mean $\pm$ SEM (n=6). mRNA levels were expressed as fold induction over the CTL group set at 1. *, **, ***, ****: statistically significant difference *vs.* control (CTL) ($p < 0.05$; $p < 0.01$; $p < 0.001$ and $p < 0.0001$ respectively). CK, cytokines; CTL, control; CXCL8, Interleukin 8; NF-κB, nuclear factor-kappa B.

3.1.2. Modulation by the cocktail of cytokines of the expression of genes coding for proteins of the pro-inflammatory and pro-apoptotic pathways

We did not observe any significant MAPK genes activation after a 6h-incubation of the Caco-2/TC7 mono-culture with pro-inflammatory cytokines. Only mRNA expression of *CASP9* was significantly lowered (-0.2-fold, $p = 0.0338$) as compared to the non-stimulated cells (CTL) (Figure 2a). These results were also observed on the Caco-2/TC7 & HT29-MTX co-culture after a 6h-incubation with the cocktail of cytokines. Furthermore, mRNA expression of *STAT3* was significantly down-regulated (-0.7-fold; $p < 0.0001$) while mRNA expression of *CASP3* was significantly up-regulated (3.2-fold $p = 0.0305$) after a 6h-incubation of the co-culture (Figure 2 b).

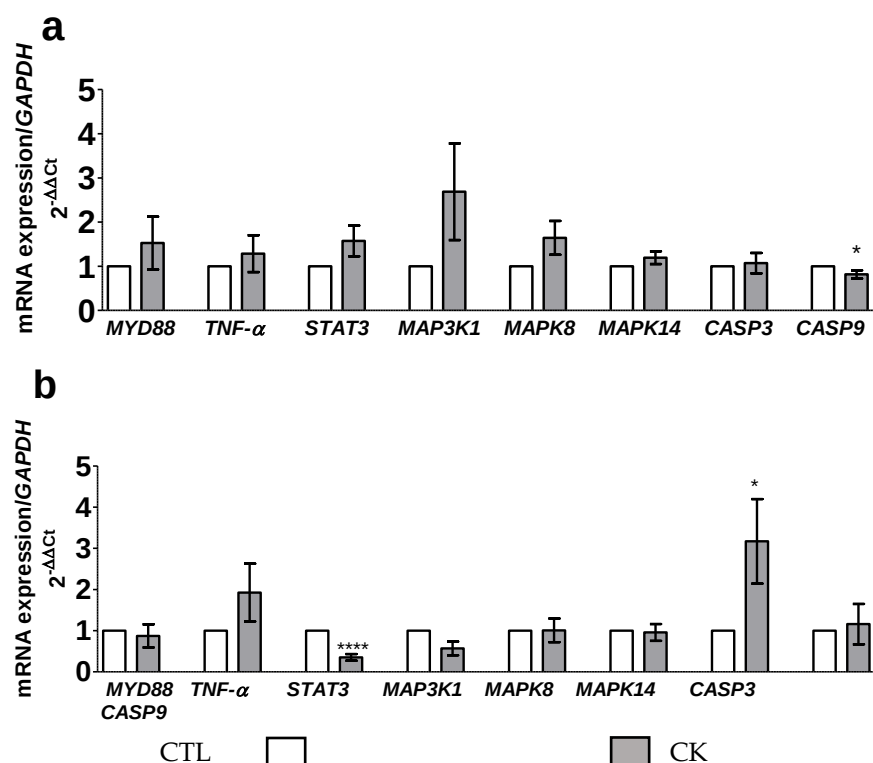


Figure 2. Effect of a 6h-incubation with the cocktail of cytokines on the relative expression of mRNA of genes coding for the pro-inflammatory and pro-apoptotic signaling pathways measured by qPCR from the Caco-2/TC7 mono-culture (a) and from the Caco-2/TC7 & HT29-MTX co-culture (b).

Data were expressed as the mean $\pm$ SEM (n=12). mRNA levels were expressed as fold induction over the CTL group set at 1. *, **** statistically significant difference *vs.* CTL ($p < 0.05$; $p < 0.0001$ respectively). CK, cytokines; CTL, control; *CASP3*, Caspase 3; *CASP9*, Caspase 9; *MAP3K1*, Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1; *MAPK8*, Mitogen-Activated Protein Kinase 8; *MAPK14*, Mitogen-activated protein kinase 14, also known as p38- α ; *MyD88*, Myeloid Differentiation primary response gene 88; *STAT3*, Signal transducer and activator of transcription 3; *TNF- α* , tumor necrosis factor α .

3.2. Effects of the food contaminants on the mono- and co-culture

3.2.1. Viability of the mono-culture after exposure to food contaminants

The Caco-2/TC7 mono-culture was incubated with the selected food contaminants to ascertain the absence of cell death and to determine the optimal concentration to work with for the rest of the study. Based on these preliminary results, incubation with 300 μ M of CPF and of CML and with 5mM of acrylamide induced a sufficient activation of cells (confirmed by IL-8 secretion) without generating any cell death. These concentrations were then used for the rest of the experiments. In addition, the absence of *per se* effect of methanol, used as vehicle for CPF stimulation, was confirmed.

3.2.2. Assessment of the alteration of the barrier function by the food contaminants

The effects of food contaminants were studied only in the Caco-2/TC7 & HT29-MTX co-culture which is physiologically more relevant than the mono-culture.

3.2.2.1. Effects of food contaminants on the epithelial permeability

Paracellular intestinal permeability impairment was estimated based from the amount of FITC-Dextran transiting from the apical to the basal medium [28]. After a 6h stimulation with CML and/or CPF, we did not observe any significant diffusion ($p > 0.05$) of FITC-Dextran through the epithelial intestinal layer (Figures 3a and 3b, respectively).

mRNA expression of *TJP1* and *VIL1* was significantly upregulated (17.0-fold; $p = 0.0005$ and 3.0-fold; $p = 0.0111$ respectively *vs.* CTL) after a 6h-stimulation with CPF but significantly lowered after a 6h- co-exposition to CPF/CML (17.6-fold; $p = 0.0008$ and 3.3-fold; $p = 0.0048$ respectively *vs.* CPF) (Figure 3c).

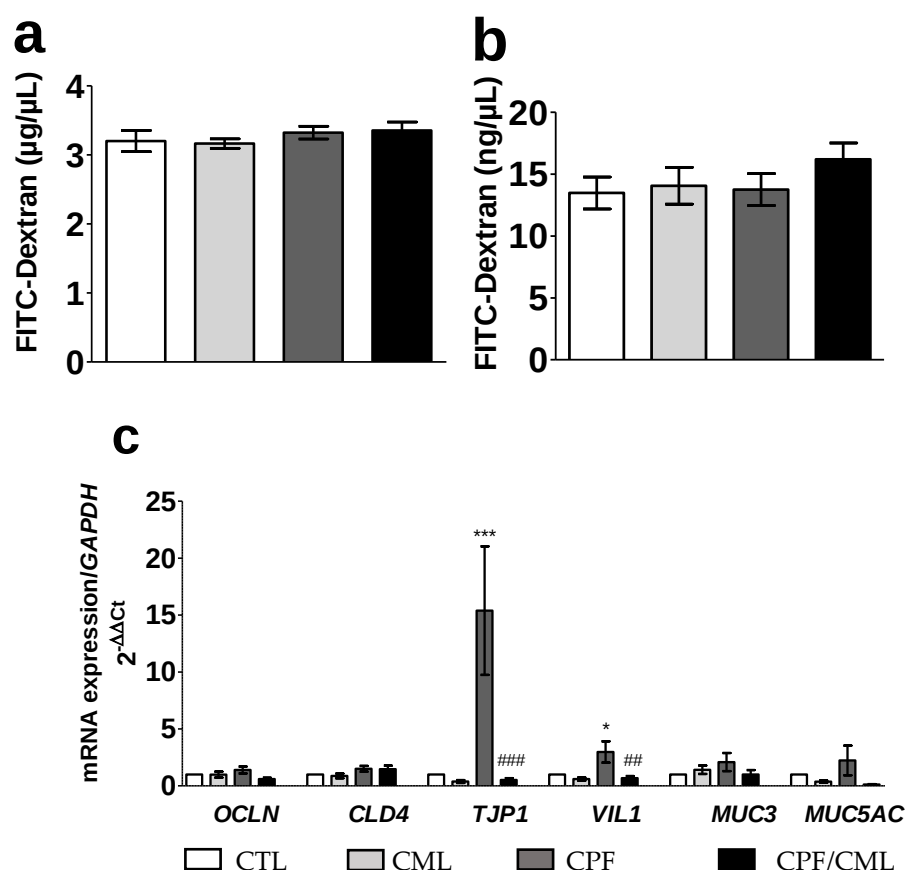


Figure 3. Effect of a 6h-incubation with CML (300 μM) and/or CPF (300 μM) on the level of FITC-Dextran in apical (a) and basal (b) media and of the relative mRNA expression of genes coding for tight junctions and mucins measured by qPCR from the Caco-2/TC7 & HT29-MTX co-culture (c).

Data were expressed as the mean $\pm$ SEM (n=12). The level of gene expression was expressed as the fold induction over the CTL group set at 1. *, *** statistically significant difference ($p < 0.05$; $p < 0.001$ CPF *vs.* CTL), ##, ### statistically significant difference ($p < 0.01$; $p < 0.001$ CPF/CML *vs.* CPF). CML; N^ε(6)-Carboxymethyllysine; CPF, Chlorpyrifos; CTL, control; CLDN4, Claudin 4; MUC3, Mucin 3; MUC5AC, Mucin 5AC; OCLN, Occludin; TJP1, Tight Junction Protein 1; VIL1, Villin 1.

3.2.2.2. Modulation of pro-inflammatory and pro-apoptotic signaling pathways by the food contaminants

The mRNA expression of *NF-κB* was not significantly ($p > 0.05$) modified by a 6h-incubation with either CPF alone or in combination with CML (Figure 4a). In contrast, a 6h-incubation with CML significantly upregulated (3.6-fold $p = 0.010$) *CXCL8* mRNA expression which was not observed after the 6h-incubation with CPF/CML (Figure 4a).

Furthermore, following a 6h-incubation with CML and/or CPF, we did not observe any change ($p > 0.05$) on IL-8 protein secretion in the apical as well as the basal media (Figures 4b and 4c, respectively). A 6h-incubation of the co-culture with CML resulted in a significantly greater mRNA expression of *MAPK8* (5.9-fold $p = 0.0118$ *vs.* CTL) but also

of *CASP3* (3.5-fold; $p < 0.0014$ vs. CTL and 3.7-fold $p < 0.0011$ vs. CPF/CML) (Figure 4d).

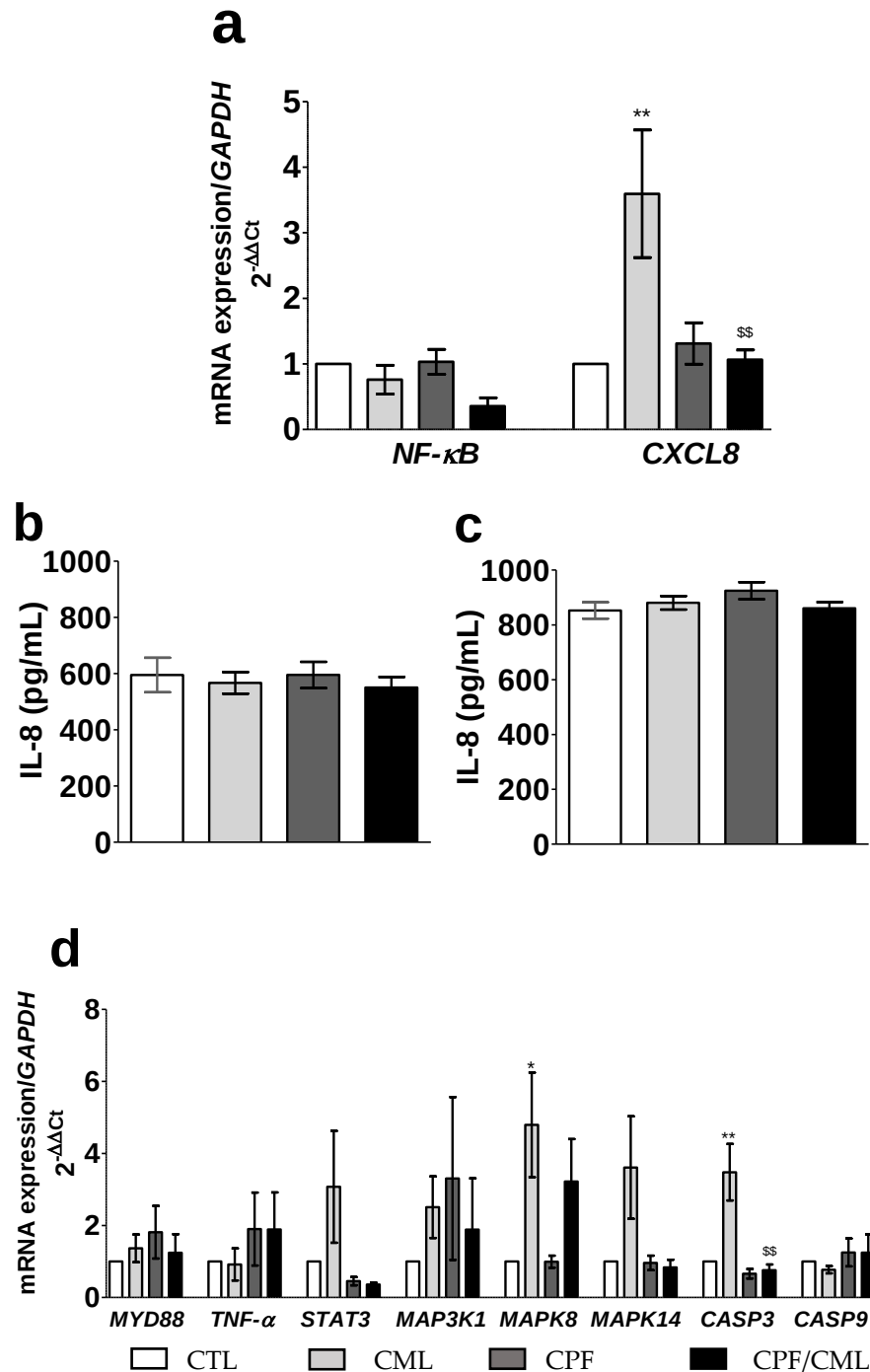


Figure 4. Effect of a 6h-incubation with CML (300 μM) and/or CPF (300 μM) on the relative mRNA expression of genes coding for *NF-κB* and *CXCL8* (a) measured by qPCR and of IL-8 secretion measured by ELISA in both the apical (b) and basal (c) media. Relative mRNA expression of genes involved in the pro-inflammatory and pro-apoptotic signaling pathways measured by qPCR from the Caco-2/TC7 & HT29-MTX co-culture (d).

Data were expressed as the mean $\pm$ SEM (n=12). The level of gene expression was expressed as the fold induction over the CTL group set at 1. *, **: statistically significant difference ($p < 0.05$; $p < 0.01$ CML vs. CTL), \$

statistically significant difference ($p < 0.01$ CML *vs.* CPF/CML). N(6)-Carboxymethyllysine; CPF, Chlorpyrifos; CTL, control; *CASP3*, Caspase 3; *CASP9*, Caspase 9; CML; *CXCL8*, Interleukin 8; *MAP3K1*, Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1; *MAPK8*, Mitogen-Activated Protein Kinase 8; *MAPK14*, Mitogen-activated protein kinase 14, also called p38- α ; *MyD88*, Myeloid Differentiation primary response gene 88; *NF- κ B*; nuclear factor-kappa B; *STAT3*, Signal transducer and activator of transcription 3; *TNF- α* , tumor necrosis factor α .

3.2.3. Effects of the glycotoxins on the Caco2/TC7 & HT29/MTX co-culture

3.2.3.1. Effects of the glycotoxins on the intestinal barrier function

A 6h-incubation of the co-culture with the two glycotoxins, CML and Acrylamide, was not associated with any significant ($p > 0.05$) change of FITC-Dextran concentration in the apical and the basal media (Figure 5a and 5b).

The 6h-incubation with CML (300 μ M) resulted in a significantly lower expression of *TJP1* mRNA (-1.8-fold; $p < 0.0332$ *vs.* acrylamide) and of *VIL1* mRNA (1.7-fold; $p < 0.0284$ *vs.* acrylamide). This incubation also statistically significantly upregulated the expression of *MUC3* mRNA (-1.9-fold $p < 0.0299$ *vs.* CML). Furthermore, following the 6h-incubation with CML or acrylamide, the expression of *MUC5AC* mRNA was significantly lowered ($p < 0.0001$ for both) by 0.6-fold and 0.4-fold respectively (Figure 5c).

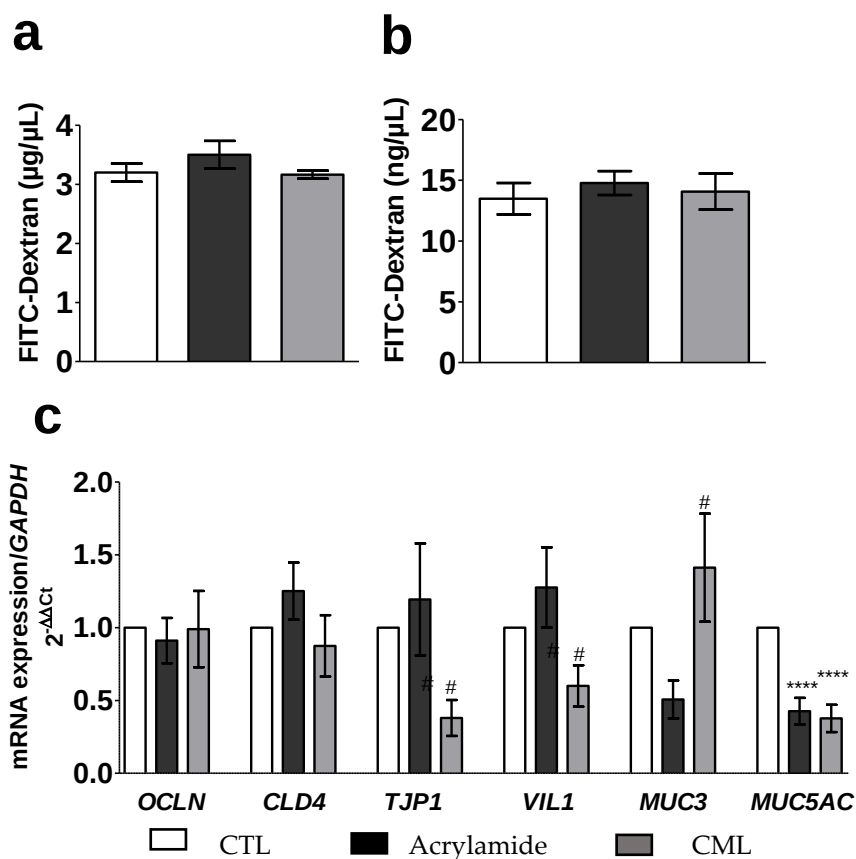


Figure 5. Effect of a 6h-incubation with CML (300 μ M) or acrylamide (5 mM) on the levels of FITC-Dextran in the apical (a) and the basal (b) media and the mRNA expression of genes coding for tight junctions and mucins (c) from the Caco-2/TC7 & HT29-MTX co-culture.

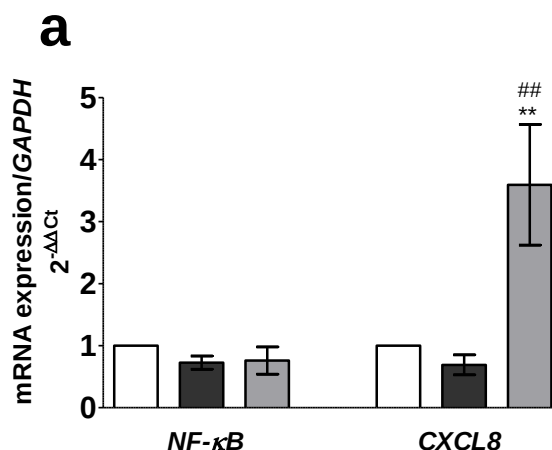
Data were expressed as the mean $\pm$ SEM (n=12). The level of gene expression was expressed as the fold induction over the CTL group set at 1. ***: statistically significant difference ($p < 0.001$ vs. CTL), # statistically significant difference ($p < 0.05$ vs. acrylamide). CML; N^ε(6)-Carboxymethyllysine; CTL, control; *CLDN4*, Claudin 4; *MUC3*, Mucin 3; *MUC5AC*, Mucin 5AC; *OCN*, Occludin; *TJP1*, Tight Junction Protein 1; *VIL1*, Villin 1.

3.2.3.2. Effects of the glycotoxins on the expression of key genes involved in the pro-inflammatory and pro-apoptotic signaling pathways

NF- κ B mRNA expression in the co-culture was modified by neither CML nor acrylamide ($p > 0.05$ vs. CTL) (Figure 6a). However, a 6h-incubation with CML significantly upregulated *CXCL8* mRNA expression (3.6-fold; $p = 0.0098$ vs. CTL and 4.4-fold; $p = 0.0044$ vs. acrylamide) (Figure 6A). In contrast, we did not observe any significant ($p > 0.05$) effect of acrylamide on *CXCL8* gene expression (Figure 6a).

Furthermore, a 6h-incubation with either acrylamide or CML was not associated with a greater IL-8 secretion ($p > 0.05$) in both the apical and the basal media (Figures 6b and 6c, respectively).

In contrast, the 6h-incubation with CML was followed by a statistically significant upregulation of *MAPK8* mRNA expression (5.9-fold; $p = 0.0054$ vs. CTL and 6.0-fold $p = 0.0060$ vs. acrylamide) (Figure 6d) and of *CASP3* mRNA expression (3.5-fold; $p = 0.0121$ vs. CTL) (Figure 6d).



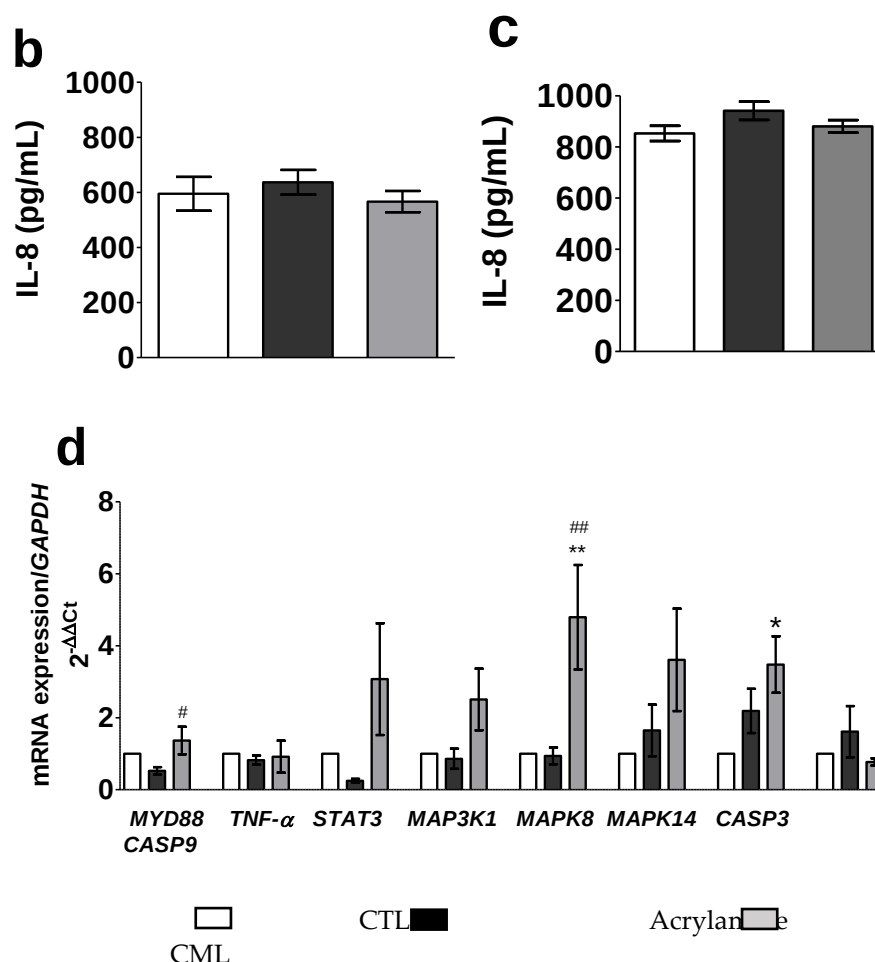


Figure 6. Effect of a 6h-incubation with CML (300 μ M) or acrylamide (5 mM) on relative mRNA expressions of genes coding for *NF- κ B* and *CXCL8* (a) measured by qPCR, on IL-8 secretion measured by ELISA in the apical (b) and the basal (c) media and on relative mRNA expression of genes coding for the pro-inflammatory and pro-apoptotic signaling pathways measured by qPCR (d) from the Caco-2/TC7 & HT29-MTX co-culture.

Data were expressed as mean $\pm$ SEM (n = 12). The level of gene expression was expressed as the fold induction over the CTL group set at 1. *, **, ***: statistically significant difference ($p < 0.01$; $p < 0.001$ vs. CTL), #, ## statistically significant difference ($p < 0.05$; $p < 0.01$ vs. acrylamide). CML; N^ε(6)-Carboxymethyllysine; CTL, control; CASP3, Caspase 3; CASP9, Caspase 9; CXCL8, Interleukin 8; MAP3K1, Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1; MAPK8, Mitogen-Activated Protein Kinase 8; MAPK14, Mitogen-activated protein kinase 14, also called p38- α ; MyD88, Myeloid Differentiation primary response gene 88; NF- κ B; nuclear factor-kappa B; STAT3, Signal transducer and activator of transcription 3; TNF- α , tumor necrosis factors α ;

4. Discussion

In this study, we sought to improve an *in vitro* model of human intestinal epithelium that could be able to mimic physiological response to different food contaminants treatments. The Caco-2 cell line has been, for a long time, used for *in vitro* studies and is known to differentiate spontaneously, expresses enterocyte phenotypes [13] and it can mimic functional gut

epithelium [14]. However, this cell line tends to grow heterogeneously and evolve differently leading to variable tight junction protein expression, cellular localization [15] and intestinal permeability [16,17]. Several clones isolated reduce this heterogeneity [18], and, among them, the TC7 clone is able to better reproduce the functionality of intestinal cells *in vivo* [19]. This Caco-2 clone is a good model for gut barrier and intestinal absorption [20] but also for intestinal drugs metabolism [21]. Nevertheless, *in vivo*, intestinal epithelial cells are closely juxtaposed to other cells such as goblet cells. Then, to get closer to a more physiological model of intestinal epithelium, we chose to complete it by using a second cell line, the HT29-MTX, expressing a goblet cell phenotype, to wrap the epithelial lining by the mucus component [22,23]. The co-culture of Caco-2 and HT29-MTX is already validated in the literature to be a representative model of intestinal epithelium [29–31,18,19]. To our knowledge, we are among the first ones to use the co-culture model of the Caco-2/TC7 clone with the HT29-MTX to limit the bias described above with the parental Caco-2 cell line [20].

One of the main challenges was also to reproduce the physiological features of both the cell types. However, in the literature, ratios of Caco-2 & HT29-MTX vary widely: 75/25 [32]; 90/10; 80/20 and 70/30 [1]; 90/10, 75/25, 50/50, 25/75 [2]. We then evaluated in a preliminary study the response of different ratios (60/40, 70/30, 80/20, 90/10) of these two cell lines grown together to determine the most appropriate one. From this study, we kept 90% of Caco-2/TC7 cells and 10% of HT29-MTX cells which also is the most widely used ratio with Caco-2 cells [33] and the closest of intestinal epithelium *in vivo*. Indeed, under *in vivo* conditions, the intestinal mucosa epithelium is made of 85% to 95% of enterocytes and 5% to 15% of goblet cells depending on the segment of intestine considered (increasing caudally from duodenum to distal colon) [34]. Furthermore, to ascertain that our cell model was still sensitive to an inflammatory signal, we also compared the sensitivity of the Caco2/TC7 mono-culture and of the Caco2/TC7 & HT29-MTX co-culture to a pro-inflammatory stimulus, generated by a cocktail of 3 cytokines (TNF- α , IL1- β , and IFN- γ) following exposures of 2, 6 or 24 hours [26]. Indeed, the Caco2 cells, including the TC7 clone, are known to be able to produce inflammatory markers in response to pro-inflammatory stimuli [35]. We confirmed that the inflammatory effect of the cocktail was observed on the mono-culture as early as 2h as indicated by NF- κ B gene activation, IL-8 activation and secretion and lasted up to 24h albeit a decrease of the effect was observed between 6 and 24h-stimulation. Since the highest inflammatory response was observed between 2 and 6 hours, we decided to expose the cells for 6h for the rest of the study. Pro-inflammatory cytokines stimulation of the co-culture Caco-2/TC7 & HT29-MTX during 6 hours, also resulted in an activation of CXCL8 gene expression and secretion following NF- κ B activation which is corroborated by the literature [36]. Furthermore, on both the mono- and the co-culture, this seems to be essentially associated to the NF- κ B pathway activation since neither the STAT3 nor the MAP kinases genes expression were modified after the cocktail stimulation. At last, we did not observe any modification of the CASP3 and CASP9 pro-apoptotic genes after the stimulation by the pro-inflammatory cytokines. Although all results were significant, the response of the co-culture was lower than the mono-culture's one. Such a

difference in the amplitude of response could be linked to the presence of a mucus layer in the co-culture.

Since the Caco2/TC7 & HT29-MTX co-culture responded to a pro-inflammatory stimulus, we investigated if this model could be used to evaluate the response to food contaminants. Among the large diversity of contaminants, we focused onto residuals of environmental contamination and to those generated during food processing as we are exposed to several contaminants at once. Among pesticides, we chose to study the effects of CPF, an organophosphorus compound, known to generate a pro-inflammatory response of Caco2 cells [37]. Furthermore, heat processing of food generates multiple molecules among which Advanced Glycation End products (AGEs), intermediate compounds of the Maillard Reaction, whose consequences on gut function and more generally on health are questioned. More specifically, we studied the consequences of an *in vitro* exposure to N^ε-Carboxymethyllysine (CML) whose effects on the gut are controversial. Based on these considerations, we thus exposed the co-culture to CPF and to CML separately and together to mimic a food-bound exposure. Exposure of the co-culture to CPF (300μM) was not associated to cell death. This dose was consistent with the dose of CPF (250 μM) described to be representative of oral daily exposure of humans used in a previous study [7]. However, the concentration of CPF used in this study was slightly increased since, in their work, authors estimated that 20% of CPF was adsorbed to the plastic material and that in our study we used mucus secreting cells. After a 6h-stimulation with CPF, the paracellular permeability of the co-culture was not altered. We, however, observed that CPF increased the mRNA expression of *TJP1* and *VIL1* without changing neither the mRNA expression of mucins nor of the genes involved in the pro-inflammatory and pro-apoptotic signaling pathways. On a previous work using Caco2 submitted to CPF, authors described an increase of intestinal permeability (decreased TEER and increased 3H-mannitol passage after 6-8h of treatment) [7] and we also evidenced that CPF daily exposure alters intestinal permeability *in vivo*. Such a discrepancy between the studies may mainly come from a reinforcement of the intestinal barrier function by the use, in the present work, of goblet cells generating, via mucus secretion, a physical layer lowering the ability of CPF to reach the epithelial cells. Another possible explanation could be the fact that a single exposure to the pesticide may not be sufficient to alter the epithelial intestinal lining since we were not able to confirm previous *in vivo* results. In that work we showed an increased intestinal permeability associated to the modification of expression of genes coding for TJ proteins and for mucus composition [6,5] probably because animals were submitted to a repeated low level exposure to the pesticide which is not the case here. Moreover, we did not evidence either any induction of the pro-inflammatory and pro-apoptotic signaling pathways in the co-culture model which is contradictory to the literature. Although most of *in vitro* studies based on exposure to CPF were mainly aiming at evidencing its cytotoxicity, very few ones focused onto its effects on intracellular signaling especially at the digestive level. Indeed, CPF activates ERK1/2 and p38 MAP kinases and slightly stimulates JNK activity in primary culture of rat cortical neurons [38]. Furthermore, CPF, through the inhibition of MAPK pathways, is able to stimulate the assembly of TJ proteins (occludin, ZO-1) and their recruitment to the cell membrane [39] in MDCK cells. One of the

mechanisms proposed, based on human corneal epithelial cells, may be the ability of ERK1/2 to increase paracellular permeability and induce tight junction disruption characterized by an altered distribution of ZO-1 and occludin [40]. Based on this observation, we may then suggest that the stimulation of TJ gene expression and mainly *TJP1* coding for ZO-1 protein is linked to the absence of the MAPK and NF- κ B pro-inflammatory signaling pathways activation in the co-culture model. Concerning the effect of the pesticide on the pro-apoptotic pathways, it was evidenced that exposure (4-6h) of human monocyte like cell line (U937) to CPF (71-284 μ M) resulted in a dose-dependent increase of caspase-3 activity [41] and that exposure to increasing doses of CPF (0-800 μ M) during 24H induced a dose-response activation of caspase-3/caspase-9 activities on a QSG7701 human hepatocytes cell line [42]. While we worked under similar concentrations of CPF, we did not observe this effect. Such differences may be due to the fact that, on the one hand, the intestinal co-culture model is less sensitive to contaminants than immune and hepatic cell lines and, on the other hand, the apoptotic pathways may not already be stimulated after a 6 h-stimulation.

Since the consequences of CML on health are debated, we exposed the co-culture to this AGE, considered to be a glycotoxin, and compared its response to the one observed with the most widely studied AGE, acrylamide, and classified as a putative carcinogen by the International Agency for Research on Cancer (IARC) [43]. N^ε(6)-Carboxymethyllysine (CML) is suspected to stimulate pro-inflammatory signaling pathways in epithelial cells after binding to the Receptor for Advanced Glycation End products (RAGE), a transmembrane receptor of the immunoglobulin superfamily [44]. Neither CML (300 μ M) nor acrylamide (5mM) induced any cell death in the co-culture. The concentrations used in this work are representative of a daily exposure to the two glycotoxins. Our results are contradictory to previous data evidencing a cytotoxic activity of acrylamide at 2.5 mM [44] and 5 mM [24,44] and of CML at 500 μ M [27] on Caco2 cells. We may suggest that the presence of mucus secreting cells may mitigate the deleterious effect of AGEs on cell viability thus lowering the inflammatory response of the Caco2/TC7 cell line when in co-culture with HT29-MTX. However, while mRNA expression of *MUC3* was higher after CML stimulation compared to acrylamide but not to controls, *MUC5AC* mRNA expression was significantly reduced by both CML and acrylamide exposure as compared to controls. Since *MUC5AC* is the major gel-forming mucin in the co-culture model [45], we could then suggest that mucus composition may be slightly modified by CML and to a lesser extent by acrylamide exposure without altering its protective effect. Furthermore, neither acrylamide nor CML increased intestinal permeability evaluated by FITC-dextran efflux although we observed a lower expression of *TJP1* and *VIL1* mRNA after CML stimulation compared to acrylamide exposure but not to the non-stimulated cells. These effects may be linked to the absence of NF- κ B pathway activation since no modification of gene expression of the transcription factor which is known to down-regulate TJ genes expression in epithelial cells [46] was observed in our experiments. However, since we got a higher expression of the gene coding for *CXCL8* following CML stimulation, there may still be a yet not determined inflammatory pathway activated in the intestinal cells. We also have observed after stimulation of the co-culture by CML (300 μ M) for 6 hours an overexpression of genes coding for MEKK1

(*MAP3K1*), JNK1 (*MAPK8*) et p38- α (*MAPK14*) but also for the chemokine CXCL8 whose expression is known to be activated by the JNK and p38- α pathways [47]. It is recognized that p38, ERK, and JNK are three main classes of phosphorylases governing intracellular pro-mitotic, pro-inflammatory pathways [48]. Taking this into account, we can propose that, following 6 h-stimulation by CML, epithelial cells may, by a yet unknown mechanism, stimulate the MAPK but not the NF- κ B signaling pathways thus activating the chemokine gene expression. However, this phenomenon doesn't seem to be long enough to observe any secretion of IL-8 since at this time point we did not get any upregulation of its secretion. At last, this set of experiments confirmed that acrylamide and CML do not act the same way on the intestinal epithelium since neither the NF- κ B nor the MAPK pathways were activated under acrylamide. This result was unexpected since, according to the literature, acrylamide (1 and 3 mM) is able to up-regulate the MEK/ERK signaling pathways via ERK phosphorylation and the activation of two major transcription factors AP-1 and NF- κ B at the origin of its carcinogenicity[49]. However, we cannot exclude that acrylamide may have affected Ca signaling as already described in different types of cells [50] but this would be a hypothesis to investigate if focusing on consequences of acrylamide. The induction of apoptosis pathways following the exposure to CML by comparison to acrylamide was also evaluated on the Caco2/TC7 & HT29-MTX co-culture by investigating the *CASP3* and the *CASP9* gene expressions. The 6h-stimulation of the epithelial model tended to upregulate *CASP3* gene expression in the presence of acrylamide (5 mM) and resulted in an overexpression of the *CASP3* gene in the presence of CML (300 μ M). As observed on the pro-inflammatory pathways, the pro-apoptotic pathways do not seem to be activated by a similar fashion. It was previously shown that acrylamide (5-20 mM) induced apoptosis and cell death on Caco2 cells after 8-16h exposure [24]. Furthermore, 24 to 48h stimulation of RAW 264.7 cells by CML (0-100 mM) was associated with an activation of caspase-3 and caspase-9 proteins [51]. Such differences with the present work may then be due to the settlement of a more robust barrier by the association of the two cell lines. Moreover, since only *CASP3* gene expression seems to be stimulated while neither the *CASP9* gene expression nor the ERK pathways seem to be responsible for this activation, we may then hypothesize that the upregulation of *CASP3* gene comes from a not yet determined pathway.

The ultimate aim of the study was to evaluate the consequences of the concomitant administration of the two food contaminants on the co-culture model. The co-exposure of the co-culture to CPF (300 μ M) and to CML (300 μ M) did not result in an exacerbation of the pro-inflammatory signals observed with each of them separately. By contrast, the effects observed under CML were inhibited when co-stimulation with CPF was realized. This result was unexpected since we were expecting effects at least equivalent to those observed with CML alone. We then may speculate that cellular effects of CPF and CML may happen via antagonistic pathways. These pathways still need to be clarified. One interesting lesson of the study is that the effects of a cocktail of toxicants induce a different response than this of the toxicants administered separately and the complexity of *in vitro* models will condition the sensitivity of the response (Figure 7).

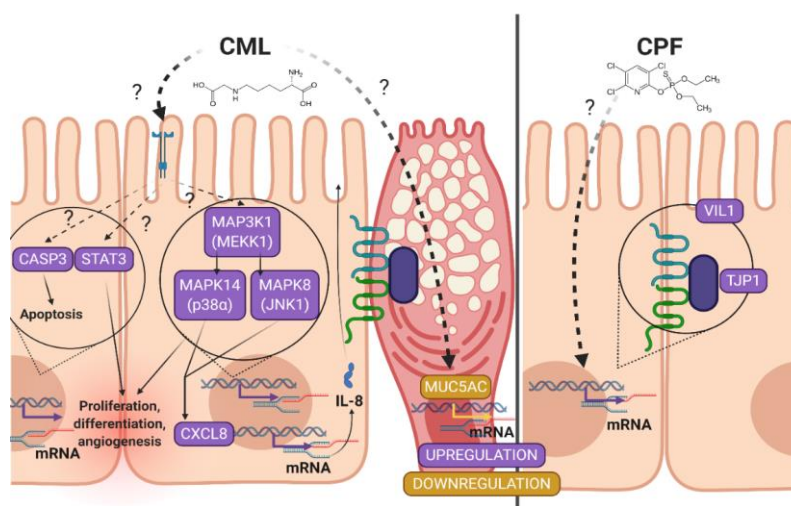


Figure 7 – Potentials effects of food contaminants on the co-culture of Caco-2/TC7 & HT29-MTX after a 6h-stimulation

CASP3, Caspase 3; *CASP9*, Caspase 9; *CLDN4*, Claudin 4; CML; N(6)-Carboxymethyllysine; CPF, Chlorpyrifos; CTL, control; *CXCL8*, Interleukin 8; *MAP3K1*, Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1; *MAPK8*, Mitogen-Activated Protein Kinase 8; *MAPK14*, Mitogen-activated protein kinase 14, also called p38- α ; *MUC3*, Mucin 3; *MUC5AC*, Mucin 5AC; *MyD88*, Myeloid Differentiation primary response gene 88; *NF- κ B*, nuclear factor-kappa B; *OCN*, Occludin; *STAT3*, Signal transducer and activator of transcription 3; *TJP1*, Tight Junction Protein 1; *TNF- α* , tumor necrosis factor α ; *VIL1*, Villin 1.

5. Conclusions

As conclusion, the use of a co-culture of Caco2/TC7 with HT29-MTX is a suitable model for evaluating the pro-inflammatory response to a cocktail of food contaminants. One of the main interests of using such a clone, compared to the parental cell line, is its better stability after several passages but also a better homogeneity of the response. A 6h-exposure to AGEs, such as CML decreases mucins gene expression, but do not affect paracellular intestinal permeability. CML exposure seems to induce pro-inflammatory signaling pathways. CPF exposure only seems to affect tight junction gene expression, without altering neither paracellular intestinal permeability nor inducing any inflammatory response. The use of such a model seems to be a relevant alternative to evaluate the incidence of food contaminants on the digestive tract. So far, there is still a limited number of studies that describe the effects of food contaminants on *in vitro* models of intestinal mucosa. This is mainly due to their lack of similarity to the *in vivo* response of gut barrier. To overcome this point, it will be necessary to add the immune component but also the microbiota interaction with the epithelium to reach the best the physiological interactions governing the intestinal homeostasis. Such models will be of a great interest to understand these events particularly during very sensitive periods of life to evaluate their consequences in the development of many chronic diseases of intestinal origin such as non-communicable chronic diseases.

Author Contributions:

Conceptualization, NB, JGQ and PMA; methodology, NB, JGQ and PMA; validation, NB, JGQ and PMA; formal analysis, MG and PMA; investigation, MG, JH, NC, MS, NB and PMA; resources, NB, JGQ and PMA; data curation, MG, JH, NC, MS, NB and PMA; writing—original draft preparation, MG and PMA; writing—review and editing, NB, JGQ and PMA; visualization, MG, NC, NB and PMA; supervision, NB, JGQ and PMA; project administration, NB, and PMA; funding acquisition, NB, JGQ and PMA. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was funded by the University of Picardie Jules Verne, and the Hauts-de-France Regional Council, and the French government (a 2017 PROGHOMEO grant as part of the “1000 Days for Health” Hospital-University Federative Project).

Institutional Review Board Statement: The Caco-2/TC7 cell line was provided by Dr. M Rousset (UPMC – UMRS 872, Paris, France) and the HT29-MTX cell line was obtained from European Collection of Authenticated Cell Cultures - ECACC.

Data Availability Statement: Data supporting the conclusions are presented in the manuscript. The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Acknowledgments: We thank the platform managers for their help and the Dr. M Rousset (UPMC – UMRS 872, Paris, France) for kindly supplying us with the Caco2/TC7 clone.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Costa, L.G. Organophosphorus Compounds at 80: Some Old and New Issues. *Toxicol Sci* **2018**, *162*, 24–35, doi:10.1093/toxsci/kfx266.
- Murata, M. Browning and Pigmentation in Food through the Maillard Reaction. *Glycoconj J* **2020**, doi:10.1007/s10719-020-09943-x.
- Darwiche, W.; Delanaud, S.; Dupont, S.; Ghamlouch, H.; Ramadan, W.; Joumaa, W.; Bach, V.; Gay-Quéheillard, J. Impact of Prenatal and Postnatal Exposure to the Pesticide Chlorpyrifos on the Contraction of Rat Ileal Muscle Strips: Involvement of an Inducible Nitric Oxide Synthase-Dependent Pathway. *Neurogastroenterol. Motil.* **2017**, *29*, doi:10.1111/nmo.12918.
- El Khayat El Sabbouri, H.; Gay-Quéheillard, J.; Joumaa, W.H.; Delanaud, S.; Guibourdenche, M.; Darwiche, W.; Djekkoun, N.; Bach, V.; Ramadan, W. Does the Perigestational Exposure to Chlorpyrifos and/or High-Fat Diet Affect Respiratory Parameters and Diaphragmatic Muscle Contractility in Young Rats? *Food and Chemical Toxicology* **2020**, *140*, 111322, doi:10.1016/j.fct.2020.111322.
- Joly Condette, C.; Bach, V.; Mayeur, C.; Gay-Quéheillard, J.; Khorsi-Cauet, H. Chlorpyrifos Exposure During Perinatal Period Affects Intestinal Microbiota Associated With Delay of Maturation of Digestive Tract in Rats. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **2015**, *61*, 30–40, doi:10.1097/MPG.0000000000000734.
- Joly Condette, C.; Khorsi-Cauet, H.; Morlière, P.; Zabijak, L.; Reygnier, J.; Bach, V.; Gay-Quéheillard, J. Increased Gut Permeability and Bacterial Translocation after Chronic Chlorpyrifos Exposure in Rats. *PLoS One* **2014**, *9*, doi:10.1371/journal.pone.0102217.
- Tirelli, V.; Catone, T.; Turco, L.; Di Consiglio, E.; Testai, E.; De Angelis, I. Effects of the Pesticide Chlorpyrifos on an in Vitro Model of Intestinal Barrier. *Toxicology in Vitro* **2007**, *21*, 308–313, doi:10.1016/j.tiv.2006.08.015.
- Nowotny, K.; Schröter, D.; Schreiner, M.; Grune, T. Dietary Advanced Glycation End Products and Their Relevance for Human Health. *Ageing Research Reviews* **2018**, *47*, 55–66, doi:10.1016/j.arr.2018.06.005.

9. Takeuchi, M. Toxic AGEs (TAGE) Theory: A New Concept for Preventing the Development of Diseases Related to Lifestyle. *Diabetology & Metabolic Syndrome* **2020**, *12*, 105, doi:10.1186/s13098-020-00614-3.
10. Clarke, R.E.; Dordevic, A.L.; Tan, S.M.; Ryan, L.; Coughlan, M.T. Dietary Advanced Glycation End Products and Risk Factors for Chronic Disease: A Systematic Review of Randomised Controlled Trials. *Nutrients* **2016**, *8*, doi:10.3390/nu8030125.
11. Nowotny, K.; Jung, T.; Höhn, A.; Weber, D.; Grune, T. Advanced Glycation End Products and Oxidative Stress in Type 2 Diabetes Mellitus. *Biomolecules* **2015**, *5*, 194–222, doi:10.3390/biom5010194.
12. Cencič, A.; Langerholc, T. Functional Cell Models of the Gut and Their Applications in Food Microbiology — A Review. *International Journal of Food Microbiology* **2010**, *141*, S4–S14, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.026.
13. León-Rodríguez, M. del C.P. de; Guyot, J.-P.; Laurent-Babot, C. Intestinal in Vitro Cell Culture Models and Their Potential to Study the Effect of Food Components on Intestinal Inflammation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **2019**, *59*, 3648–3666, doi:10.1080/10408398.2018.1506734.
14. Engle, M.J.; Goetz, G.S.; Alpers, D.H. Caco-2 Cells Express a Combination of Colonocyte and Enterocyte Phenotypes. *J. Cell. Physiol.* **1998**, *174*, 362–369, doi:10.1002/(SICI)1097-4652(199803)174:3<362::AID-JCP10>3.0.CO;2-B.
15. Li, N.; Lewis, P.; Samuelson, D.; Liboni, K.; Neu, J. Glutamine Regulates Caco-2 Cell Tight Junction Proteins. **2004**, *287*, 9.
16. Salvini, S.; Charbonnier, M.; Defoort, C.; Alquier, C.; Lairon, D. Functional Characterization of Three Clones of the Human Intestinal Caco-2 Cell Line for Dietary Lipid Processing. *Br J Nutr* **2002**, *87*, 211–217, doi:10.1079/BJN2001507.
17. Huet, C.; Sahuquillo-Merino, C.; Coudrier, E.; Louvard, D. Absorptive and Mucus-Secreting Subclones Isolated from a Multipotent Intestinal Cell Line (HT-29) Provide New Models for Cell Polarity and Terminal Differentiation. *The Journal of Cell Biology* **1987**, *105*, 345–357, doi:10.1083/jcb.105.1.345.
18. Mahler, G.J.; Shuler, M.L.; Glahn, R.P. Characterization of Caco-2 and HT29-MTX Cocultures in an in Vitro Digestion/Cell Culture Model Used to Predict Iron Bioavailability. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **2009**, *20*, 494–502, doi:10.1016/j.jnutbio.2008.05.006.
19. Béduneau, A. A Tunable Caco-2/HT29-MTX Co-Culture Model Mimicking Variable Permeabilities of the Human Intestine Obtained by an Original Seeding Procedure. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2014**, *9*.
20. Mitsou, E.; Dupin, A.; Sassi, A.H.; Monteil, J.; Sotiroudis, G.T.; Leal-Calderon, F.; Xenakis, A. Hydroxytyrosol Encapsulated in Biocompatible Water-in-Oil Microemulsions: How the Structure Affects in Vitro Absorption. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2019**, *184*, 110482, doi:10.1016/j.colsurfb.2019.110482.
21. Kiu, H.; Nicholson, S.E. Biology and Significance of the JAK/STAT Signalling Pathways. *Growth Factors* **2012**, *30*, 88–106, doi:10.3109/08977194.2012.660936.
22. Wakeman, D.; Schneider, J.E.; Liu, J.; Wandu, W.S.; Erwin, C.R.; Guo, J.; Stappenbeck, T.S.; Warner, B.W. Deletion of P38-Alpha MAPK within the Intestinal Epithelium Promotes Colon Tumorigenesis. *Surgery* **2012**, *152*, 286–293, doi:10.1016/j.surg.2012.05.009.
23. Heneghan, A.F.; Pierre, J.F.; Kudsk, K.A. JAK-STAT and Intestinal Mucosal Immunology. *JAKSTAT* **2013**, *2*, doi:10.4161/jkst.25530.
24. Rodríguez-Ramiro, I.; Ramos, S.; Bravo, L.; Goya, L.; Martín, M.Á. Procyanidin B2 and a Cocoa Polyphenolic Extract Inhibit Acrylamide-Induced Apoptosis in Human Caco-2 Cells by Preventing Oxidative Stress and Activation of JNK Pathway. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **2011**, *22*, 1186–1194, doi:10.1016/j.jnutbio.2010.10.005.

25. Marion, R.; Coëffier, M.M.; Gargala, G.; Ducrotté, P.; Déchelotte, P.P. Glutamine and CXC Chemokines IL-8, Mig, IP-10 and I-TAC in Human Intestinal Epithelial Cells. *Clin Nutr* **2004**, *23*, 579–585, doi:10.1016/j.clnu.2003.10.011.
26. Van De Walle, J.; Hendrickx, A.; Romier, B.; Larondelle, Y.; Schneider, Y.-J. Inflammatory Parameters in Caco-2 Cells: Effect of Stimuli Nature, Concentration, Combination and Cell Differentiation. *Toxicology in Vitro* **2010**, *9*.
27. Holik, A.-K.; Lieder, B.; Kretschy, N.; Somoza, M.M.; Ley, J.P.; Hans, J.; Somoza, V. The Advanced Glycation End Product Nε-Carboxymethyllysine and Its Precursor Glyoxal Increase Serotonin Release from Caco-2 Cells. *J Cell Biochem* **2018**, *119*, 2731–2741, doi:10.1002/jcb.26439.
28. Palumbo, P.; Lombardi, F.; Cifone, M.G.; Cinque, B. The Epithelial Barrier Model Shows That the Properties of VSL#3 Depend from Where It Is Manufactured. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* **2019**, *19*, 199–206, doi:10.2174/1871530318666181022164505.
29. Wikman-Larhed, A.; Artursson, P. Co-Cultures of Human Intestinal Goblet (HT29-H) and Absorptive (Caco-2) Cells for Studies of Drug and Peptide Absorption. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **1995**, *3*, 171–183, doi:10.1016/0928-0987(95)00007-Z.
30. Walter, E.; Janich, S.; Roessler, B.J.; Hilfinger, J.M.; Amidon, G.L. HT29-MTX/Caco-2 Cocultures as an in Vitro Model for the Intestinal Epithelium: In Vitro–in Vivo Correlation with Permeability Data from Rats and Humans. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1996**, *85*, 1070–1076, doi:10.1021/js960110x.
31. Hilgendorf, C.; Spahn-Langguth, H.; Regårdh, C.G.; Lipka, E.; Amidon, G.L.; Langguth, P. Caco-2 versus Caco-2/HT29-MTX Co-cultured Cell Lines: Permeabilities Via Diffusion, Inside- and Outside-Directed Carrier-Mediated Transport. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2000**, *89*, 63–75, doi:10.1002/(SICI)1520-6017(200001)89:1<63::AID-JPS7>3.0.CO;2-6.
32. Nolleaux, G.; Devillé, C.; El Moualij, B.; Zorzi, W.; Deloyer, P.; Schneider, Y.-J.; Peulen, O.; Dandriofosse, G. Development of a Serum-Free Co-Culture of Human Intestinal Epithelium Cell-Lines (Caco-2/HT29-5M21). *BMC Cell Biology* **2006**, *7*, 20, doi:10.1186/1471-2121-7-20.
33. Chen, X.-M.; Elisia, I.; Kitts, D.D. Defining Conditions for the Co-Culture of Caco-2 and HT29-MTX Cells Using Taguchi Design. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* **2010**, *61*, 334–342, doi:10.1016/j.vascn.2010.02.004.
34. Kim, Y.S.; Ho, S.B. Intestinal Goblet Cells and Mucins in Health and Disease: Recent Insights and Progress. *Curr Gastroenterol Rep* **2010**, *12*, 319–330, doi:10.1007/s11894-010-0131-2.
35. Rodríguez-Ramiro, I.; Ramos, S.; López-Oliva, E.; Agis-Torres, A.; Bravo, L.; Goya, L.; Martín, M.A. Cocoa Polyphenols Prevent Inflammation in the Colon of Azoxymethane-Treated Rats and in TNF- α -Stimulated Caco-2 Cells. *British Journal of Nutrition* **2013**, *110*, 206–215, doi:10.1017/S0007114512004862.
36. Liu, T.; Zhang, L.; Joo, D.; Sun, S.-C. NF-KB Signaling in Inflammation. *Signal Transduct Target Ther* **2017**, *2*, 17023, doi:10.1038/sigtrans.2017.23.
37. Turco, L.; Catone, T.; Caloni, F.; Consiglio, E.D.; Testai, E.; Stamatii, A. Caco-2/TC7 Cell Line Characterization for Intestinal Absorption: How Reliable Is This in Vitro Model for the Prediction of the Oral Dose Fraction Absorbed in Human? *Toxicology in Vitro* **2011**, *25*, 13–20, doi:10.1016/j.tiv.2010.08.009.
38. Caughlan, A.; Newhouse, K.; Namgung, U.; Xia, Z. Chlorpyrifos Induces Apoptosis in Rat Cortical Neurons That Is Regulated by a Balance Between P38 and ERK/JNK MAP Kinases. *Toxicological Sciences* **2004**, *78*, 125–134, doi:10.1093/toxsci/kfh038.
39. Chen, Y.; Lu, Q.; Schneeberger, E.E.; Goodenough, D.A. Restoration of Tight Junction Structure and Barrier Function by Down-Regulation of the Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway in Ras-Transformed Madin-Darby Canine Kidney Cells. *Mol Biol Cell* **2000**, *11*, 849–862.
40. Wang, Y.; Zhang, J.; Yi, X.; Yu, F.-S.X. Activation of ERK1/2 MAP Kinase Pathway Induces Tight Junction Disruption in Human Corneal Epithelial Cells. *Experimental Eye Research* **2004**, *78*, 125–136, doi:10.1016/j.exer.2003.09.002.

41. Nakadai, A.; Li, Q.; Kawada, T. Chlorpyrifos Induces Apoptosis in Human Monocyte Cell Line U937. *Toxicology* **2006**, *224*, 202–209, doi:10.1016/j.tox.2006.04.055.
42. Zhang, Y.; Chang, Y.; Cao, H.; Xu, W.; Li, Z.; Tao, L. Potential Threat of Chlorpyrifos to Human Liver Cells via the Caspase-Dependent Mitochondrial Pathways. *Food and Agricultural Immunology* **2018**, *29*, 294–305, doi:10.1080/09540105.2017.1373271.
43. Zuckerman, A.J. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. *Journal of Clinical Pathology* **1995**, *48*, 691–691, doi:10.1136/jcp.48.7.691-a.
44. Chen, W.; Feng, L.; Shen, Y.; Su, H.; Li, Y.; Zhuang, J.; Zhang, L.; Zheng, X. Myricitrin Inhibits Acrylamide-Mediated Cytotoxicity in Human Caco-2 Cells by Preventing Oxidative Stress. *Biomed Res Int* **2013**, *2013*, doi:10.1155/2013/724183.
45. Talbot, P.; Radziwill-Bienkowska, J.M.; Kamphuis, J.B.J.; Steenkeste, K.; Bettini, S.; Robert, V.; Noordine, M.-L.; Mayeur, C.; Gaultier, E.; Langella, P.; et al. Food-Grade TiO₂ Is Trapped by Intestinal Mucus in Vitro but Does Not Impair Mucin O-Glycosylation and Short-Chain Fatty Acid Synthesis in Vivo: Implications for Gut Barrier Protection. *J Nanobiotechnology* **2018**, *16*, doi:10.1186/s12951-018-0379-5.
46. Aveleira, C.A.; Lin, C.-M.; Abcouwer, S.F.; Ambrósio, A.F.; Antonetti, D.A. TNF- α Signals Through PKC ζ /NF-KB to Alter the Tight Junction Complex and Increase Retinal Endothelial Cell Permeability. *Diabetes* **2010**, *59*, 2872–2882, doi:10.2337/db09-1606.
47. Khalaf, H.; Demirel, I.; Bengtsson, T. Suppression of Inflammatory Gene Expression in T Cells by Porphyromonas Gingivalis Is Mediated by Targeting MAPK Signaling. *Cellular & Molecular Immunology* **2013**, *10*, 413–422, doi:10.1038/cmi.2013.23.
48. Thalhamer, T.; McGrath, M.A.; Harnett, M.M. MAPKs and Their Relevance to Arthritis and Inflammation. *Rheumatology* **2007**, *47*, 409–414, doi:10.1093/rheumatology/kem297.
49. Lim, T.-G.; Lee, B.K.; Kwon, J.Y.; Jung, S.K.; Lee, K.W. Acrylamide Up-Regulates Cyclooxygenase-2 Expression through the MEK/ERK Signaling Pathway in Mouse Epidermal Cells. *Food and Chemical Toxicology* **2011**, *6*.
50. Recio, L.; Friedman, M.; Marroni, D.; Maynor, T.; Chepelev, N.L. Impact of Acrylamide on Calcium Signaling and Cytoskeletal Filaments in Testes From F344 Rat. *Int J Toxicol* **2017**, *36*, 124–132, doi:10.1177/1091581817697696.
51. Wang, Z.; Bao, Z.; Ding, Y.; Xu, S.; Du, R.; Yan, J.; Li, L.; Sun, Z.; Shao, C.; Gu, W. N ϵ -Carboxymethyl-Lysine-Induced PI3K/Akt Signaling Inhibition Promotes Foam Cell Apoptosis and Atherosclerosis Progression. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2019**, *115*, 108880, doi:10.1016/j.biopha.2019.108880.

DISCUSSION GENERALE

Notre étude a permis de simuler une potentielle accumulation de facteurs environnementaux (pesticides et alimentation déséquilibrée) que peut subir une femme de plusieurs mois avant la conception et jusqu'à la fin de l'allaitement. L'originalité de ce travail consistait à étudier de possibles effets sur la descendance de cette exposition maternelle sur certaines des fonctions de la sphère digestive. Le caractère novateur de ce projet réside également dans la mise en place d'une co-culture de cellules épithéliales intestinales humaines permettant de mimer la barrière intestinale. Cette étude permet d'évaluer les conséquences de l'exposition au pesticide d'intérêt sur la fonctionnalisation de l'épithélium muqueux intestinal humain.

Perturbations de la prise de poids des animaux

Dans notre étude, une exposition maternelle chronique à de faibles doses de CPF est associée à des altérations du développement corporel chez la descendance mâle, caractérisées par un poids inférieur à la naissance ainsi qu'une diminution des taux plasmatiques d'un facteur de croissance (IGF1). De manière intéressante, ce poids inférieur est toujours observé au sevrage alors que les animaux sont encore exposés au pesticide via le lait maternel. Cependant, cet effet semble s'atténuer à l'âge adulte lorsque les animaux ne sont plus exposés au pesticide. Dans notre étude, le HFD maternel augmente le poids corporel de la naissance jusqu'à l'âge adulte de la descendance issue de mères exposées au CPF ou non. Or, l'obésité maternelle est connue pour induire des poids de naissance plus importants ainsi qu'une prédisposition à développer une obésité à l'âge adulte chez l'Homme (Curhan Gary et al., 1996). Expérimentalement, le HFD maternel est fréquemment associé à une augmentation du poids corporel (Cortés-Álvarez et al. 2020), conformément aux résultats de notre étude, et ceci pourrait s'expliquer par un transfert de nutriments maternels plus riches en lipides via le placenta ou le lait maternel (Purcell et al. 2011). Le retard de croissance observé après exposition maternelle au CPF pourrait être lié à l'effet toxique de ce pesticide sur le fœtus via la nutrition placentaire. Ce retard de croissance *in utero* et postnatal est en accord avec d'autres études d'expositions périnatales au CPF (Akhtar et al. 2006 ; Joly Condette et al. 2015, 2014 ; Mansour et Mossa 2010 ; Mattsson et al. 2000 ; Maurissen et al. 2000 ; Zhao et al. 2005). Ces altérations développementales peuvent avoir des répercussions sur la morphogenèse intestinale.

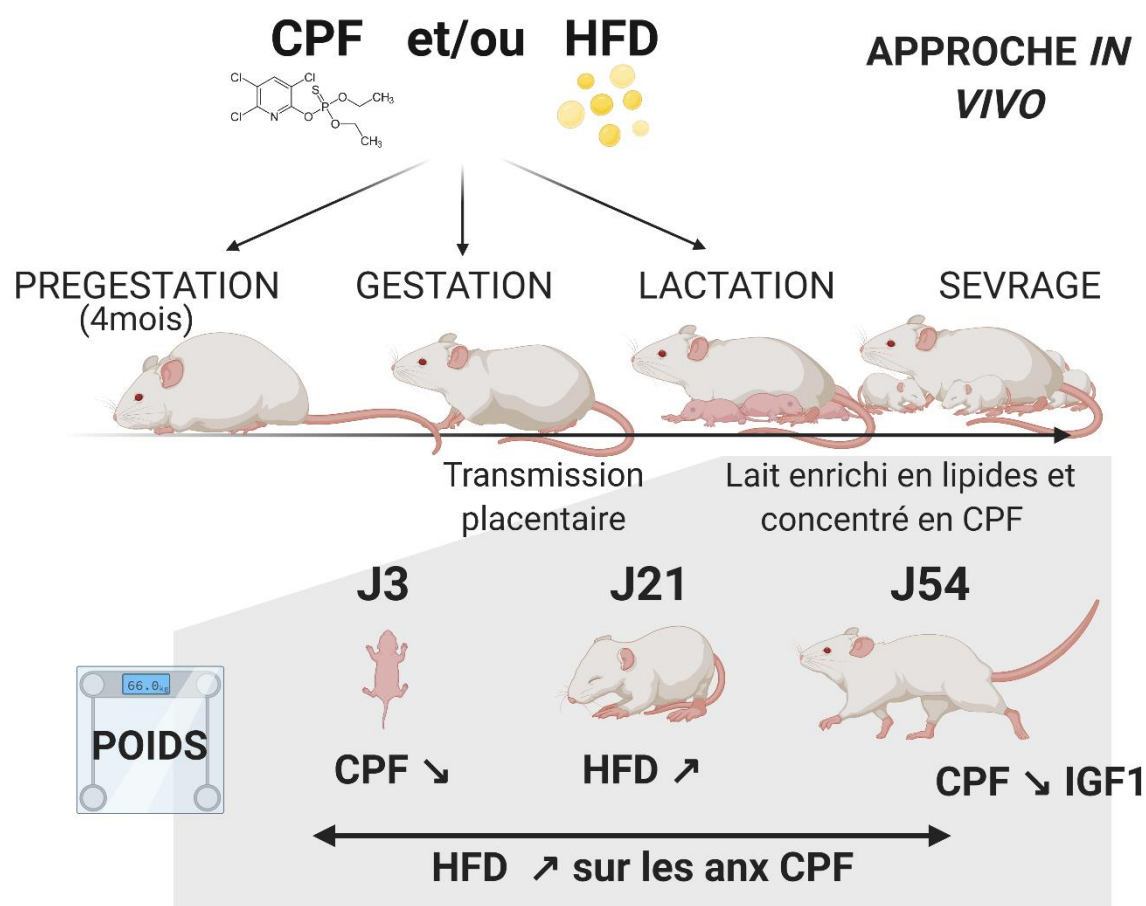


Figure 29 – Perturbations de la prise de poids des animaux issue d’une exposition maternelle à des facteurs environnementaux (création personnelle sur BioRender.com)

Perturbations de la maturation et de la fonction de la barrière intestinale

Peu d’études se sont penchées sur l’effet d’une exposition maternelle à des facteurs environnementaux sur la fonction digestive, bien que cet organe soit le premier en contact avec les contaminants environnementaux alimentaires. Nous avons étudié les perturbations potentielles de l’architecture de la paroi digestive. Dans notre modèle, l’exposition maternelle au CPF ou au HFD n’a induit ni lésion tissulaire de la muqueuse intestinale ni d’altérations des épaisseurs des différentes couches de la paroi. Ces observations témoignent d’une absence de perturbations de la morphogenèse intestinale, tout du moins révélées au travers des critères identifiés. Or, la diminution de l’activité de l’AChE au niveau de l’iléon des animaux issus de mères exposées au CPF avec ou sans HFD (El Khayat El Sabbouri *et al.* 2020) aurait pu être à l’origine d’impacts sur le développement de la muqueuse intestinale, de par le rôle joué par l’AChE dans la morphogenèse intestinale (Pickett *et al.* 2017). De façon intéressante, il a

été démontré, sur la descendance de souris femelles obèses, une réduction de la hauteur des villosités et une augmentation de la profondeur des cryptes iléale (Xue *et al.* 2014). Les auteurs ont suggéré que ces impacts pourraient provenir d'une réduction du renouvellement épithélial liée à l'inflammation observée. Cette différence provient certainement du modèle utilisé et/ou du temps d'exposition au HFD (exposition directe vs exposition indirecte). Nos résultats ne reproduisent pas totalement les résultats obtenus précédemment au sein du laboratoire où les animaux ont été en plus exposés au cours de la période post-natale et à une dose plus forte. L'exposition directe de rats au CPF a entraîné un retard de la maturation du système digestif plus particulièrement au sevrage (Joly Condette *et al.* 2015, 2014).

De plus, nous avons aussi évalué les conséquences de ces expositions sur la fonction de barrière muqueuse intestinale. Dans notre étude, nous avons mis en évidence que l'exposition maternelle au CPF ou au HFD diminue l'expression des gènes des mucines (*Muc2* et *Muc3*), sans modification de l'épaisseur de la couche de mucus. Cependant, elle est associée à une augmentation du nombre de cellules caliciformes au niveau des villosités iléales de la descendance issue de mères exposées au CPF. Ceci avait déjà été décrit avec une exposition directe à un OP (Vismaya et Rajini 2014). Une diminution de la sécrétion des mucines pourrait donc affecter la fonction barrière intestinale. Ces effets sont en accord avec une majorité d'études (Gillois *et al.* 2018) et diffèrent des effets observés au cours de l'étude précédente du laboratoire. Comme nous l'avons décrit précédemment, des résultats divergents peuvent s'expliquer par l'exposition directe au pesticide à une dose supérieure à celle que nous avons utilisée ici (Joly Condette *et al.* 2015). Les réponses tissulaires intestinales face à des facteurs environnementaux sont intrinsèquement liées au statut du microbiote intestinal et peuvent survenir lors de la mise en place d'une dysbiose à l'origine d'une augmentation de la translocation bactérienne (Joly Condette *et al.* 2014). Nous n'avons pas retrouvé ces résultats *in vitro*, après une exposition de 6h au CPF (300 μ M). Le pesticide n'a pas induit de modification de l'expression des gènes des mucines sur notre modèle d'épithélium intestinal humain mimé par la co-culture Caco-2/TC7 & HT29-MTX.

Les résultats obtenus *in vivo* au niveau de la composition du mucus sont particulièrement intéressants car cela pourrait avoir une incidence dans la constitution des jonctions serrées. En effet, l'exposition maternelle au CPF ou au HFD modifie l'expression des gènes codant pour certaines protéines des jonctions serrées (*Ocl*, *Tjp1* et *Cld4*) sans changer la perméabilité intestinale (FITC Dextran), ni augmenter le taux plasmatique de LPS, un marqueur de référence

du passage excessif des produits bactériens à travers la barrière épithéliale intestinale chez la descendance mâle. Ceci pourrait s'expliquer par une absence de perturbation majeure du processus de maturation intestinale voire par un potentiel impact survenant plus tardivement au cours de la phase de développement. Ces résultats sont en accord avec l'étude antérieure du laboratoire, qui a pointé également une perturbation de l'expression et/ou de la localisation de certaines protéines des jonctions serrées (*Cld4* et *Tjp1*) accompagnée d'une altération de la perméabilité intestinale observée uniquement au sevrage et plus à l'âge adulte, après exposition directe au sevrage et à une dose supérieure de CPF (Joly Condette *et al.* 2015, 2014). Une exposition maternelle au HFD induit une augmentation de la perméabilité intestinale accompagnée d'une sous-expression du gène codant pour les ZO et surexpression de celui codant pour *Cld2* (Xue *et al.* 2014). Ces discordances de résultats pourraient être dues au fait que cette étude portait sur des souris femelles âgées de 120 jours. Une des explications pourrait être que l'altération de la barrière muqueuse peut ne pas être significative à l'âge de 8 semaines mais pourrait devenir significative plus tard dans la vie rendant les animaux plus enclins à développer une inflammation intestinale. Cependant, dans des conditions physiologiques normales, ces gènes codant pour les protéines des jonctions serrées rencontrent des variations dans leur expression respective qui semblent dépendre du segment intestinal et des conditions expérimentales. Elles peuvent également être microbiote-dépendantes. Nos résultats *in vivo* sont également retrouvés dans notre modèle (co-culture Caco-2/TC7 & HT29-MTX) *in vitro*, où le CPF a induit une sur-expression des gènes codant pour les protéines des jonctions serrées et des microvillosités (TJP1 et VIL1) sans modification de la perméabilité intestinale. Ces résultats diffèrent de la littérature, où dans une étude utilisant une monoculture de Caco-2, le CPF augmentait la perméabilité paracellulaire et intracellulaire et altérait la synthèse de protéines des jonctions serrées (Tirelli *et al.* 2007). Nous pouvons expliquer cette différence de résultats grâce à un renforcement de la fonction de barrière intestinale due à la présence de cellules HT29-MTX et de la sécrétion de mucus. Nous suggérons que l'augmentation de l'expression des gènes codant pour les protéines des jonctions serrées est liée à l'absence d'activation des voies de signalisation pro-inflammatoires MAPK et NF- κ B dans notre modèle de co-culture. En effet, sur un modèle de cellules MDCK, l'inhibition des voies MAPK a pu stimuler l'assemblage de l'occludine et de la ZO-1 (Chen *et al.* 2000). Ce modèle d'étude est particulièrement intéressant, car il existe encore un nombre limité d'études décrivant les effets des OPs sur des modèles *in vitro* de

d'épithélium intestinal humain. L'un des mécanismes proposés, basé sur les cellules épithéliales cornéennes humaines, serait que l'activation de la MAP kinase ERK1/2 augmenterait la perméabilité paracellulaire et induirait une rupture des jonctions serrées (Wang *et al.* 2004). De fait, ces effets pourraient induire une altération de l'homéostasie intestinale et ainsi être à l'origine de l'activation de l'immunité innée intestinale et/ou de l'induction d'une inflammation.

Partant de cette hypothèse, nous avons alors évalué les effets de l'exposition maternelle au CPF et à un régime HFD sur les marqueurs inflammatoires intestinaux chez la descendance mâle. La réponse immunitaire innée semble stimulée chez ces animaux puisque le HFD ou le CPF induisent une augmentation de l'expression des récepteurs TLRs (*Tlr2* et *Tlr4*) et des défensines (*Defb1* et *b4*), sans pour autant stimuler une réponse inflammatoire. En effet, l'obésité maternelle chez la souris peut être à l'origine d'une réponse inflammatoire digestive de la descendance (Xue *et al.* 2014). Cependant, ces résultats ne reflètent pas totalement ce qui a été précédemment obtenu dans notre équipe. En effet, une exposition gestationnelle et post-natale de rats au CPF a entraîné une augmentation de l'expression des gènes codant pour les défensines, ainsi qu'une sous-expression de ceux des TLRs à la plus forte dose de CPF utilisée (5mg/kg/j) que ce soit au sevrage ou à l'âge adulte (Joly Condette *et al.* 2015, 2014). Ces résultats sont similaires à ceux observés dans notre modèle *in vitro*, où une exposition de 6h au CPF (300 μ M) n'a induit ni réponse inflammatoire ni réponse apoptotique apparente (pas d'activation des voies de signalisation MAPK/STAT et des caspases) sur notre modèle d'épithélium intestinal humain. Ces résultats sont en contradiction avec la littérature mais très peu d'études se sont centrées sur l'évaluation de la perturbation des voies de signalisation intracellulaire. Le CPF a été décrit comme activant les kinases ERK1/2 et p38 MAP et stimulant l'activité JNK dans la culture de neurones corticaux de rat (Caughlan *et al.* 2004). Une autre possibilité serait que la sur-expression des TLRs, connue pour altérer la composition du microbiote intestinal (revue : Yiu *et al.*, 2017), pourrait être responsable d'une perturbation de l'homéostasie et du développement des défenses immunitaires de l'organisme contre certaines bactéries. Ce phénomène serait à l'origine de l'augmentation de la production de β -défensines (Kim *et al.* 2012). Dans notre modèle, la composition du mucus a vraisemblablement été altérée comme l'indique la diminution de l'expression des mucines et l'augmentation des β -défensines. Ce changement de composition et de propriété du mucus est étroitement lié au microbiote intestinal. Nos résultats suggèrent ainsi l'installation d'une

potentielle dysbiose intestinale voire même une mauvaise implantation du microbiote (en termes de densité et/ou de diversité). La réactivité de réponse des acteurs de l'immunité innée peut également être liée à la programmation foétale. Enfin, ces effets immunitaires peuvent représenter des signes d'une défense immunitaire activée et/ou altérée qui lors d'un trouble ultérieur de l'homéostasie (psychologique, inflammatoire) pourrait s'exacerber. Des perturbations de l'homéostasie intestinale pourraient être à l'origine de perturbations métaboliques hépatiques (Vajro *et al.* 2013).

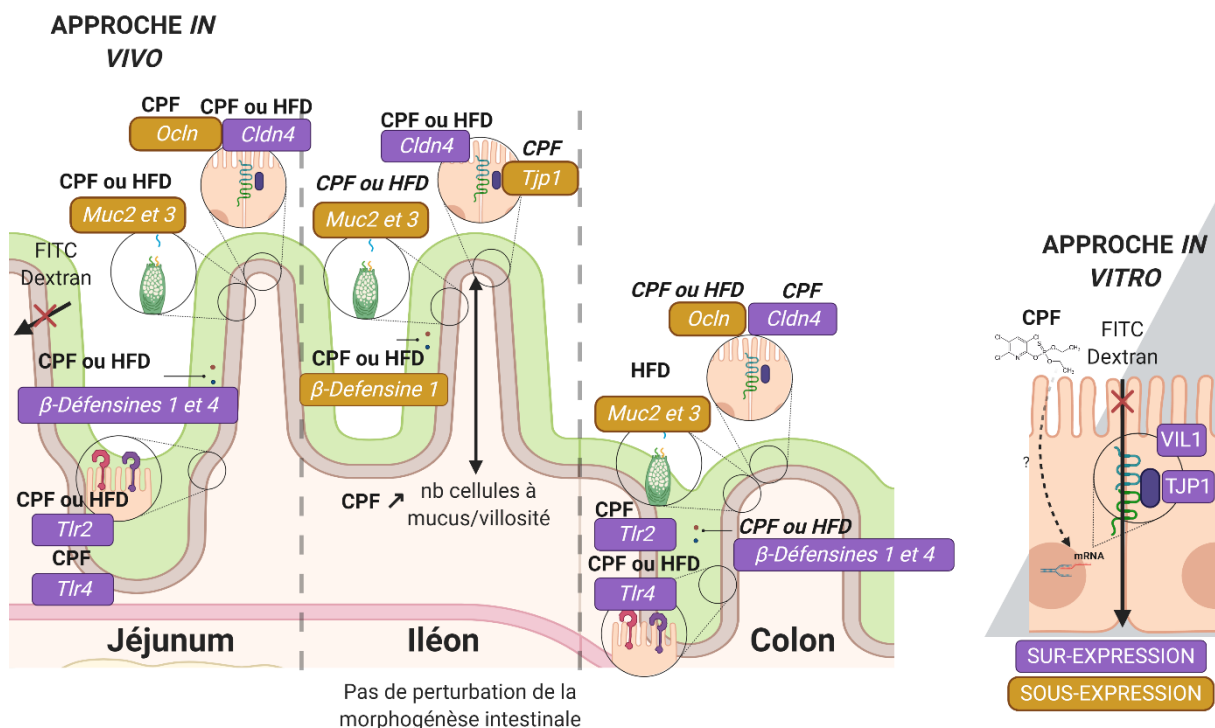


Figure 30 – Résultats observés sur la barrière intestinale in vivo et in vitro (création personnelle sur BioRender.com)

Induction de troubles métaboliques, perturbations du métabolisme lipidique et glucidique hépatique

Le faible poids à la naissance observé peut être prédictif d'obésité chez l'Homme (Bernardi *et al.* 2017) ou d'un diabète de type 2 (Mi *et al.* 2017). Ceci a été confirmé expérimentalement dans une étude où une exposition maternelle au CPF a induit des modifications métaboliques de type pré-diabétiques se caractérisant par une glycémie normale et augmentation de l'insulinémie et de la lipidémie (Slotkin *et al.* 2005b). Ceci peut s'expliquer par une perturbation des fonctions métaboliques fœtales persistant à l'âge adulte se manifestant notamment par une insulino-résistance (Phillips *et al.* 1994). Or dans notre modèle, l'insulinémie, la glycémie et la triglycéridémie tendent à augmenter alors que la lipidémie tend à diminuer après une exposition maternelle au CPF. Ces troubles métaboliques observés chez la descendance issue de mères exposées aux OPs et/ou à un régime hyperlipidique, pourraient provenir d'altérations hépatiques. Aussi, nous avons étudié les impacts hépatiques de ces expositions maternelles. Dans notre étude, l'exposition maternelle au CPF ou au HFD induit des altérations de l'expression d'enzymes hépatiques responsables d'une diminution de la lipogenèse *de novo*. En effet, nous observons une diminution de l'expression de gènes clés de la lipogenèse (*Acaca*, *Fasn*, *Srebf1*) et de l'accumulation lipidique (*Cd36*, *Dgat1* ou *Dgat2*), une légère augmentation de la triglycéridémie dans le tissu hépatique sans modification histologique des hépatocytes. Ceci est associé à une expression génique accrue de la *Lpl* après une exposition maternelle au CPF qui pourrait être responsable d'une augmentation du transport lipidique. De plus, le HFD maternel diminue l'expression génique de *Hmgcr*, impliqué dans la synthèse du cholestérol. Nous émettons ainsi l'hypothèse que moins d'acides gras sont synthétisés et que, par conséquent, moins de TGs sont stockés dans le foie. La diminution du stockage des lipides hépatiques chez la descendance exposée au CPF et au HFD pourrait donc résulter d'une réduction globale du métabolisme lipidique par un mécanisme qui reste alors à déterminer.

Nous avons également mis en lumière que l'exposition périnatale au CPF et au HFD n'a pas activé la voie de la néoglucogenèse hépatique caractérisée par une réduction de l'expression de gènes impliqués dans cette voie (*G6pc* et *Pck1*). Cette gluconéogenèse normale peut s'expliquer par la tendance à la fois à l'hyperglycémie après exposition maternelle au CPF ou au HFD et à la faible augmentation de l'insulinémie sous exposition au CPF. En effet, l'insuline

inhibe la transcription du gène *Pck1*. De plus, la diminution de l'expression génique de *Slc2a2* peut indiquer une diminution de la captation du glucose par les cellules hépatiques entraînant une augmentation de la glycémie et une diminution de la synthèse lipidique *de novo*. Cela a été confirmé par l'augmentation de l'expression des gènes *Lpl* et *Ppara* et l'augmentation du niveau plasmatique des TGs chez la descendance provenant de mères exposées au CPF.

Ces dysfonctionnements métaboliques pourraient provenir de lésions hépatiques (Adham *et al.* 1997 ; Yousef *et al.* 2006). Une exposition maternelle au CPF induit une toxicité qui s'étend au-delà du système nerveux, y compris les cascades de signalisation cellulaire vitales pour l'homéostasie hépatique (Meyer *et al.* 2004). De fait, nous nous sommes intéressés à l'altération des tissus hépatiques et à l'induction d'un processus inflammatoire. Notre étude histologique ne révèle aucune cirrhose ou fibrose chez la descendance mâle lorsqu'elle a atteint l'âge adulte et ce, sous aucune des expositions étudiées. Les enzymes hépatiques avaient tendance à être plus élevées après une exposition périnatale au CPF, et plus particulièrement l'ALP. Ceci nous permet de suggérer une augmentation des lésions membranaires des cellules hépatiques. Cet effet est accompagné d'une réduction de la taille des hépatocytes, en accord avec des études antérieures (Mansour et Mossa 2010) et d'une augmentation de l'expression du gène d'un des deux principaux composants des fibres de collagène (*Col1a1*) qui pourrait être un marqueur prédictif d'une fibrose ultérieure. Cependant, l'exposition au HFD maternel n'entraîne aucun impact chez la descendance sur les marqueurs de lésions hépatiques, à l'exception d'une légère tendance à la hausse des taux des enzymes hépatiques plasmatiques. Or, la consommation du HFD aurait pu être un facteur d'aggravation de la toxicité hépatique du CPF. En effet, la consommation d'un HFD exacerbe les défauts métaboliques liés à une exposition précoce aux OPs et augmente l'incidence des perturbations hépatiques et métaboliques (Lassiter et Brimijoin 2008 ; Adigun *et al.* 2010). De plus, l'altération des fonctions hépatiques, notamment de détoxification, pourrait provoquer une bioaccumulation des métabolites des pesticides dans l'organisme et majorer leurs effets délétères (Buratti *et al.* 2011). Cependant, notre travail ne montre pas que la co-exposition périnatale au CPF et au HFD a des effets synergiques apparents. Nous pouvons suggérer que le régime obésogène pourrait inhiber la bioactivation du CPF en ses métabolites en diminuant les isoformes du cytochrome P450 (CYP450) (Kondakala *et al.* 2017 ; Howell *et al.* 2018). Cela peut être lié à un état inflammatoire hépatique (Sadler *et al.* 2018) car son expression est modulée par les cytokines pro-inflammatoires (Christmas 2015). De plus, à la naissance, la

bioactivation du CPF, catalysée par les CYP, est beaucoup plus élevée que la détoxification indiquant une susceptibilité accrue (Buratti *et al.* 2011). Une autre hypothèse serait que le régime obésogène entraîne les mêmes effets cholinergiques que le CPF sans les exacerber. Cela a été suggéré par une étude *in vivo* démontrant que le HFD atténuait les effets neurotoxiques d'un OP, sur des rats juvéniles (Slotkin *et al.* 2009). Ils postulent que la composition du régime alimentaire peut modifier les effets neurotoxiques développementaux d'une exposition précoce à ces facteurs environnementaux. En effet, le HFD inhibe l'activité de l'AChE (Kaizer *et al.* 2004 ; Morganstern *et al.* 2012). Les auteurs suggèrent un lien avec les AGs circulants augmentés par le régime obésogène, et qui sont connus pour réduire l'activité *in vitro* de l'AChE (Tel *et al.* 2010). Ceci a été démontré sur le même modèle d'étude que le nôtre (El Khayat El Sabbouri *et al.* 2020). Ces résultats sont en accord avec la littérature (Kondakala *et al.* 2017) et avec une précédente étude de notre laboratoire (Darwiche *et al.*, 2017). L'ensemble de ces hypothèses confirmerait que nous observons des effets similaires et convergents sans exacerbation des défauts métaboliques liés à une exposition précoce à des OPs, par le régime obésogène, comme déjà décrit dans la littérature (Adigun *et al.*, 2010).

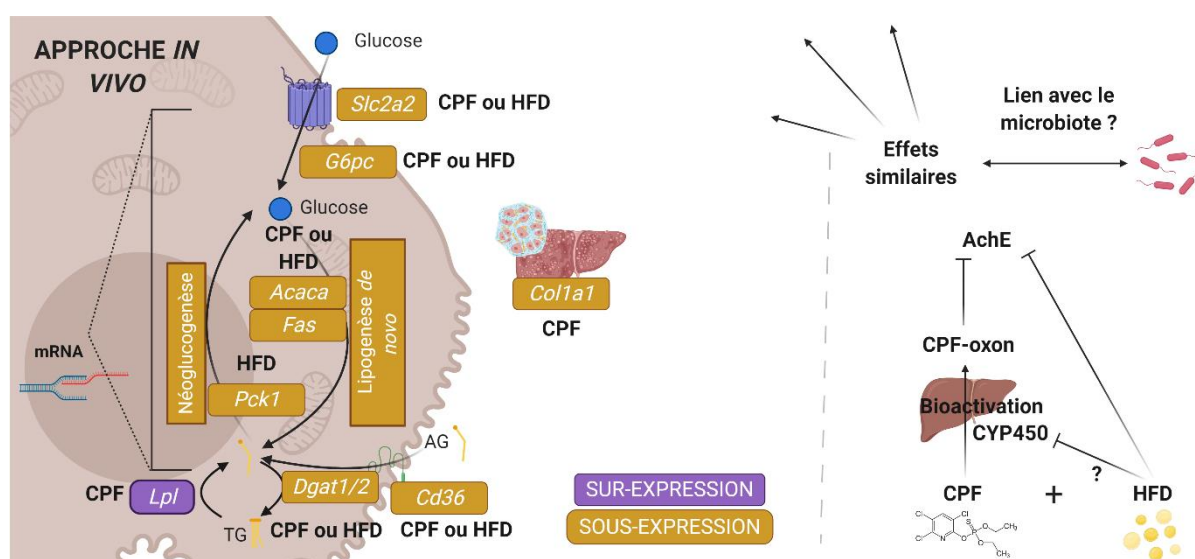


Figure 31 - Illustration des résultats observés sur le métabolisme hépatique et proposition de mécanismes d'action de la co-exposition du CPF et du HFD (création personnelle sur BioRender.com)

Pertinence des modèles utilisés

Pour documenter les effets du pesticide sur l'épithélium intestinal humain, nous avons adapté un modèle de co-culture Caco-2 & HT29-MTX en choisissant de travailler avec le clone TC7 de la lignée épithéliale. Ce clone apporte une meilleure stabilité après plusieurs passages et est capable de mieux reproduire la fonctionnalité des cellules intestinales *in vivo* (Salvini *et al.* 2002). En effet, la lignée cellulaire Caco-2 est utilisée dans de nombreuses études *in vitro* pour sa capacité à se différencier spontanément en entérocytes (Engle *et al.* 1998). Cependant, il a été démontré que l'expression des gènes codant pour les protéines des jonctions serrées (Li *et al.* 2004) et la mesure de la perméabilité intestinale (Ranaldi *et al.* 2003) peuvent varier dans ce modèle d'épithélium intestinal entraînant une réponse hétérogène et dépendante des conditions de culture. Nous avons ajouté la lignée cellulaire HT29-MTX, mimant un phénotype de cellule caliciformes et ajoutant la sécrétion de mucus à notre modèle (Huet *et al.* 1987). En effet, la co-culture de Caco-2 et HT29-MTX est déjà validée dans la littérature comme un modèle représentatif de l'épithélium intestinal (Béduneau 2014). Cependant, à notre connaissance, nous sommes les premiers à utiliser le modèle de co-culture Caco-2/TC7 et HT29-MTX. Dans la littérature, le ratio des cellules Caco-2 et HT29-MTX varie (Nollevaux *et al.* 2006 ; Mahler *et al.* 2009 ; Chen *et al.* 2010). Nous avons choisi le ratio 9:1 (Caco-2/TC7 et HT29-MTX), préconisé par une étude (Chen *et al.* 2010) et physiologiquement le plus approprié (Kim et Ho 2010). Ce modèle cellulaire s'est révélé sensible à une stimulation inflammatoire classique induite par un cocktail de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL1- β et IFN- γ) et est donc en mesure d'imiter les effets des contaminants alimentaires sur la barrière épithéliale intestinale humaine. Sa réponse était plus modérée que celle générée par une monoculture Caco-2/TC7, connue pour être capable de produire des marqueurs inflammatoires (IL-8 notamment) en réponse à des stimuli pro-inflammatoires (Rodríguez-Ramiro *et al.* 2013). L'utilisation d'une co-culture utilisant le clone Caco-2/TC7 avec des cellules HT29-MTX est un modèle adapté pour évaluer la réponse inflammatoire à des contaminants alimentaires. Enfin, nous nous sommes appuyés sur la littérature pour déterminer la dose à laquelle nous allons exposer la co-culture et représentative de la quantité de pesticide entrant potentiellement en contact avec notre épithélium intestinal (Tirelli *et al.* 2007). Cependant, les répercussions métaboliques d'une exposition à des

contaminants alimentaires ne peuvent totalement être mimés *in vitro* dans l'état actuel des modèles disponibles, ce qui a nécessité la mise en œuvre d'un modèle *in vivo* pertinent.

Comme les populations les plus vulnérables à des facteurs environnementaux sont les fœtus et les jeunes enfants, en raison de l'immaturité des fonctions digestives, immunitaires, métaboliques... (Kousba *et al.* 2007), l'originalité de notre étude réside en l'exposition de rates adultes à un contaminant alimentaire et à un régime obésogène pendant plusieurs mois incluant la période gestationnelle et la lactation. L'exposition maternelle aux résidus de pesticides détermine pour partie l'exposition du fœtus puis du nourrisson (Mattsson *et al.* 2000). Ce modèle d'exposition indirecte aux contaminants alimentaires se veut plus proche des conditions d'exposition de la population. Cependant, il rend plus complexe l'interprétation des résultats. Il est également plus difficile d'anticiper la fenêtre de vie à laquelle nous pourrions observer des répercussions. En outre, même si le modèle rongeur est adapté à l'étude du développement du tractus digestif (Penkova *et al.* 2010), il est cependant limité par une courte période de gestation qui retentit sur la maturité intestinale de la descendance (Pácha 2000). La portée des travaux serait améliorée par l'utilisation d'espèces (comme par exemple le lapin ou le cobaye) dont les périodes de gestation sont plus longues afin de mimer un développement intestinal plus proche de l'espèce humaine. En effet, le système digestif de l'homme à la naissance est plus mature que celui du rat (de Zwart *et al.* 2004) et les effets alors observés sur le système digestif immature du rat peuvent être moindres chez l'homme. Les différences entre les espèces et les stades de développement de l'intestin sont aussi influencées par des facteurs génétiques et alimentaires. Des modifications de l'alimentation lors de la période périnatale vont alors perturber la cinétique et/ou les étapes du développement des fonctions de la bordure en brosse intestinale en formation. De plus, l'alimentation post-natale agit sur le développement des fonctions immunitaires et endocriniennes intestinales (Buddington 1994). Ainsi, bien que la maturation fonctionnelle varie entre les espèces, le développement fonctionnel est relativement cohérent entre les espèces, puisque la majorité des changements fonctionnels semble provenir de modifications du régime alimentaire.

De plus, comme dans toutes les études portant sur les effets des pesticides sur la santé, il est important de prendre en compte la voie d'exposition, la dose, et le protocole général qui peuvent significativement influencer la pharmacocinétique et le métabolisme du pesticide d'intérêt. Nous avons choisi une exposition par gavage orogastrique car la voie orale est la principale voie d'exposition à ce pesticide. Cette technique d'administration est communément utilisée pour étudier les effets d'expositions orales à des substances chimiques chez le rat. Elle permet d'administrer rapidement et de façon contrôlée la substance d'intérêt. Néanmoins, la technique de gavage ne permet pas de mimer les interactions physiologiques du bol alimentaire avec la cavité buccale, induisant probablement des différences d'absorption, de biodisponibilité et de métabolisme du pesticide (Vandenberg *et al.* 2014). Concernant le bien-être animal, cette procédure est classée procédure expérimentale légère (Arrêté du 01/02/13 (l'évaluation éthique des procédures expérimentales NOR : AGRG1238767A ; Version consolidée au 31/10/18). Cette technique n'induit pas de stress ni de conséquences comportementales ou métaboliques tant chez la mère que son nouveau-né (McDonnell-Dowling *et al.* 2017) lorsqu'elle est réalisée par un expérimentateur aguerri. Des alternatives comme l'incorporation du pesticide dans l'alimentation sont plus proches de la physiologie mais comportent également leurs limites : moindre contrôle de la dose ingérée, interférence possible du pesticide avec la matrice alimentaire... De plus, le choix du pesticide présente des intérêts majeurs dans notre approche. Même si l'usage du CPF est aujourd'hui bien moindre au niveau mondial de par la mise en place de nouvelles contraintes réglementaires. Ses métabolites sont communs à ceux de la famille des OPs (Cocker *et al.* 2002). Compte tenu de la rapidité du métabolisme du CPF, ses effets sur l'organisme proviennent pour une bonne partie de ses métabolites. C'est la raison pour laquelle le choix de notre dose de CPF est basé sur la NOAEL orale, estimée à 1 mg/kg/j, dose capable de diminuer l'activité AChE cérébrale chez cette espèce (Cochran *et al.* 1995), mécanisme d'action commun aux OPs. De fait, nos résultats pourraient être généralisables aux OPs, pesticides encore fréquemment utilisés partout dans le monde.

Concernant notre modèle d'exposition mimant un déséquilibre alimentaire maternel, celui-ci créerait un environnement intra-utérin prédisposant la progéniture à un phénotype métabolique proche de celui d'individus atteints d'obésité ou de syndrome métabolique à l'âge adulte (Tellechea *et al.* 2017). De nombreux facteurs sont responsables de l'hétérogénéité des résultats obtenus entre les études effectuées pour mimer l'obésité sur des

modèles expérimentaux *in vivo* (Ribaroff *et al.* 2017). L'espèce et la souche d'animaux étudiés, les régimes d'intervention et de contrôle ou les méthodes d'analyse en sont autant d'exemples. Les régimes obésogènes utilisés varient dans leurs compositions en graisse (13 à 74% de composition sous forme de graisses d'origine animale ou végétale). Dans notre protocole, la composition en lipides représente 60% des calories et les lipides sont principalement d'origine animale. Cela est en accord avec les préconisations d'une revue sur ce modèle (Tellechea *et al.* 2017). Bien que comparé à l'espèce humaine, un apport de 60 % de kcal sous forme de matières grasses ne semble pas physiologiquement pertinent d'un point de vue nutritionnel, même s'il reste fréquemment utilisé pour induire une prise de poids rapide. De plus, la source de lipides a également son importance car la composition en acides gras du régime peut affecter les résultats de l'étude, où les lipides d'origine végétale montrent moins d'effets sur la descendance que ceux d'origine animale (Tellechea *et al.* 2017). Enfin, l'utilisation d'un régime de contrôle adapté est indispensable pour interpréter les résultats. On pourrait utiliser un « low fat diet », mais ces régimes contiennent un pourcentage plus élevé de glucides facilement métabolisables, une quantité réduite d'acides gras polyinsaturés, de micronutriments et de fibres, ces éléments étant susceptibles d'induire un dysfonctionnement métabolique (González-Blázquez *et al.* 2020). De plus, il semblerait qu'il n'y ait pas de différences métaboliques entre ces deux régimes contrôles utilisés dans des modèles de HFD chez des souris (Almeida-Suhett *et al.* 2019). Enfin, d'autres paramètres vont entrer en compte comme l'âge de la progéniture, qui dans ce type de protocole est en moyenne de 151 ± 89 jours (Tellechea *et al.* 2017). Dans notre protocole, nous avons étudié les rats à l'âge de 8 semaines (Lecoutre *et al.* 2017), ce qui est peut-être un stade légèrement trop précoce pour pouvoir observer des troubles métaboliques sur la descendance.

PERSPECTIVES

Le champ des perspectives et suites à donner à ce travail est vaste. Afin d'aller plus loin dans l'étude des troubles développementaux *in utero*, les futurs projets pourraient envisager de mesurer la taille des ratons à la naissance, et tout au long de leur croissance. Cela permettrait de calculer l'IMC des ratons afin de mieux juger des troubles développementaux. Cependant, bien que l'accumulation de graisse soit généralement évaluée par des pesées car cette technique est rapide et non invasive, elle est peu représentative de la teneur en graisse corporelle (Prentice et Jebb 2001). De fait, il serait intéressant de quantifier la graisse corporelle par imagerie par résonance magnétique chez le petit animal (Nixon *et al.* 2010). D'autres techniques d'évaluation de la composition corporelle chez les rongeurs ont également été développées, comme la spectroscopie protonique qui quantifie la composition corporelle et qui est adaptée à des ratons même avant sevrage (Stein *et al.* 1995), ou bien la technique de relaxométrie par résonance magnétique (Künnecke *et al.* 2004). Enfin, au moment du sacrifice, le poids du tissu adipeux (graisse gonadique, rétropéritonéale, viscérale et sous cutanée), acteurs de la graisse corporelle totale pourrait confirmer nos résultats de troubles d'adiposité. L'indice d'adiposité (graisse corporelle totale/poids corporel final) $\times 100$ (Taylor et Phillips 1996) pourrait servir de marqueurs précoces à l'apparition d'une obésité (Leopoldo *et al.* 2016) afin de mieux déterminer la période de la vie à laquelle se développera la maladie.

Concernant l'étude des effets de l'exposition du pesticide et du régime obésogène sur la descendance, dans notre modèle *in vivo*, il faudrait poursuivre l'étude des différents mécanismes sous-jacents évoqués au niveau de la barrière intestinale : composition du mucus et étanchéité de l'épithélium intestinal. Nous pourrions, par exemple, mesurer l'expression des gènes et protéines des peptides dits en feuille de trèfle sécrétés par les cellules à mucus (Zouiten-Mekki *et al.* 2013), ou encore, des défensines alpha (Bevins et Salzman 2011). Bien que l'activation des voies de signalisation induisant une réponse inflammatoire n'ait pas été démontrée *in vitro* en présence du CPF, il serait pertinent de les explorer *in vivo* car ces voies interviennent dans le développement de l'obésité et du diabète de type 2 (Hirosumi *et al.* 2002 ; Kleinridders *et al.* 2009 ; Purkayastha *et al.* 2011).

Pour compléter la compréhension de la perturbation des événements métaboliques dans le modèle *in vivo*, les voies de synthèse ou de dégradation du glycogène (glycogenogenèse ou glycogenolyse) au niveau hépatique seraient intéressantes à explorer. Cela nous permettrait de voir si nos résultats de diminution de glucose hépatique sont corrélés à une augmentation de stockage sous la forme de glycogène. L'expression des enzymes du cytochrome P450 pourraient également être quantifiées afin de nous permettre de mieux comprendre l'effet du HFD sur les effets du CPF (Kondakala *et al.* 2017). Il est supposé que le HFD diminue ces activités enzymatiques fondamentales dans le métabolisme des OPs (Sadler *et al.* 2018). Les troubles métaboliques observés pourraient être associés à des effets cholinergiques de nos facteurs environnementaux via des altérations au niveau de l'hypothalamus. En effet, l'inhibition de l'AChE, induite par l'exposition au pesticide ou au régime obésogène, pourrait stimuler les récepteurs hypothalamiques de l'ACh et ainsi activer l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (Ohmori *et al.* 1995). La sécrétion des neuropeptides centraux impliqués dans la régulation du comportement alimentaire pourrait alors être perturbée. Il paraît opportun dans ce cadre d'évaluer les modifications de leurs sécrétions au niveau hypothalamique. Enfin, la perturbation de l'expression des récepteurs muscariniques intestinaux pourrait être explorée car ils conduisent à des perturbations de l'homéostasie du glucose (Holst *et al.* 2011).

Nous ne pouvons pas négliger le rôle que pourraient jouer les perturbations du profil du microbiote intestinal et qui expliqueraient une partie de nos résultats. Son étude est actuellement en cours au sein du laboratoire. En effet, le microbiote pourrait être à l'origine des perturbations de l'expression des protéines jonctionnelles (Joly Condette *et al.* 2014) qui déclencherait une réponse inflammatoire, proche de celle observée dans l'obésité (Pindjakova *et al.* 2017). Ce phénomène passerait par la sur-expression des TLRs (Frost *et al.* 2002) et l'augmentation de la production des β -défensines (Kim *et al.* 2012), comme nous l'avons observé dans nos résultats. De plus, l'altération de la composition du mucus (diminution de l'expression des mucines et l'augmentation des β -défensines) pourrait modifier l'adhésion du microbiote intestinal et être à l'origine de sa perturbation. Nos résultats suggèrent ainsi une mauvaise densification et diversification du microbiote au cours de la période périnatale. Cette voie d'exploration est d'autant plus pertinente que les liens entre obésité et dysbiose

intestinale sont clairement établis (Al-Assal 2018) au travers d'une perturbation de la fermentation microbienne impactant les processus de lipogenèse adipocytaires (Khan *et al.* 2016). Il serait alors intéressant d'explorer l'adipogenèse de la descendance, car peu d'études, à ce jour, se sont intéressées aux effets des OPs, hormis l'exploration de la différenciation des adipocytes suite à une exposition chronique au CPF *in vitro* (Meggs et Brewer 2007). Il serait pertinent d'étudier les perturbations du métabolisme des adipocytes du tissu adipeux blanc de la descendance mâle. En effet, une étude préliminaire du laboratoire a notamment révélé une réduction de la superficie des adipocytes mésentériques et gonadiques en réponse au CPF et au HFD chez les descendances mâle et femelle (projet PESTILIPO ; résultats en cours de publication).

Enfin, comme la co-culture Caco-2/TC7 et HT29-MTX est un modèle adapté pour évaluer la réponse inflammatoire à des contaminants alimentaires, il serait donc opportun d'étudier les effets liés à un déséquilibre alimentaire en jouant sur la fréquence de changement de milieu de culture (Bottani *et al.*, 2019). Nous pourrions également complexifier notre modèle par l'ajout d'une lignée cellulaire de l'immunitaire innée (THP-1) ou adaptative (Raji B) (Antunes *et al.* 2013) mais aussi de certains microorganismes représentatifs des interactions de la muqueuse avec le microbiote intestinal. Enfin, au regard des effets hépatiques observés, un modèle *in vitro* de cellules hépatiques humaines comme des Hep G2 pourrait être utilisé (Tadee *et al.*, 2020).

CONCLUSION GENERALE

Ces travaux de thèse ont mis en lumière les effets d'une exposition périnatale à des facteurs environnementaux tels qu'un pesticide et un régime déséquilibré riche en lipides saturés sur la descendance et en focalisant particulièrement sur la sphère digestive.

En effet, nous avons postulé qu'une exposition maternelle à des résidus d'un pesticide OP dans l'alimentation et/ou un déséquilibre alimentaire, induit par un régime hyperlipidique, pendant les périodes de pré-gestation, gestation et lactation, pouvait induire chez sa descendance, des troubles métaboliques et/ou la prédisposerait au risque de développer une obésité ou un diabète de type 2 dans sa vie adulte.

Même en l'absence de contact direct de la progéniture avec des facteurs délétères (CPF et/ou HFD), nous avons observé des impacts sur l'activité métabolique du foie : une diminution de la glycolyse et de la lipogenèse *de novo*. Cela n'est cependant pas expliqué par une augmentation de la perméabilité intestinale, bien que nous ayons observé que l'exposition maternelle aux pesticides ralentit le développement fœtal et postnatal sans lésion histologique de la muqueuse intestinale. Le CPF ou le HFD ont induit des modifications de l'expression des protéines des jonctions serrées et une réduction de l'expression des mucines avec une activation de l'immunité innée sans augmentation de la perméabilité épithéliale ni induction d'inflammation. Ces résultats ont été observés également sur la simulation des effets du CPF sur la barrière intestinale humaine. Nous avons développé et validé un modèle de co-culture de lignées cellulaires intestinales humaines : Caco-2/TC7 & HT29-MTX, afin d'évaluer les effets du CPF *in vitro* sur la barrière intestinale humaine. Le CPF a induit *in vitro* une augmentation de l'expression des gènes des protéines des jonctions serrées, sans induire de réponse inflammatoire ni d'augmentation de la perméabilité intestinale paracellulaire. La co-exposition à la fois au CPF et au HFD n'a pas augmenté les effets observés par rapport à chaque facteur pris séparément.

Enfin, il est important de souligner que le risque individuel de développer une maladie multifactorielle dépend d'un grand nombre de facteurs (génétiques, environnementaux, liés au mode de vie...). Des pathologies comme l'obésité et le diabète sont plurifactorielles, il est alors peu probable que l'exposition aux OPs à elle seule augmente l'incidence de ces maladies métaboliques. Néanmoins, les effets de l'exposition à ces pesticides, couplés ou non à un déséquilibre alimentaire, sont associés à des changements métaboliques et peuvent

augmenter le risque ou la vulnérabilité de la réponse à d'autres facteurs contributeurs de ces maladies (Czajka *et al.* 2019). Comprendre les conséquences de notre exposition alimentaire aux résidus de pesticides ou à une alimentation déséquilibrée est fondamental pour accompagner les politiques de prévention. En effet, un régime alimentaire équilibré est préconisé en France, notamment en augmentant la consommation de fruits et légumes (PNNS 3 et 4). Cependant, les effets bénéfiques de ces aliments peuvent être contre-balancés par les troubles induits par la présence de résidus de pesticides. Ce sont d'ailleurs les nouvelles connaissances scientifiques qui ont permis d'intégrer ces notions dans les nouveaux programmes de prévention santé à travers de nouvelles recommandations. Celles-ci préconisent la consommation de produits de qualité et de saison, en choisissant des produits qui respectent l'environnement (agriculture biologique) pour limiter l'exposition à des contaminants (comme des pesticides ou des métaux lourds) et d'aller vers une alimentation durable en harmonie avec l'environnement. Dans le cadre de la petite enfance, il faut être particulièrement à l'écoute de celles-ci, plus particulièrement pour les préparations alimentaires domestiques. En effet, il est important de noter que les LMR de pesticides des produits infantiles sont particulièrement strictes.

Notre étude est novatrice, et les résultats permettent de mieux comprendre les impacts des facteurs environnementaux de notre quotidien sur notre santé, particulièrement lors de période de vulnérabilité accrue comme lors de la période des 1000 premiers jours de vie. Ces nouvelles connaissances permettront de renforcer les messages de prévention santé autour de l'alimentation de la femme enceinte jusqu'à la petite enfance. Il serait alors important de renforcer la communication scientifique et la prévention et promotion de la santé autour de ces thématiques, afin de sensibiliser le grand public des potentiels impacts de ces facteurs environnementaux.

BIBLIOGRAPHIE

A

- ABDEL-RAHMAN A., G. BLUMENTHAL, S. ABOU-DONIA, F. ALI, A.-M. A. et M. ABOU-DONIA, 2002 « Pharmacokinetic profile and placental transfer of a single intravenous injection of [14 C]chlorpyrifos in pregnant rats », *Archives of Toxicology*, 76, 8 : 452-459.
- ABDOLLAHI M., M. DONYAVI, S. POURNOORMOHAMMADI et M. SAADAT, 2004 « Hyperglycemia associated with increased hepatic glycogen phosphorylase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in rats following subchronic exposure to malathion », *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 137, 4 : 343-347.
- ABREU M.T., 2010 « Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function », *Nature Reviews Immunology*, 10, 2 : 131-144.
- ACKER C.I. et C.W. NOGUEIRA, 2012 « Chlorpyrifos acute exposure induces hyperglycemia and hyperlipidemia in rats », *Chemosphere*, 89, 5 : 602-608.
- ADHAM K., A. KHAIRALLA, M. ABU-SHABANA, N. ABDEL-MAGUID et A.A. MONEIM, 1997 « Environmental stress in lake maryut and physiological response of *Tilapia zilli* Gerv., », *Journal of Environmental Science and Health . Part A: Environmental Science and Engineering and Toxicology*, 32, 9-10 : 2585-2598.
- ADIGUN A.A., N. WRENCH, E.D. LEVIN, F.J. SEIDLER et T.A. SLOTKIN, 2010 « Neonatal parathion exposure and interactions with a high-fat diet in adulthood: Adenylyl cyclase-mediated cell signaling in heart, liver and cerebellum », *Brain Research Bulletin*, 81, 6 : 605-612.
- AGARWALA S., W. CHEN et T.J. COOK, 2004 « Effect of Chlorpyrifos on Efflux Transporter Gene Expression and Function in Caco-2 Cells », *Toxicology in Vitro*, 18, 4 : 403-409.
- AHMED M.M., E.-S.A. SAMIR, A.M. EL-SHEHAWI et M.E. ALKAFIFY, 2015 « Anti-obesity effects of Taif and Egyptian pomegranates: molecular study », *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 79, 4 : 598-609.

- AINGE H., C. THOMPSON, S.E. OZANNE et K.B. ROONEY, 2011 « A systematic review on animal models of maternal high fat feeding and offspring glycaemic control », *International Journal of Obesity*, 35, 3 : 325-335.
- AKHTAR N., M.K. SRIVASTAVA et R.B. RAIZADA, 2006 « Transplacental disposition and teratogenic effects of chlorpyrifos in rats », *The Journal of Toxicological Sciences*, 31, 5 : 521-527.
- AKIRA S. et K. TAKEDA, 2004 « Toll-like receptor signalling », *Nature Reviews Immunology*, 4, 7 : 499-511.
- AL-ASSAL K., 2018 « Gut microbiota and obesity », *Clinical Nutrition Experimental* : 5.
- ALLEN A., D.A. HUTTON et J.P. PEARSON, 1998 « The MUC2 gene product: a human intestinal mucin », *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 30, 7 : 797-801.
- ALMEIDA-SUHETT C.P., J.M. SCOTT, A. GRAHAM, Y. CHEN et P.A. DEUSTER, 2019 « Control diet in a high-fat diet study in mice: Regular chow and purified low-fat diet have similar effects on phenotypic, metabolic, and behavioral outcomes », *Nutritional Neuroscience*, 22, 1 : 19-28.
- AL-QARNI R., M. IQBAL, M. AL-OTAIBI, F. AL-SAIF, A.A. ALFADDA, H. ALKHALIDI, F. BAMEHRIZ et M. HASSANAIN, 2020 « Validating candidate biomarkers for different stages of non-alcoholic fatty liver disease », *Medicine*, 99, 36.
- AL-SADI R.M. et T.Y. MA, 2007 « IL-1 β Causes an Increase in Intestinal Epithelial Tight Junction Permeability », *The Journal of Immunology*, 178, 7 : 4641-4649.
- ANDERSEN C.L., J.L. JENSEN et T.F. ØRNTØFT, 2004 « Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets », *Cancer Research*, 64, 15 : 5245-5250.
- ANSES, 2011 *Etude de l'alimentation française totale française 2 (EAT 2)*.

- , 2018 « Exposition de la population générale aux pesticides », site internet (<https://www.anses.fr/fr/content/exposition-de-la-population-g%C3%A9n%C3%A9rale-aux-pesticides>), consulté le 30 juillet 2020.
- ANTUNES F., F. ANDRADE, F. ARAÚJO, D. FERREIRA et B. SARMENTO, 2013 « Establishment of a triple co-culture in vitro cell models to study intestinal absorption of peptide drugs », *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 83, 3 : 427-435.
- ARNER P., 2005 « Human fat cell lipolysis: Biochemistry, regulation and clinical role », *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 19, 4 : 471-482.
- ASHRAFIAN H., T. TOMA, S.P. ROWLAND, L. HARLING, A. TAN, E. EFTHIMIOU, A. DARZI et T. ATHANASIOU, 2015 « Bariatric Surgery or Non-Surgical Weight Loss for Obstructive Sleep Apnoea? A Systematic Review and Comparison of Meta-analyses », *Obesity Surgery*, 25, 7 : 1239-1250.
- AUDIE J.P., A. JANIN, N. PORCHET, M.C. COPIN, B. GOSSELIN et J.P. AUBERT, 1993 « Expression of human mucin genes in respiratory, digestive, and reproductive tracts ascertained by in situ hybridization. », *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 41, 10 : 1479-1485.
- AVELEIRA C.A., C.-M. LIN, S.F. ABCOUWER, A.F. AMBRÓSIO et D.A. ANTONETTI, 2010 « TNF- α Signals Through PKC ζ /NF- κ B to Alter the Tight Junction Complex and Increase Retinal Endothelial Cell Permeability », *Diabetes*, 59, 11 : 2872-2882.

B

- BÄCKHED F., J. ROSWALL, Y. PENG, Q. FENG, H. JIA, P. KOVATCHEVA-DATCHARY, Y. LI, Y. XIA, H. XIE, H. ZHONG, M.T. KHAN, J. ZHANG, J. LI, L. XIAO, J. AL-AAMA, D. ZHANG, Y.S. LEE, D. KOTOWSKA, C. COLDING, V. TREMAROLI, Y. YIN, S. BERGMAN, X. XU, L. MADSEN, K. KRISTIANSEN, J. DAHLGREN et J. WANG, 2015 « Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life », *Cell Host & Microbe*, 17, 5 : 690-703.

- BAFNA S., S. KAUR et S. BATRA, 2010 « Membrane-bound mucins: the mechanistic basis for alterations in the growth and survival of cancer cells », *Oncogene*, 29, 20 : 2893-2904.
- BAKKE J.E., V.J. FELL et C.E. PRICE, 1976 « Rat urinary metabolites from O, O-diethyl-O-(3, 5, 6-trichloro-2-pyridyl) phosphorothioate », *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 11, 3 : 225-230.
- BARKER D.J.P., 2003a « Editorial: The Developmental Origins of Adult Disease », *European Journal of Epidemiology*, 18, 8 : 733-736.
- , 2003b « The developmental origins of adult disease », *European Journal of Epidemiology*, 18, 8 : 733-736.
- BÉDUNEAU A., 2014 « A tunable Caco-2/HT29-MTX co-culture model mimicking variable permeabilities of the human intestine obtained by an original seeding procedure », *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* : 9.
- BEL S., M. PENDSE, Y. WANG, Y. LI, K.A. RUHN, B. HASSELL, T. LEAL, S.E. WINTER, R.J. XAVIER et L.V. HOOPER, 2017 « Paneth cells secrete lysozyme via secretory autophagy during bacterial infection of the intestine », *Science (New York, N.Y.)*, 357, 6355 : 1047-1052.
- BERKES J., V.K. VISWANATHAN, S.D. SAVKOVIC et G. HECHT, 2003 « Intestinal epithelial responses to enteric pathogens: effects on the tight junction barrier, ion transport, and inflammation », *Gut*, 52, 3 : 439-451.
- BERKOWITZ G.S., J.G. WETMUR, E. BIRMAN-DEYCH, J. OBEL, R.H. LAPINSKI, J.H. GODBOLD, I.R. HOLZMAN et M.S. WOLFF, 2004 « In utero pesticide exposure, maternal paraoxonase activity, and head circumference. », *Environmental Health Perspectives*, 112, 3 : 388-391.
- BERNARDI J.R., M.Z. GOLDANI, T.V. PINHEIRO, L.S.P. GUIMARÃES, H. BETTIOL, A.A.M. DA SILVA et M.A. BARBIERI, 2017 « Gender and social mobility modify the effect of birth weight on total and central obesity », *Nutrition Journal*, 16.
- BEVINS C.L. et N.H. SALZMAN, 2011 « Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis », *Nature Reviews Microbiology*, 9, 5 : 356-368.

- BICKER W., M. LÄMMERHOFER, D. GENSER, H. KISS et W. LINDNER, 2005 « A case study of acute human chlorpyrifos poisoning: Novel aspects on metabolism and toxicokinetics derived from liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis of urine samples », *Toxicology Letters*, 159, 3 : 235-251.
- BLÜHER M., 2019 « Obesity: global epidemiology and pathogenesis », *Nature Reviews Endocrinology*, 15, 5 : 288-298.
- BOONEKAMP K.E., T.L. DAYTON et H. CLEVERS, 2020 « Intestinal organoids as tools for enriching and studying specific and rare cell types: advances and future directions », *Journal of Molecular Cell Biology* : mjaa034.
- BOTTANI M., L. CORNAGHI, E. DONETTI et A. FERRARETTO, 2019a « Excess of nutrient-induced morphofunctional adaptation and inflammation degree in a Caco2/HT-29 in vitro intestinal co-culture », *Nutrition*, 58 : 156-166.
- BOUVIER G., N. SETA, A. VIGOUROUX-VILLARD, O. BLANCHARD et I. MOMAS, 2005 « Insecticide Urinary Metabolites in Nonoccupationally Exposed Populations », *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 8, 6 : 485-512.
- BRAVO R., L.M. CALTABIANO, G. WEERASEKERA, R.D. WHITEHEAD, C. FERNANDEZ, L.L. NEEDHAM, A. BRADMAN et D.B. BARR, 2004 « Measurement of dialkyl phosphate metabolites of organophosphorus pesticides in human urine using lyophilization with gas chromatography-tandem mass spectrometry and isotope dilution quantification », *Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology*, 14, 3 : 249-259.
- BRUN P., I. CASTAGLIUOLO, V.D. LEO, A. BUDA, M. PINZANI, G. PALÙ et D. MARTINES, 2007 « Increased intestinal permeability in obese mice: new evidence in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis », *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 292, 2 : G518-G525.
- BUDDINGTON R.K., 1994 « Nutrition and ontogenetic development of the intestine », *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*.

BURATTI F.M., G. DE ANGELIS, L. RICCERI, A. VENEROSI, G. CALAMANDREI et E. TESTAI, 2011 « Foetal and neonatal exposure to chlorpyrifos: Biochemical and metabolic alterations in the mouse liver at different developmental stages », *Toxicology*, 280, 3 : 98-108.

C

CAMILLERI M., K. LASCH et W. ZHOU, 2012 « Irritable Bowel Syndrome: Methods, Mechanisms, and Pathophysiology. The confluence of increased permeability, inflammation, and pain in irritable bowel syndrome », *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 303, 7 : G775-G785.

CANI P.D., J. AMAR, M.A. IGLESIAS, M. POGGI, C. KNAUF, D. BASTELICA, A.M. NEYRINCK, F. FAVA, K.M. TUOHY, C. CHABO, A. WAGET, E. DELMÉE, B. COUSIN, T. SULPICE, B. CHAMONTIN, J. FERRIÈRES, J.-F. TANTI, G.R. GIBSON, L. CASTEILLA, N.M. DELZENNE, M.C. ALESSI et R. BURCELIN, 2007 « Metabolic Endotoxemia Initiates Obesity and Insulin Resistance », *Diabetes*, 56, 7 : 1761-1772.

CANI P.D., R. BIBILONI, C. KNAUF, A. WAGET, A.M. NEYRINCK, N.M. DELZENNE et R. BURCELIN, 2008a « Changes in Gut Microbiota Control Metabolic Endotoxemia-Induced Inflammation in High-Fat Diet-Induced Obesity and Diabetes in Mice », *Diabetes*, 57, 6 : 1470-1481.

CANI P.D., N.M. DELZENNE, J. AMAR et R. BURCELIN, 2008b « Role of gut microflora in the development of obesity and insulin resistance following high-fat diet feeding », *Pathologie Biologie*, 56, 5 : 305-309.

CANTORAL A., A. MONTOYA, L. LUNA-VILLA, E.A. ROLDÁN-VALADEZ, M. HERNÁNDEZ-ÁVILA, D. KERSHENOBICH, W. PERNG, K.E. PETERSON, H. HU, J.A. RIVERA et M.M. TÉLLEZ-ROJO, 2020 « Overweight and obesity status from the prenatal period to adolescence and its association with Non-alcoholic fatty liver disease in young adults: cohort study », *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, n/a, n/a.

- CARIO E., G. GERKEN et D.K. PODOLSKY, 2007 « Toll-Like Receptor 2 Controls Mucosal Inflammation by Regulating Epithelial Barrier Function », *Gastroenterology*, 132, 4 : 1359-1374.
- CARO I., X. BOULENC, M. ROUSSET, V. MEUNIER, M. BOURRIÉ, B. JULIAN, H. JOYEUX, C. ROQUES, Y. BERGER, A. ZWEIBAUM et G. FABRE, 1995 « Characterisation of a newly isolated Caco-2 clone (TC-7), as a model of transport processes and biotransformation of drugs », *International Journal of Pharmaceutics*, 116, 2 : 147-158.
- CASIDA J.E. et K.A. DURKIN, 2013 « Anticholinesterase insecticide retrospective », *Chemico-biological interactions*, 203, 1 : 221-225.
- CAUGHLAN A., K. NEWHOUSE, U. NAMGUNG et Z. XIA, 2004 « Chlorpyrifos Induces Apoptosis in Rat Cortical Neurons that is Regulated by a Balance Between p38 and ERK/JNK MAP Kinases », *Toxicological Sciences*, 78, 1 : 125-134.
- CENCIČ A. et T. LANGERHOLC, 2010 « Functional cell models of the gut and their applications in food microbiology — A review », *International Journal of Food Microbiology*, 141 : S4-S14.
- CHAMBERS J.E. et H.W. CHAMBERS, 1989 « Oxidative desulfuration of chlorpyrifos, chlorpyrifos-methyl, and leptophos by rat brain and liver », *Journal of Biochemical Toxicology*, 4, 3 : 201-203.
- CHANTRET I., A. RODOLOSSE, A. BARBAT, E. DUSSAULX, E. BROT-LAROCHE, A. ZWEIBAUM et M. ROUSSET, 1994 « Differential expression of sucrase-isomaltase in clones isolated from early and late passages of the cell line Caco-2: evidence for glucose-dependent negative regulation », 13.
- CHARLES M.-A., C. DELPIERRE et B. BREANT, 2016 « Le concept des origines développementales de la santé - Évolution sur trois décennies », *médecine/sciences*, 32, 1 : 15-20.
- CHAROENPHANDHU N., K. TUDPOR, N. PULSOOK et N. KRISHNAMRA, 2006 « Chronic metabolic acidosis stimulated transcellular and solvent drag-induced calcium transport in the duodenum

- of female rats », *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 291, 3 : G446-G455.
- CHEN H., Z. XU, L. PENG, X. FANG, X. YIN, N. XU et P. CEN, 2006 « Recent advances in the research and development of human defensins », *Peptides*, 27, 4 : 931-940.
- CHEN T., L. YAO, D. KE, W. CAO, G. ZUO, L. ZHOU, J. JIANG, J. YAMAHARA, Y. LI et J. WANG, 2016 « Treatment with *Rhodiola crenulata* root extract ameliorates insulin resistance in fructose-fed rats by modulating sarcolemmal and intracellular fatty acid translocase/CD36 redistribution in skeletal muscle », *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16.
- CHEN W., L. FENG, Y. SHEN, H. SU, Y. LI, J. ZHUANG, L. ZHANG et X. ZHENG, 2013 « Myricitrin Inhibits Acrylamide-Mediated Cytotoxicity in Human Caco-2 Cells by Preventing Oxidative Stress », *BioMed Research International*, 2013.
- CHEN X.-M., I. ELISIA et D.D. KITTS, 2010 « Defining conditions for the co-culture of Caco-2 and HT29-MTX cells using Taguchi design », *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 61, 3 : 334-342.
- CHEN Y., Q. LU, E.E. SCHNEEBERGER et D.A. GOODENOUGH, 2000 « Restoration of Tight Junction Structure and Barrier Function by Down-Regulation of the Mitogen-activated Protein Kinase Pathway in Ras-transformed Madin-Darby Canine Kidney Cells », *Molecular Biology of the Cell*, 11, 3 : 849-862.
- CHIN A.M., D.R. HILL, M. AURORA et J.R. SPENCE, 2017 « Morphogenesis and maturation of the embryonic and postnatal intestine », *Seminars in cell & developmental biology*, 66 : 81-93.
- CHRISTMAS P., 2015 « Chapter Six - Role of Cytochrome P450s in Inflammation ». in J. P. Hardwick (dir.): *Advances in Pharmacology*. Cytochrome P450 Function and Pharmacological Roles in Inflammation and Cancer. 163-192. Academic Press.

- CLARKE R.E., A.L. DORDEVIC, S.M. TAN, L. RYAN et M.T. COUGHLAN, 2016 « Dietary Advanced Glycation End Products and Risk Factors for Chronic Disease: A Systematic Review of Randomised Controlled Trials », *Nutrients*, 8, 3.
- COCHRAN R.C., J. KISHIYAMA, C. ALDOUS, W.C. CARR et K.F. PFEIFER, 1995 « Chlorpyrifos: Hazard assessment based on a review of the effects of short-term and long-term exposure in animals and humans », *Food and Chemical Toxicology*, 33, 2 : 165-172.
- COCKER J., H.J. MASON, S.J. GARFITT et K. JONES, 2002 « Biological monitoring of exposure to organophosphate pesticides », *Toxicology Letters* : 7.
- COLDITZ G.A., 1995 « Weight Gain as a Risk Factor for Clinical Diabetes Mellitus in Women », *Annals of Internal Medicine*, 122, 7 : 481.
- COLLINS J.T., A. NGUYEN et M. BADIREDDY, 2020 « Anatomy, Abdomen and Pelvis, Small Intestine ». in *StatPearls*. Treasure Island (FL), StatPearls Publishing.
- COLT J.S., J. LUBIN, D. CAMANN, S. DAVIS, J. CERHAN, R.K. SEVERSON, W. COZEN et P. HARTGE, 2004 « Comparison of pesticide levels in carpet dust and self-reported pest treatment practices in four US sites », *Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology*, 14, 1 : 74-83.
- COMETA M.F., F.M. BURATTI, S. FORTUNA, P. LORENZINI, M.T. VOLPE, L. PARISI, E. TESTAI et A. MENEGUZZ, 2007 « Cholinesterase inhibition and alterations of hepatic metabolism by oral acute and repeated chlorpyrifos administration to mice », *Toxicology*, 234, 1 : 90-102.
- COOK T.J. et S.S. SHENOY, 2003 « Intestinal permeability of chlorpyrifos using the single-pass intestinal perfusion method in the rat », *Toxicology*, 184, 2 : 125-133.
- CORTÉS-ÁLVAREZ N.Y., C.R. VUELVAS-OLMOS, M.F. PINTO-GONZÁLEZ, J. GUZMÁN-MUÑIZ, O. GONZALEZ-PEREZ et N.A. MOY-LÓPEZ, 2020 « A high-fat diet during pregnancy impairs memory acquisition and increases leptin receptor expression in the hippocampus of rat offspring », *Nutritional Neuroscience* : 1-13.
- COSTA L.G., 2018 « Organophosphorus Compounds at 80: Some Old and New Issues », *Toxicological Sciences*, 162, 1 : 24-35.

- CROSNIER C., D. STAMATAKI et J. LEWIS, 2006 « Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control », *Nature Reviews Genetics*, 7, 5 : 349-359.
- CURHAN GARY C., WILLETT WALTER C., RIMM ERIC B., SPIEGELMAN DONNA, ASCHERIO ALBERTO L., et STAMPFER MEIR J., 1996 « Birth Weight and Adult Hypertension, Diabetes Mellitus, and Obesity in US Men », *Circulation*, 94, 12 : 3246-3250.
- CZAJKA M., M. MATYSIAK-KUCHAREK, B. JODŁOWSKA-JĘDRYCH, K. SAWICKI, B. FAŁ, B. DROP, M. KRUSZEWSKI et L. KAPKA-SKRZYPCZAK, 2019 « Organophosphorus pesticides can influence the development of obesity and type 2 diabetes with concomitant metabolic changes », *Environmental Research*, 178 : 108685.

D

- DARWICHE W., S. DELANAUD, S. DUPONT, H. GHAMLOUCH, W. RAMADAN, W. JOUMAA, V. BACH et J. GAY-QUÉHEILLARD, 2017 « Impact of prenatal and postnatal exposure to the pesticide chlorpyrifos on the contraction of rat ileal muscle strips: involvement of an inducible nitric oxide synthase-dependent pathway », *Neurogastroenterology and Motility: The Official Journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, 29, 2.
- DELNESTE Y., C. BEAUVILLAIN et P. JEANNIN, 2007 « Immunité naturelle: Structure et fonction des *Toll-like receptors* », *médecine/sciences*, 23, 1 : 67-74.
- DESPRÉS JEAN-PIERRE, 2012 « Body Fat Distribution and Risk of Cardiovascular Disease », *Circulation*, 126, 10 : 1301-1313.
- DESTOUMIEUX-GARZÓN D., P. MAVINGUI, G. BOETSCH, J. BOISSIER, F. DARRIET, P. DUBOZ, C. FRITSCH, P. GIRAUDOUX, F. LE ROUX, S. MORAND, C. PAILLARD, D. PONTIER, C. SUEUR et Y. VOITURON, 2018 « The One Health Concept: 10 Years Old and a Long Road Ahead », *Frontiers in Veterinary Science*, 5.
- DHAR P. et J. MCAULEY, 2019 « The Role of the Cell Surface Mucin MUC1 as a Barrier to Infection and Regulator of Inflammation », *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9.

- EATON D.L., R.B. DAROFF, H. AUTRUP, J. BRIDGES, P. BUFFLER, L.G. COSTA, J. COYLE, G. MCKHANN, W.C. MOBLEY, L. NADEL, D. NEUBERT, R. SCHULTE-HERMANN et P.S. SPENCER, 2008 « Review of the Toxicology of Chlorpyrifos With an Emphasis on Human Exposure and Neurodevelopment », *Critical Reviews in Toxicology*, 38, sup2 : 1-125.
- EDDLESTON M., N.A. BUCKLEY, P. EYER et A.H. DAWSON, 2008 « Management of acute organophosphorus pesticide poisoning », *Lancet*, 371, 9612 : 597-607.
- EFSA, 2019 « Statement on the available outcomes of the human health assessment in the context of the pesticides peer review of the active substance chlorpyrifos », *EFSA Journal*, 17, 8 : e05809.
- , 2018 « The 2016 European Union report on pesticide residues in food », *EFSA Journal*, 16, 7 : e05348.
- EL KHAYAT EL SABBOURI H., J. GAY-QUÉHEILLARD, W.H. JOUMAA, S. DELANAUD, M. GUIBOURDENCHE, W. DARWICHE, N. DJEKKOUN, V. BACH et W. RAMADAN, 2020 « Does the perigestational exposure to chlorpyrifos and/or high-fat diet affect respiratory parameters and diaphragmatic muscle contractility in young rats? », *Food and Chemical Toxicology*, 140 : 111322.
- ELDERMAN M., B. SOVRAN, F. HUGENHOLTZ, K. GRAVERSEN, M. HUIJSKES, E. HOUTSMA, C. BELZER, M. BOEKSCHOTEN, P. DE VOS, J. DEKKER, J. WELLS et M. FAAS, 2017 « The effect of age on the intestinal mucus thickness, microbiota composition and immunity in relation to sex in mice », *PLoS ONE*, 12, 9.
- ELLIOTT E.N. et K.H. KAESTNER, 2015 « Epigenetic Regulation of the Intestinal Epithelium », *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 72, 21 : 4139-4156.
- ELSHARKAWY E.E., D. YAHIA et N.A. EL-NISR, 2013 « Sub-chronic exposure to chlorpyrifos induces hematological, metabolic disorders and oxidative stress in rat: Attenuation by glutathione », *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 35, 2 : 218-227.
- ENGLE M.J., G.S. GOETZ et D.H. ALPERS, 1998 « Caco-2 cells express a combination of colonocyte and enterocyte phenotypes », *Journal of Cellular Physiology*, 174, 3 : 362-369.

ENSS M.-L., M. CORNBERG, S. WAGNER, A. GEBERT, M. HENRICH, R. EISENBLÄTTER, W. BEIL, R. KOWNATZKI et H.J. HEDRICH, 2000 « Proinflammatory cytokines trigger MUC gene expression and mucin release in the intestinal cancer cell line LS180 », *Inflammation Research*, 49, 4 : 162-169.

EPSTEIN E., F.L. KIECHLE, J.D. ARTISS et B. ZAK, 1986 « The clinical use of alkaline phosphatase enzymes », *Clinics in Laboratory Medicine*, 6, 3 : 491-505.

ESKENAZI BRENDA, MARKS AMY R., BRADMAN ASA, HARLEY KIM, BARR DANA B., JOHNSON CAROLINE, MORGAN NORMA, et JEWELL NICHOLAS P., 2007 « Organophosphate Pesticide Exposure and Neurodevelopment in Young Mexican-American Children », *Environmental Health Perspectives*, 115, 5 : 792-798.

F

FERRANNINI E., S. CAMASTRA, A. GASTALDELLI, A.M. SIRONI, A. NATALI, E. MUSCELLI, G. MINGRONE et A. MARI, 2004 « Beta-Cell Function in Obesity: Effects of Weight Loss », *Diabetes*, 53, suppl 3 : S26-S33.

FISH S.A., 1966 « Organophosphorus cholinesterase inhibitors and fetal development », *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 96, 8 : 1148-1154.

VAN DER FLIER L.G. et H. CLEVERS, 2009 « Stem Cells, Self-Renewal, and Differentiation in the Intestinal Epithelium », *Annual Review of Physiology*, 71, 1 : 241-260.

FORETZ M., N. TALEUX, B. GUIGAS, S. HORMAN, C. BEAULOYE, F. ANDREELLI, L. BERTRAND et B. VIOLLET, 2006 « Régulation du métabolisme énergétique par l'AMPK - Une nouvelle voie thérapeutique pour le traitement des maladies métaboliques et cardiaques », *médecine/sciences*, 22, 4 : 381-388.

FRIEDEWALD W.T., R.I. LEVY et D.S. FREDRICKSON, 1972 « Estimation of the Concentration of Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Plasma, Without Use of the Preparative Ultracentrifuge », 4.

FROST R.A., G.J. NYSTROM et C.H. LANG, 2002 « Lipopolysaccharide regulates proinflammatory cytokine expression in mouse myoblasts and skeletal muscle », *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 283, 3 : R698-R709.

FURLONG C.E., T.B. COLE, G.P. JARVIK, C. PETTAN-BREWER, G.K. GEISS, R.J. RICHTER, D.M. SHIH, A.D. TWARD, A.J. LUSIS et L.G. COSTA, 2005 « Role of Paraoxonase (PON1) Status in Pesticide Sensitivity: Genetic and Temporal Determinants », *NeuroToxicology*, 26, 4 : 651-659.

G

GARCIA-HERNANDEZ V., M. QUIROS et A. NUSRAT, 2017 « Intestinal epithelial claudins: expression and regulation in homeostasis and inflammation », *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1397, 1 : 66-79.

GIBSON D.L., C. MA, K.S.B. BERGSTROM, J.T. HUANG, C. MAN et B.A. VALLANCE, 2008 « MyD88 signalling plays a critical role in host defence by controlling pathogen burden and promoting epithelial cell homeostasis during *Citrobacter rodentium*-induced colitis », *Cellular Microbiology*, 10, 3 : 618-631.

GILLOIS K., M. LÉVÊQUE, V. THÉODOROU, H. ROBERT et M. MERCIER-BONIN, 2018 « Mucus: An Underestimated Gut Target for Environmental Pollutants and Food Additives », *Microorganisms*, 6, 2.

GOEL A., V. DANI et D.K. DHAWAN, 2005 « Protective effects of zinc on lipid peroxidation, antioxidant enzymes and hepatic histoarchitecture in chlorpyrifos-induced toxicity », *Chemico-Biological Interactions*, 156, 2-3 : 131-140.

GOLDRING M.B. et M. OTERO, 2011 « Inflammation in osteoarthritis », *Current opinion in rheumatology*, 23, 5 : 471-478.

GONZÁLEZ-BLÁZQUEZ R., M. ALCALÁ, M.S. FERNÁNDEZ-ALFONSO, P. VILLA-VALVERDE, M. VIANA, M. GIL-ORTEGA et B. SOMOZA, 2020 « Relevance of control diet choice in metabolic studies: impact in glucose homeostasis and vascular function », *Scientific Reports*, 10, 1 : 2902.

- GOODMAN B.E., 2010 « Insights into digestion and absorption of major nutrients in humans », *Advances in Physiology Education*, 34, 2 : 44-53.
- GRANT R.W. et V.D. DIXIT, 2015 « Adipose tissue as an immunological organ », *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 23, 3 : 512-518.
- GRIFFIN F.M. et F. REIMANN, 2016 « Enteroendocrine Cells: Chemosensors in the Intestinal Epithelium », *Annual Review of Physiology*, 78 : 277-299.
- GRIFFIN P., H. MASON, K. HEYWOOD et J. COCKER, 1999 « Oral and dermal absorption of chlorpyrifos: a human volunteer study », *Occupational and Environmental Medicine*, 56, 1 : 10-13.
- GRUNNET L.G., S. HANSEN, L. HJORT, C.M. MADSEN, F.B. KAMPMANN, A.C.B. THUESEN, C. GRANSTRØMI, M. STRØM, E. MASLOVA, R. FRIKKE-SCHMIDT, P. DAMM, J.E. CHAVARRO, F.B. HU, S.F. OLSEN et A. VAAG, 2017 « Adiposity, Dysmetabolic Traits, and Earlier Onset of Female Puberty in Adolescent Offspring of Women With Gestational Diabetes Mellitus: A Clinical Study Within the Danish National Birth Cohort », *Diabetes Care*, 40, 12 : 1746-1755.
- GUO F. et K.-L.C. JEN, 1995 « High-fat feeding during pregnancy and lactation affects offspring metabolism in rats », *Physiology & Behavior*, 57, 4 : 681-686.

H

- HABER A.L., M. BITON, N. ROGEL, R.H. HERBST, K. SHEKHAR, C. SMILLIE, G. BURGIN, T.M. DELOREY, M.R. HOWITT, Y. KATZ, I. TIROSH, S. BEYAZ, D. DIONNE, M. ZHANG, R. RAYCHOWDHURY, W.S. GARRETT, O. ROZENBLATT-ROSEN, H.N. SHI, O. YILMAZ, R.J. XAVIER et A. REGEV, 2017 « A single-cell survey of the small intestinal epithelium », *Nature*, 551, 7680 : 333-339.
- HALL J.E., A.A. DA SILVA, J.M. DO CARMO, J. DUBINION, S. HAMZA, S. MUNUSAMY, G. SMITH et D.E. STEC, 2010 « Obesity-induced Hypertension: Role of Sympathetic Nervous System, Leptin, and Melanocortins », *The Journal of Biological Chemistry*, 285, 23 : 17271-17276.

- HANSSON G.C., 2019 « Mucus and mucins in diseases of the intestinal and respiratory tracts », *Journal of Internal Medicine*, 285, 5 : 479-490.
- HARISHANKAR M.K., C. SASIKALA et M. RAMYA, 2013 « Efficiency of the intestinal bacteria in the degradation of the toxic pesticide, chlorpyrifos », *3 Biotech*, 3, 2 : 137-142.
- HAUSMANN M., S. KIESSLING, S. MESTERMANN, G. WEBB, T. SPÖTTL, T. ANDUS, J. SCHÖLMERICH, H. HERFARTH, K. RAY, W. FALK et G. ROGLER, 2002 « Toll-like receptors 2 and 4 are up-regulated during intestinal inflammation », *Gastroenterology*, 122, 7 : 1987-2000.
- HENEGHAN A.F., J.F. PIERRE et K.A. KUDSK, 2013 « JAK-STAT and intestinal mucosal immunology », *JAK-STAT*, 2, 4.
- HERMIER D., V. MATHÉ, A. LAN, C. SANTINI, A. QUIGNARD-BOULANGÉ, J.-F. HUNEAU et F. MARIOTTI, 2017 « Postprandial low-grade inflammation does not specifically require TLR4 activation in the rat », *Nutrition & Metabolism*, 14, 1 : 1-7.
- HERTZ-PICCIOTTO I., J.B. SASS, S. ENGEL, D.H. BENNETT, A. BRADMAN, B. ESKENAZI, B. LANPHEAR et R. WHYATT, 2018 « Organophosphate exposures during pregnancy and child neurodevelopment: Recommendations for essential policy reforms », *PLoS Medicine*, 15, 10.
- HEYMSFIELD S.B. et T.A. WADDEN, 2017 « Mechanisms, Pathophysiology, and Management of Obesity » D. L. Longo (dir.), *New England Journal of Medicine*, 376, 3 : 254-266.
- HILGENDORF C., H. SPAHN-LANGGUTH, C.G. REGÅRDH, E. LIPKA, G.L. AMIDON et P. LANGGUTH, 2000 « Caco-2 versus Caco-2/HT29-MTX co-cultured cell lines: permeabilities via diffusion, inside- and outside-directed carrier-mediated transport », *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 89, 1 : 63-75.
- HIROSUMI J., G. TUNCMAN, L. CHANG, C.Z. GÖRGÜN, K.T. UYSAL, K. MAEDA, M. KARIN et G.S. HOTAMISLIGIL, 2002 « A central role for JNK in obesity and insulin resistance », *Nature*, 420, 6913 : 333-336.
- HOLIK A.-K., B. LIEDER, N. KRETSCHY, M.M. SOMOZA, J.P. LEY, J. HANS et V. SOMOZA, 2018a « The advanced glycation end product Nε -carboxymethyllysine and its precursor glyoxal

- increase serotonin release from Caco-2 cells », *Journal of Cellular Biochemistry*, 119, 3 : 2731-2741.
- HOLIK A.-K., V. STÖGER, K. HÖLZ, M. M. SOMOZA et V. SOMOZA, 2018b « Impact of free N ε -carboxymethyllysine, its precursor glyoxal and AGE-modified BSA on serotonin release from human parietal cells in culture », *Food & Function*, 9, 7 : 3906-3915.
- HOLST J.J., F.K. KNOP, T. VILSBØLL, T. KRARUP et S. MADSBAD, 2011 « Loss of Incretin Effect Is a Specific, Important, and Early Characteristic of Type 2 Diabetes », *Diabetes Care*, 34, Supplement 2 : S251-S257.
- HOSHINO K., O. TAKEUCHI, T. KAWAI, H. SANJO, T. OGAWA, Y. TAKEDA, K. TAKEDA et S. AKIRA, 1999 « Cutting Edge: Toll-Like Receptor 4 (TLR4)-Deficient Mice Are Hyporesponsive to Lipopolysaccharide: Evidence for TLR4 as the Lps Gene Product », *The Journal of Immunology*, 162, 7 : 3749-3752.
- HOWELL G.E., S. KONDAKALA, J. HOLDRIDGE, J.H. LEE et M.K. ROSS, 2018 « Inhibition of cholinergic and non-cholinergic targets following subacute exposure to chlorpyrifos in normal and high fat fed male C57BL/6J mice », *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 118 : 821-829.
- HOWELL III G.E., C. MULLIGAN, D. YOUNG et S. KONDAKALA, 2016 « Exposure to chlorpyrifos increases neutral lipid accumulation with accompanying increased de novo lipogenesis and decreased triglyceride secretion in McArdle-RH7777 hepatoma cells », *Toxicology in Vitro*, 32 : 181-189.
- HRUBY A., J.E. MANSON, L. QI, V.S. MALIK, E.B. RIMM, Q. SUN, W.C. WILLETT et F.B. HU, 2016 « Determinants and Consequences of Obesity », *American Journal of Public Health*, 106, 9 : 1656-1662.
- HUET C., C. SAHUQUILLO-MERINO, E. COUDRIER et D. LOUVARD, 1987 « Absorptive and mucus-secreting subclones isolated from a multipotent intestinal cell line (HT-29) provide new models for cell polarity and terminal differentiation », *The Journal of Cell Biology*, 105, 1 : 345-357.

HUG H., M.H. MOHAJERI et G. LA FATA, 2018 « Toll-Like Receptors: Regulators of the Immune Response in the Human Gut », *Nutrients*, 10, 2.

HUNTER D.L., T.L. LASSITER et S. PADILLA, 1999 « Gestational Exposure to Chlorpyrifos: Comparative Distribution of Trichloropyridinol in the Fetus and Dam », *Toxicology and Applied Pharmacology*, 158, 1 : 16-23.

I

INSERM, 2019 « Obésité », *Inserm - La science pour la santé*. site internet (<https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/obesite>), consulté le 18 mai 2020.

INTERNATIONAL PROGRAM ON CHEMICAL SAFETY, INTER-ORGANIZATION PROGRAMME FOR THE SOUND MANAGEMENT OF CHEMICALS, et WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010 *WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification 2009*. Geneva, World Health Organization.

ITO M., J. SUZUKI, S. TSUJIOKA, M. SASAKI, A. GOMORI, T. SHIRAKURA, H. HIROSE, M. ITO, A. ISHIHARA, H. IWAASA et A. KANATANI, 2007 « Longitudinal analysis of murine steatohepatitis model induced by chronic exposure to high-fat diet », *Hepatology Research*, 37, 1 : 50-57.

J

JANSSENS S. et R. BEYAERT, 2003 « Role of Toll-Like Receptors in Pathogen Recognition », *Clinical Microbiology Reviews*, 16, 4 : 637-646.

JANVIER LABS, 2011 « Rat WISTAR », *Janvier Labs*. site internet (https://www.janvier-labs.com/fiche_produit/rat_wistar/), consulté le 27 juillet 2020.

JIANG G. et B.B. ZHANG, 2003 « Glucagon and regulation of glucose metabolism », *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 284, 4 : E671-E678.

- JOHANSSON M.E.V. et G.C. HANSSON, 2016 « Immunological aspects of intestinal mucus and mucins », *Nature reviews. Immunology*, 16, 10 : 639-649.
- JOHANSSON M.E.V., H.E. JAKOBSSON, J. HOLMÉN-LARSSON, A. SCHÜTTE, A. ERMUND, A.M. RODRÍGUEZ-PIÑEIRO, L. ARIKE, C. WISING, F. SVENSSON, F. BÄCKHED et G.C. HANSSON, 2015 « Normalization of host intestinal mucus layers requires long-term microbial colonization », *Cell host & microbe*, 18, 5 : 582-592.
- JOKANOVIĆ M., 2001 « Biotransformation of organophosphorus compounds », *Toxicology*, 166, 3 : 139-160.
- JOLY CONDETTE C., V. BACH, C. MAYEUR, J. GAY-QUÉHEILLARD et H. KHORSI-CAUET, 2015 « Chlorpyrifos Exposure During Perinatal Period Affects Intestinal Microbiota Associated With Delay of Maturation of Digestive Tract in Rats », *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 61, 1 : 30-40.
- JOLY CONDETTE C., H. KHORSI-CAUET, P. MORLIÈRE, L. ZABIJAK, J. REYGNER, V. BACH et J. GAY-QUÉHEILLARD, 2014 « Increased Gut Permeability and Bacterial Translocation after Chronic Chlorpyrifos Exposure in Rats », *PLoS ONE*, 9, 7.

K

- KAIZER R.R., A.C. DA SILVA, V.M. MORSCH, M.C. CORRÊA et M.R.C. SCHETINGER, 2004 « Diet-induced changes in AChE activity after long-term exposure », *Neurochemical Research*, 29, 12 : 2251-2255.
- KAMAI E.M., T.F. MCEL RATH et K.K. FERGUSON, 2019 « Fetal growth in environmental epidemiology: mechanisms, limitations, and a review of associations with biomarkers of non-persistent chemical exposures during pregnancy », *Environmental Health*, 18.
- KARLSSON J., A. WIKMAN et P. ARTURSSON, 1993 « The mucus layer as a barrier to drug absorption in monolayers of human intestinal epithelial HT29-H goblet cells », *International Journal of Pharmaceutics*, 99, 2 : 209-218.

- KHALAF H., I. DEMIREL et T. BENGSSON, 2013 « Suppression of inflammatory gene expression in T cells by *Porphyromonas gingivalis* is mediated by targeting MAPK signaling », *Cellular & Molecular Immunology*, 10, 5 : 413-422.
- KHAN M.J., K. GERASIMIDIS, C.A. EDWARDS et M.G. SHAIKH, 2016 « Role of Gut Microbiota in the Aetiology of Obesity: Proposed Mechanisms and Review of the Literature », *Journal of Obesity*, 2016.
- KHOSLA T. et C.R. LOWE, 1967 « Indices of obesity derived from body weight and height. », *British Journal of Preventive & Social Medicine*, 21, 3 : 122-128.
- KIM K.-A., W. GU, I.-A. LEE, E.-H. JOH et D.-H. KIM, 2012 « High Fat Diet-Induced Gut Microbiota Exacerbates Inflammation and Obesity in Mice via the TLR4 Signaling Pathway », *PLoS ONE*, 7, 10.
- KIM Y.S. et S.B. HO, 2010 « Intestinal Goblet Cells and Mucins in Health and Disease: Recent Insights and Progress », *Current Gastroenterology Reports*, 12, 5 : 319-330.
- KIU H. et S.E. NICHOLSON, 2012 « Biology and significance of the JAK/STAT signalling pathways », *Growth Factors*, 30, 2 : 88-106.
- KLEINER D.E., E.M. BRUNT, M.V. NATTA, C. BEHLING, M.J. CONTOS, O.W. CUMMINGS, L.D. FERRELL, Y.-C. LIU, M.S. TORBENSON, A. UNALP-ARIDA, M. YEH, A.J. MCCULLOUGH et A.J. SANYAL, 2005 « Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease », *Hepatology*, 41, 6 : 1313-1321.
- KLEINRIDERS A., D. SCHENTEN, A.C. KÖNNER, B.F. BELGARDT, J. MAUER, T. OKAMURA, F.T. WUNDERLICH, R. MEDZHITOV et J.C. BRÜNING, 2009 « MyD88 signaling in the CNS is required for development of fatty acid induced leptin resistance and diet-induced obesity », *Cell metabolism*, 10, 4 : 249-259.
- KOELLE G.B. dir., 1963 *Cholinesterases and Anticholinesterase Agents*. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag.

- KONDAKALA S., J.H. LEE, M.K. ROSS et G.E. HOWELL, 2017 « Effects of acute exposure to chlorpyrifos on cholinergic and non-cholinergic targets in normal and high-fat fed male C57BL/6J mice », *Toxicology and Applied Pharmacology*, 337 : 67-75.
- KOUSBA A.A., T.S. POET et C. TIMCHALK, 2007 « Age-Related Brain Cholinesterase Inhibition Kinetics following In Vitro Incubation with Chlorpyrifos-Oxon and Diazinon-Oxon », *Toxicological Sciences*, 95, 1 : 147-155.
- KUCHAY M.S., N.S. CHOUDHARY et S.K. MISHRA, 2020 « Pathophysiological mechanisms underlying MAFLD », *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 14, 6 : 1875-1887.
- KÜNNCKE B., P. VERRY, A. BÉNDARDEAU et M.V. KIENLIN, 2004 « Quantitative Body Composition Analysis in Awake Mice and Rats by Magnetic Resonance Relaxometry », *Obesity Research*, 12, 10 : 1604-1615.
- KURLAND A.R., H. SCHREINER et G. DIAMOND, 2006 « In vivo β -defensin gene expression in rat gingival epithelium in response to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* infection », *Journal of periodontal research*, 41, 6 : 567-572.

L

- DE LA SERRE C.B., C.L. ELLIS, J. LEE, A.L. HARTMAN, J.C. RUTLEDGE et H.E. RAYBOULD, 2010 « Propensity to high-fat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation », *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 299, 2 : G440-G448.
- LAPORTE B., J. GAY-QUÉHEILLARD, V. BACH et A.-S. VILLÉGIER, 2018 « Developmental neurotoxicity in the progeny after maternal gavage with chlorpyrifos », *Food and Chemical Toxicology*, 113 : 66-72.

- LASRAM M.M., I.B. DHOUIB, A. ANNABI, S. EL FAZAA et N. GHARBI, 2014 « A review on the molecular mechanisms involved in insulin resistance induced by organophosphorus pesticides », *Toxicology*, 322 : 1-13.
- LASSITER T., 1999 « Gestational exposure to chlorpyrifos: dose response profiles for cholinesterase and carboxylesterase activity », *Toxicological Sciences*, 52, 1 : 92-100.
- LASSITER T.L. et S. BRIMIJOIN, 2008 « Rats gain excess weight after developmental exposure to the organophosphorothionate pesticide, chlorpyrifos », *Neurotoxicology and Teratology*, 30, 2 : 125-130.
- LASSITER T.L., S. PADILLA, S.R. MORTENSEN, S.M. CHANDA, V.C. MOSER et S. BARONE, 1998 « Gestational Exposure to Chlorpyrifos: Apparent Protection of the Fetus? », *Toxicology and Applied Pharmacology*, 152, 1 : 56-65.
- LASSITER T.L., I.T. RYDE, E.D. LEVIN, F.J. SEIDLER et T.A. SLOTKIN, 2010 « Neonatal exposure to parathion alters lipid metabolism in adulthood: Interactions with dietary fat intake and implications for neurodevelopmental deficits », *Brain Research Bulletin*, 81, 1 : 85-91.
- LASSITER T.L., I.T. RYDE, E.A. MACKILLOP, K.K. BROWN, E.D. LEVIN, F.J. SEIDLER et T.A. SLOTKIN, 2008 « Exposure of neonatal rats to parathion elicits sex-selective reprogramming of metabolism and alters the response to a high-fat diet in adulthood », *Environmental Health Perspectives*, 116, 11 : 1456-1462.
- LAVOIE J.-M. et M.-S. GAUTHIER, 2006 « Regulation of fat metabolism in the liver: link to non-alcoholic hepatic steatosis and impact of physical exercise », *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 63, 12 : 1393-1409.
- LECOEUR S., B. VIDEMANN et M. MAZALLON, 2006 « Effect of organophosphate pesticide diazinon on expression and activity of intestinal P-glycoprotein », *Toxicology Letters*, 161, 3 : 200-209.
- LECOUTRE S., B. DERACINOIS, C. LABORIE, D. EBERLÉ, C. GUINEZ, P.E. PANCHENKO, J. LESAGE, D. VIEAU, C. JUNIEN, A. GABORY et C. BRETON, 2016 « Depot- and sex-specific effects of maternal obesity in offspring's adipose tissue », *The Journal of Endocrinology*, 230, 1 : 39-53.

- LECOUTRE S., F. OGER, C. POURPE, L. BUTRUILLE, L. MAROUSEZ, A. DICKES-COOPMAN, C. LABORIE, C. GUINEZ, J. LESAGE, D. VIEAU, C. JUNIEN, D. EBERLÉ, A. GABORY, J. ECKHOUTE et C. BRETON, 2017 « Maternal obesity programs increased leptin gene expression in rat male offspring via epigenetic modifications in a depot-specific manner », *Molecular Metabolism*, 6, 8 : 922-930.
- LEE B., K.M. MOON et C.Y. KIM, 2018 « Tight Junction in the Intestinal Epithelium: Its Association with Diseases and Regulation by Phytochemicals », *Journal of Immunology Research*, 2018.
- LEE D.H., K.Y. JUNG, Y.H. CHOI et Y.J. CHEON, 2014 « Body mass index as a prognostic factor in organophosphate-poisoned patients », *The American Journal of Emergency Medicine*, 32, 7 : 693-696.
- LEMIEUX ISABELLE, PASCOT AGNES, COUILLARD CHARLES, LAMARCHE BENOÎT, TCHERNOF ANDRE, ALMERAS NATALIE, BERGERON JEAN, GAUDET DANIEL, TREMBLAY GERALD, PRUD'HOMME DENIS, NADEAU ANDRE, et DESPRES JEAN-PIERRE, 2000 « Hypertriglyceridemic Waist », *Circulation*, 102, 2 : 179-184.
- LEÓN-RODRÍGUEZ M. del C.P. de, J.-P. GUYOT et C. LAURENT-BABOT, 2019 « Intestinal in vitro cell culture models and their potential to study the effect of food components on intestinal inflammation », *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59, 22 : 3648-3666.
- LEOPOLDO A.S., A.P. LIMA-LEOPOLDO, A.F. NASCIMENTO, R.A.M. LUVIZOTTO, M.M. SUGIZAKI, D.H.S. CAMPOS, D.C.T. DA SILVA, C.R. PADOVANI et A.C. CICOINA, 2016 « Classification of different degrees of adiposity in sedentary rats », *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 49, 4.
- LI N., P. LEWIS, D. SAMUELSON, K. LIBONI et J. NEU, 2004 « Glutamine regulates Caco-2 cell tight junction proteins », 287 : 9.
- LI N. et J. NEU, 2009 « Glutamine Deprivation Alters Intestinal Tight Junctions via a PI3-K/Akt Mediated Pathway in Caco-2 Cells », *The Journal of Nutrition*, 139, 4 : 710-714.

- LI T.-T., Y.-Y. LIU, X.-Z. WAN, Z.-R. HUANG, B. LIU et C. ZHAO, 2018 « Regulatory Efficacy of the Polyunsaturated Fatty Acids from Microalgae *Spirulina platensis* on Lipid Metabolism and Gut Microbiota in High-Fat Diet Rats », *International Journal of Molecular Sciences*, 19, 10.
- LICHTMAN S.N., R.B. SARTOR, J. KEKU et J.H. SCHWAB, 1990 « Hepatic inflammation in rats with experimental small intestinal bacterial overgrowth », *Gastroenterology*, 98, 2 : 414-423.
- LIM T.-G., B.K. LEE, J.Y. KWON, S.K. JUNG et K.W. LEE, 2011 « Acrylamide up-regulates cyclooxygenase-2 expression through the MEK/ERK signaling pathway in mouse epidermal cells », *Food and Chemical Toxicology* : 6.
- LINDÉN S.K., T.H.J. FLORIN et M.A. MCGUCKIN, 2008 « Mucin Dynamics in Intestinal Bacterial Infection », *PLoS ONE*, 3, 12.
- LINDSAY K.L., S. ENTRINGER, C. BUSS et P.D. WADHWA, 2020 « Intergenerational transmission of the effects of maternal exposure to childhood maltreatment on offspring obesity risk: A fetal programming perspective », *Psychoneuroendocrinology*, 116 : 104659.
- LIU T., L. ZHANG, D. JOO et S.-C. SUN, 2017 « NF- κ B signaling in inflammation », *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2 : 17023.
- LONG C., Y. XIAO, S. LI, X. TANG, Z. YUAN et Y. BAI, 2019 « Identification of optimal endogenous reference RNAs for RT-qPCR normalization in hindgut of rat models with anorectal malformations », *PeerJ*, 7.

M

- MA T. et J.E. CHAMBERS, 1994 « Kinetic parameters of desulfuration and dearylation of parathion and chlorpyrifos by rat liver microsomes », *Food and Chemical Toxicology*, 32, 8 : 763-767.

- MA T.Y., G.K. IWAMOTO, N.T. HOA, V. AKOTIA, A. PEDRAM, M.A. BOIVIN et H.M. SAID, 2004 « TNF- α -induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability requires NF- κ B activation », *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 286, 3 : G367-G376.
- MAHLER G.J., M.L. SHULER et R.P. GLAHN, 2009 « Characterization of Caco-2 and HT29-MTX cocultures in an in vitro digestion/cell culture model used to predict iron bioavailability », *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 20, 7 : 494-502.
- MAITRE M. et J.F. BICKLE, 2008 « Métabolismes hépatiques », 16.
- MANSON J.E., W.C. WILLETT, M.J. STAMPFER, G.A. COLDITZ, D.J. HUNTER, S.E. HANKINSON, C.H. HENNEKENS et F.E. SPEIZER, 1995 « Body Weight and Mortality among Women », *New England Journal of Medicine*, 333, 11 : 677-685.
- MANSOUR S. et A. MOSSA, 2010 « Adverse effects of lactational exposure to chlorpyrifos in suckling rats », *Human & Experimental Toxicology*, 29, 2 : 77-92.
- MARCHESINI G., M. BRIZI, G. BIANCHI, S. TOMASSETTI, E. BUGIANESI, M. LENZI, A.J. MCCULLOUGH, S. NATALE, G. FORLANI et N. MELCHIONDA, 2001 « Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Feature of the Metabolic Syndrome », *Diabetes*, 50, 8 : 1844-1850.
- MARION R., M.M. COEFFIER, G. GARGALA, P. DUCROTTÉ et P.P. DÉCHELOTTE, 2004 « Glutamine and CXC chemokines IL-8, Mig, IP-10 and I-TAC in human intestinal epithelial cells », *Clinical Nutrition (Edinburgh, Scotland)*, 23, 4 : 579-585.
- MARTINI C.N., M. GABRIELLI, J.N. BRANDANI et M. del C. VILA, 2016 « Glyphosate Inhibits PPAR Gamma Induction and Differentiation of Preadipocytes and is able to Induce Oxidative Stress », *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 30, 8 : 404-413.
- MARTINI C.N., M. GABRIELLI et M. del C. VILA, 2012 « A commercial formulation of glyphosate inhibits proliferation and differentiation to adipocytes and induces apoptosis in 3T3-L1 fibroblasts », *Toxicology in Vitro*, 26, 6 : 1007-1013.

- MATTSSON J.L., J.P.J. MAURISSEN, R.J. NOLAN et K.A. BRZAK, 2000 « Lack of Differential Sensitivity to Cholinesterase Inhibition in Fetuses and Neonates Compared to Dams Treated Perinatally with Chlorpyrifos », *Toxicological Sciences*, 53, 2 : 438-446.
- MATTSSON J.L., J.W. WILMER, M.R. SHANKAR, N.M. BERDASCO, J.W. CRISSMAN, J.P. MAURISSEN et D.M. BOND, 1996 « Single-dose and 13-week repeated-dose neurotoxicity screening studies of chlorpyrifos insecticide », *Food and Chemical Toxicology*, 34, 4 : 393-405.
- MAURISSEN J.P., A.M. HOBERMAN, R.H. GARMAN et T.R. HANLEY, 2000 « Lack of selective developmental neurotoxicity in rat pups from dams treated by gavage with chlorpyrifos », *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, 57, 2 : 250-263.
- MCCLURE R. et P. MASSARI, 2014 « TLR-Dependent Human Mucosal Epithelial Cell Responses to Microbial Pathogens », *Frontiers in Immunology*, 5.
- MCCOLLISTER S.B., R.J. KOCIBA, C.G. HUMISTON, D.D. MCCOLLISTER et P.J. GEHRING, 1974 « Studies of the acute and long-term oral toxicity of chlorpyrifos (O,O-diethyl-O-(3,5,6-trichloro-2-pyridyl) phosphorothioate) », *Food and Cosmetics Toxicology*, 12, 1 : 45-61.
- MCCULLOUGH A.J., 2004 « The clinical features, diagnosis and natural history of nonalcoholic fatty liver disease », *Clinics in Liver Disease*, 8, 3 : 521-533.
- MCCURDY C.E., J.M. BISHOP, S.M. WILLIAMS, B.E. GRAYSON, M.S. SMITH, J.E. FRIEDMAN et K.L. GROVE, 2009 « Maternal high-fat diet triggers lipotoxicity in the fetal livers of nonhuman primates », *The Journal of Clinical Investigation*, 119, 2 : 323-335.
- MCDONNELL-DOWLING K., S. KLEEFELD et J.P. KELLY, 2017 « Consequences of Oral Gavage during Gestation and Lactation on Rat Dams and the Neurodevelopment and Behavior of Their Offspring », *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS*, 56, 1 : 79-83.
- MEDZHITOV R. et C.A. JANEWAY, 1997 « Innate Immunity: The Virtues of a Nonclonal System of Recognition », *Cell*, 91, 3 : 295-298.

- MEDZHITOV R., P. PRESTON-HURLBURT, E. KOPP, A. STADLEN, C. CHEN, S. GHOSH et C.A. JANEWAY, 1998 « MyD88 Is an Adaptor Protein in the hToll/IL-1 Receptor Family Signaling Pathways », *Molecular Cell*, 2, 2 : 253-258.
- MEGGS W.J. et K.L. BREWER, 2007 « Weight gain associated with chronic exposure to chlorpyrifos in rats », *Journal of Medical Toxicology*, 3, 3 : 89-93.
- MELGAR-ROJAS P., J.C. ALVARADO, V. FUENTES-SANTAMARÍA, M.C. GABALDÓN-ULL et J.M. JUIZ, 2015 « Validation of Reference Genes for RT-qPCR Analysis in Noise-Induced Hearing Loss: A Study in Wistar Rat », *PLoS ONE*, 10, 9.
- MESNAGE R., G. RENNEY, G.-E. SÉRALINI, M. WARD et M.N. ANTONIOU, 2017 « Multiomics reveal non-alcoholic fatty liver disease in rats following chronic exposure to an ultra-low dose of Roundup herbicide », *Scientific Reports*, 7, 1 : 39328.
- MEYER A., F.J. SEIDLER et T.A. SLOTKIN, 2004 « Developmental effects of chlorpyrifos extend beyond neurotoxicity: critical periods for immediate and delayed-onset effects on cardiac and hepatic cell signaling. », *Environmental Health Perspectives*, 112, 2 : 170-178.
- MI D., H. FANG, Y. ZHAO et L. ZHONG, 2017 « Birth weight and type 2 diabetes: A meta-analysis », *Experimental and Therapeutic Medicine*, 14, 6 : 5313-5320.
- MINISTERE DE LA TRANSITION ECOLOGIQUE, 2020 « Produits biocides », *Ministère de la Transition écologique*. site internet (<https://www.ecologie.gouv.fr/produits-biocides>), consulté le 25 août 2020.
- MIQUILENA-COLINA M.E., E. LIMA-CABELLO, S. SÁNCHEZ-CAMPOS, M.V. GARCÍA-MEDIAVILLA, M. FERNÁNDEZ-BERMEJO, T. LOZANO-RODRÍGUEZ, J. VARGAS-CASTRILLÓN, X. BUQUÉ, B. OCHOA, P. ASPICHUETA, J. GONZÁLEZ-GALLEGU et C. GARCÍA-MONZÓN, 2011 « Hepatic fatty acid translocase CD36 upregulation is associated with insulin resistance, hyperinsulinaemia and increased steatosis in non-alcoholic steatohepatitis and chronic hepatitis C », *Gut*, 60, 10 : 1394-1402.

- MITSOU, E.; DUPIN, A.; SASSI, A.H.; MONTEIL, J.; SOTIROUDIS, G.T.; LEAL-CALDERON, F.; XENAKIS, A. « Hydroxytyrosol En-capsulated in Biocompatible Water-in-Oil Microemulsions: How the Structure Affects in Vitro Absorption ». *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2019, 184, 110482, doi:10.1016/j.colsurfb.2019.110482.
- MONTEIRO C.A., G. CANNON, J.-C. MOUBARAC, R.B. LEVY, M.L.C. LOUZADA et P.C. JAIME, 2017 « The UN Decade of Nutrition, the NOVA food classification and the trouble with ultra-processing », 13.
- MONTGOMERY M.P., F. KAMEL, T.M. SALDANA, M.C.R. ALAVANJA et D.P. SANDLER, 2008 « Incident Diabetes and Pesticide Exposure among Licensed Pesticide Applicators: Agricultural Health Study, 1993-2003 », *American Journal of Epidemiology*, 167, 10 : 1235-1246.
- MORGANSTERN I., Z. YE, S. LIANG, S. FAGAN et S.F. LEIBOWITZ, 2012 « Involvement of cholinergic mechanisms in the behavioral effects of dietary fat consumption », *Brain research*, 1470 : 24-34.
- MOSTAFALOU S. et M. ABDOLLAHI, 2017 « Pesticides: an update of human exposure and toxicity », *Archives of Toxicology*, 91, 2 : 549-599.
- MUKHERJEE R., K.T. LOCKE, B. MIAO, D. MEYERS, H. MONSHIZADEGAN, R. ZHANG, D. SEARCH, D. GRIMM, M. FLYNN, K.M. O'MALLEY, L. ZHANG, J. LI, Y. SHI, L.J. KENNEDY, M. BLANAR, P.T. CHENG, J. TINO et R.A. SRIVASTAVA, 2008 « Novel Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α Agonists Lower Low-Density Lipoprotein and Triglycerides, Raise High-Density Lipoprotein, and Synergistically Increase Cholesterol Excretion with a Liver X Receptor Agonist », *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 327, 3 : 716-726.
- MUÑOZ-QUEZADA M.T., B.A. LUCERO, D.B. BARR, K. STEENLAND, K. LEVY, P.B. RYAN, V. IGLESIAS, S. ALVARADO, C. CONCHA, E. ROJAS et C. VEGA, 2013 « Neurodevelopmental effects in children associated with exposure to organophosphate pesticides: a systematic review », *Neurotoxicology*, 39 : 158-168.

N

- NAKADAI A., Q. LI et T. KAWADA, 2006 « Chlorpyrifos induces apoptosis in human monocyte cell line U937 », *Toxicology*, 224, 3 : 202-209.
- NCIBI S., M. BEN OTHMAN, A. AKACHA, M.N. KRIFI et L. ZOURGUI, 2008 « Opuntia ficus indica extract protects against chlorpyrifos-induced damage on mice liver », *Food and Chemical Toxicology*, 46, 2 : 797-802.
- NDONWI E.N., B. ATOGHO-TIEDEU, E. LONTCHI-YIMAGOU, T.S. SHINKAFI, D. NANFA, E.V. BALTI, R. INDUSMITA, A. MAHMOOD, J.-C. KATTE, A. MBANYA, T. MATSHA, J.C. MBANYA, A. SHAKIR et E. SOBNGWI, 2019 « Gestational Exposure to Pesticides Induces Oxidative Stress and Lipid Peroxidation in Offspring that Persist at Adult Age in an Animal Model », *Toxicological Research*, 35, 3 : 241-248.
- NIXON JP., M. ZHANG, C. WANG, M. KUSKOWSKI, C. NOVAK, J. LEVINE, C. BILLINGTON et C. KOTZ, 2010 « Evaluation of a quantitative magnetic resonance imaging system for whole body composition analysis in rodents », *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 18, 8 : 1652-1659.
- NOLAN R.J., D.L. RICK, N.L. FRESHOUR et J.H. SAUNDERS, 1984 « Chlorpyrifos: pharmacokinetics in human volunteers », *Toxicology and Applied Pharmacology*, 73, 1 : 8-15.
- NOLLEVAUX G., C. DEVILLÉ, B. EL MOUALIJ, W. ZORZI, P. DELOYER, Y.-J. SCHNEIDER, O. PEULEN et G. DANDRIFOSSE, 2006 « Development of a serum-free co-culture of human intestinal epithelium cell-lines (Caco-2/HT29-5M21) », *BMC Cell Biology*, 7, 1 : 20.

O

- OBEPI-ROCHE, 2012 *Enquête épidémiologique nationale sur le surpoids et l'obésité*. Paris, Inserm/TNS Healthcare/Roche.

- OHMORI N., K. ITOI, F. TOZAWA, Y. SAKAI, K. SAKAI, N. HORIBA, H. DEMURA et T. SUDA, 1995 « Effect of acetylcholine on corticotropin-releasing factor gene expression in the hypothalamic paraventricular nucleus of conscious rats », *Endocrinology*, 136, 11 : 4858-4863.
- OLIVEROS E., V.K. SOMERS, O. SOCHOR, K. GOEL et F. LOPEZ-JIMENEZ, 2014 « The Concept of Normal Weight Obesity », *Progress in Cardiovascular Diseases*, 56, 4 : 426-433.
- OMS, 2020 « Obesity and overweight », site internet (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>), consulté le 18 mai 2020.
- , 2017 « OMS | Obésité de l'enfant: faits et chiffres », *WHO*. site internet (<http://www.who.int/end-childhood-obesity/facts/fr/>), consulté le 15 juin 2020.
- OSTREA E.M., D.M. BIELAWSKI, N.C. POSECION, M. CORRION, E. VILLANUEVA-UY, R.C. BERNARDO, Y. JIN, J.J. JANISSE et J.W. AGER, 2009 « Combined analysis of prenatal (maternal hair and blood) and neonatal (infant hair, cord blood and meconium) matrices to detect fetal exposure to environmental pesticides », *Environmental research*, 109, 1 : 116-122.

P

- PÁCHA J., 2000 « Development of Intestinal Transport Function in Mammals », *Physiological Reviews*, 80, 4 : 1633-1667.
- PALUMBO P., F. LOMBARDI, M.G. CIFONE et B. CINQUE, 2019 « The Epithelial Barrier Model Shows That the Properties of VSL#3 Depend from Where it is Manufactured », *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders Drug Targets*, 19, 2 : 199-206.
- PENKOVA N.I., G.A. BALTADJIEV, Y.A. KOEVA, P.K. ATANASSOVA, V.N. ANDONOV et V.A. TRICHKOVA, 2010 « Prenatal and postnatal differentiation of the small intestine in rat », *Folia Medica*, 52, 1 : 54-62.
- PERIS-SAMPEDRO F., M. CABRÉ, P. BASAURE, I. REVERTE, J.L. DOMINGO et M. TERESA COLOMINA, 2015 « Adulthood dietary exposure to a common pesticide leads to an obese-like phenotype and a diabetic profile in apoE3 mice », *Environmental Research*, 142 : 169-176.

- PERNG W., E. OKEN et D. DABELEA, 2019 « Developmental overnutrition and obesity and type 2 diabetes in offspring », *Diabetologia*, 62, 10 : 1779-1788.
- PFAFFL M.W., A. TICHOPAD, C. PRGOMET et T.P. NEUVIANS, 2004 « Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations », *Biotechnology Letters*, 26, 6 : 509-515.
- PHILLIPS D.I.W., S. HIRST, C.N. CLARK et C. OSMOND, 1994 « Fetal growth and insulin secretion in adult life », 5.
- PICKETT M.A., M.K. DUSH et N.M. NASCONE-YODER, 2017 « Acetylcholinesterase plays a non-neuronal, non-esterase role in organogenesis », *Development (Cambridge, England)*, 144, 15 : 2764-2770.
- PINDJAKOVA J., C. SARTINI, O. LO RE, F. RAPPA, B. COUPE, B. LELOUVIER, V. PAZIENZA et M. VINCIGUERRA, 2017 « Gut Dysbiosis and Adaptive Immune Response in Diet-induced Obesity vs. Systemic Inflammation », *Frontiers in Microbiology*, 8.
- PINTO M., S. ROBINE-LEON, M. APPAY, M. KEDINGER, N. TRIADOU, E. DUSSAULTX, B. LACROIX, P. SIMON-ASSMANN, K. HAFFEN, J. FOGH et A. ZWEIBAUM, 1983 « Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture », *Biology of the Cell*, 47, 323-330.
- PONTIER C., J. PACHOT, R. BOTHAM, B. LENFANT et P. ARNAUD, 2001 « HT29-MTX and Caco-2/TC7 Monolayers as Predictive Models for Human Intestinal Absorption: Role of the Mucus Layer », *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 90, 10 : 1608-1619.
- POULIOT M.-C., J.-P. DESPRÉS, S. LEMIEUX, S. MOORJANI, C. BOUCHARD, A. TREMBLAY, A. NADEAU et P.J. LUPIEN, 1994 « Waist circumference and abdominal sagittal diameter: Best simple anthropometric indexes of abdominal visceral adipose tissue accumulation and related cardiovascular risk in men and women », *The American Journal of Cardiology*, 73, 7 : 460-468.
- PRENTICE A.M. et S.A. JEBB, 2001 « Beyond body mass index », *Obesity Reviews*, 2, 3 : 141-147.

PURCELL R.H., B. SUN, L.L. PASS, M.L. POWER, T.H. MORAN et K.L.K. TAMASHIRO, 2011 « Maternal stress and high-fat diet effect on maternal behavior, milk composition, and pup ingestive behavior », *Physiology & behavior*, 104, 3 : 474-479.

PURKAYASTHA S., G. ZHANG et D. CAI, 2011 « Uncoupling Obesity-related Hypertension by Targeting Hypothalamic IKK β /NF- κ B », *Nature medicine*, 17, 7 : 883-887.

R

RABOT S., 2015 « Axe intestin-cerveau : comment le microbiote intestinal influence la réponse au stress », *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*, 3 : 267.

RADHAKRISHNAN S., J.-Y. KE et M.A. PELLIZZON, 2020 « Targeted Nutrient Modifications in Purified Diets Differentially Affect Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Metabolic Disease Development in Rodent Models », *Current Developments in Nutrition*, 4, 6.

RAHIMI R. et M. ABDOLLAHI, 2007 « A review on the mechanisms involved in hyperglycemia induced by organophosphorus pesticides », *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 88, 2 : 115-121.

RAKOFF-NAHOUM S., J. PAGLINO, F. ESLAMI-VARZANEH, S. EDBERG et R. MEDZHITOV, 2004 « Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis », *Cell*, 118, 2 : 229-241.

RANALDI G., R. CONSALVO, Y. SAMBUY et M.L. SCARINO, 2003 « Permeability characteristics of parental and clonal human intestinal Caco-2 cell lines differentiated in serum-supplemented and serum-free media », *Toxicology in Vitro* : 7.

RAO J.N. et J.-Y. WANG, 2010 Regulation of Gastrointestinal Mucosal Growth *Intestinal Architecture and Development*. Morgan & Claypool Life Sciences.

REID A.E., 2001 « Nonalcoholic steatohepatitis », *Gastroenterology*, 121, 3 : 710-723.

- REYGNER J., L. LICHTENBERGER, G. ELMHIRI, S. DOU, N. BAHJ-JABER, L. RHAZI, F. DEPEINT, V. BACH, H. KHORSI-CAUET et L. ABDENNEBI-NAJAR, 2016 « Inulin Supplementation Lowered the Metabolic Defects of Prolonged Exposure to Chlorpyrifos from Gestation to Young Adult Stage in Offspring Rats », *PLoS One*, 11, 10 : e0164614.
- RIBAROFF G.A., E. WASTNEDGE, A.J. DRAKE, R.M. SHARPE et T.J.G. CHAMBERS, 2017 « Animal models of maternal high fat diet exposure and effects on metabolism in offspring: a meta-regression analysis: Maternal HFD and offspring metabolism », *Obesity Reviews*, 18, 6 : 673-686.
- RICCERI L., A. VENEROSI, F. CAPONE, M.F. COMETA, P. LORENZINI, S. FORTUNA et G. CALAMANDREI, 2006 « Developmental Neurotoxicity of Organophosphorous Pesticides: Fetal and Neonatal Exposure to Chlorpyrifos Alters Sex-Specific Behaviors at Adulthood in Mice », *Toxicological Sciences*, 93, 1 : 105-113.
- RODRÍGUEZ J.M., K. MURPHY, C. STANTON, R.P. ROSS, O.I. KOBER, N. JUGE, E. AVERSHINA, K. RUDI, A. NARBAD, M.C. JENMALM, J.R. MARCHESI et M.C. COLLADO, 2015 « The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life », *Microbial Ecology in Health and Disease*, 26.
- RODRÍGUEZ-RAMIRO I., S. RAMOS, L. BRAVO, L. GOYA et M.Á. MARTÍN, 2011 « Procyanidin B2 and a cocoa polyphenolic extract inhibit acrylamide-induced apoptosis in human Caco-2 cells by preventing oxidative stress and activation of JNK pathway », *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 22, 12 : 1186-1194.
- RODRÍGUEZ-RAMIRO I., S. RAMOS, E. LÓPEZ-OLIVA, A. AGIS-TORRES, L. BRAVO, L. GOYA et M.A. MARTÍN, 2013 « Cocoa polyphenols prevent inflammation in the colon of azoxymethane-treated rats and in TNF- α -stimulated Caco-2 cells », *British Journal of Nutrition*, 110, 2 : 206-215.
- ROUHIAINEN A., J. KUJA-PANULA, S. TUMOVA et H. RAUVALA, 2013 « RAGE-Mediated Cell Signaling ». in C. W. Heizmann (dir.): *Calcium-Binding Proteins and RAGE*. Methods in Molecular Biology. 239-263. Totowa, NJ, Humana Press.

S

- SADLER N.C., B.-J.M. WEBB ROBERTSON, T.R. CLAUSS, J.G. POUNDS, R. CORLEY et A.T. WRIGHT, 2018 « High-fat diets alter the modulatory effects of xenobiotics on cytochrome P450 activities », *Chemical research in toxicology*, 31, 5 : 308-318.
- SALDANA T.M., O. BASSO, J.A. HOPPIN, D.D. BAIRD, C. KNOTT, A. BLAIR, M.C.R. ALAVANJA et D.P. SANDLER, 2007 « Pesticide Exposure and Self-Reported Gestational Diabetes Mellitus in the Agricultural Health Study », *Diabetes Care*, 30, 3 : 529-534.
- SALVINI S., M. CHARBONNIER, C. DEFOORT, C. ALQUIER et D. LAIRON, 2002 « Functional characterization of three clones of the human intestinal Caco-2 cell line for dietary lipid processing », *British Journal of Nutrition*, 87, 3 : 211-217.
- SANGHI R., M.K. PILLAI, T.R. JAYALEKSHMI et A. NAIR, 2003 « Organochlorine and organophosphorus pesticide residues in breast milk from Bhopal, Madhya Pradesh, India », *Human & Experimental Toxicology*, 22, 2 : 73-76.
- SARRON E., M. PÉROT, N. BARBEZIER, C. DELAYRE-ORTHEZ, J. GAY-QUÉHEILLARD et P.M. ANTON, 2020 « Early exposure to food contaminants reshapes maturation of the human brain-gut-microbiota axis », *World Journal of Gastroenterology*, 26, 23 : 3145-3169.
- SCHNEIDER C.A., W.S. RASBAND et K.W. ELICEIRI, 2012 « NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis », *Nature Methods*, 9, 7 : 671-675.
- SEO E., E.-J. PARK, M.-K. PARK, D.K. KIM, H.-J. LEE et S.-H. HONG, 2010 « Differential Expression of Metabolism-related Genes in Liver of Diabetic Obese Rats », *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology : Official Journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology*, 14, 2 : 99-103.
- SHI H., M.V. KOKOEVA, K. INOUE, I. TZAMELI, H. YIN et J.S. FLIER, 2006 « TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance », *Journal of Clinical Investigation*, 116, 11 : 3015-3025.

- SHIH H.-C., C.-H. LEE et Y.-H. WEI, 2005 « Differential Gene Expression After Hemorrhagic Shock in Rat Lung », *Journal of the Chinese Medical Association*, 68, 10 : 468-473.
- SILVER N., S. BEST, J. JIANG et S.L. THEIN, 2006 « Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR », *BMC Molecular Biology*, 7 : 33.
- SKURK T., C. ALBERTI-HUBER, C. HERDER et H. HAUNER, 2007 « Relationship between Adipocyte Size and Adipokine Expression and Secretion », *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 92, 3 : 1023-1033.
- SLOOP K.W., J.X.-C. CAO, A.M. SIESKY, H.Y. ZHANG, D.M. BODENMILLER, A.L. COX, S.J. JACOBS, J.S. MOYERS, R.A. OWENS, A.D. SHOWALTER, M.B. BRENNER, A. RAAP, J. GROMADA, B.R. BERRIDGE, D.K.B. MONTEITH, N. PORKSEN, R.A. MCKAY, B.P. MONIA, S. BHANOT, L.M. WATTS et M.D. MICHAEL, 2004 « Hepatic and glucagon-like peptide-1-mediated reversal of diabetes by glucagon receptor antisense oligonucleotide inhibitors », *Journal of Clinical Investigation*, 113, 11 : 1571-1581.
- SLOTKIN T.A., 2004 « Cholinergic systems in brain development and disruption by neurotoxicants: nicotine, environmental tobacco smoke, organophosphates », *Toxicology and Applied Pharmacology*, 198, 2 : 132-151.
- SLOTKIN T.A., 1999 « Developmental cholinotoxicants: nicotine and chlorpyrifos. », *Environmental Health Perspectives*, 107, Suppl 1 : 71-80.
- SLOTKIN T.A., 2011 « Does early-life exposure to organophosphate insecticides lead to prediabetes and obesity? », *Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 31, 3 : 297-301.
- SLOTKIN T.A., K.K. BROWN et F.J. SEIDLER, 2005a « Developmental Exposure of Rats to Chlorpyrifos Elicits Sex-Selective Hyperlipidemia and Hyperinsulinemia in Adulthood », *Environmental Health Perspectives*, 113, 10 : 1291-1294.
- SLOTKIN T.A., T.L. LASSITER, I.T. RYDE, N. WRENCH, E.D. LEVIN et F.J. SEIDLER, 2009 « Consumption of a high-fat diet in adulthood ameliorates the effects of neonatal parathion exposure on

- acetylcholine systems in rat brain regions », *Environmental Health Perspectives*, 117, 6 : 916-922.
- SLOTKIN T.A., C.A. OLIVER et F.J. SEIDLER, 2005b « Critical periods for the role of oxidative stress in the developmental neurotoxicity of chlorpyrifos and terbutaline, alone or in combination », *Developmental Brain Research*, 157, 2 : 172-180.
- SMIRNOVA M.G., L. GUO, J.P. BIRCHALL et J.P. PEARSON, 2003 « LPS up-regulates mucin and cytokine mRNA expression and stimulates mucin and cytokine secretion in goblet cells », *Cellular Immunology*, 221, 1 : 42-49.
- SNAWDER J. et J. CHAMBERS, 1989 « Toxic and developmental effects of organophosphorus insecticides in embryos of the South African clawed frog », *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 24, 3 : 205-218.
- SPEAKMAN J.R., 2019 « Use of high-fat diets to study rodent obesity as a model of human obesity », *International Journal of Obesity*.
- SPENCE J.R., R. LAUF et N.F. SHROYER, 2011 « Vertebrate intestinal endoderm development », *Developmental Dynamics*, 240, 3 : 501-520.
- SRINIVASAN M., S.D. KATEWA, A. PALANIYAPPAN, J.D. PANDYA et M.S. PATEL, 2006 « Maternal high-fat diet consumption results in fetal malprogramming predisposing to the onset of metabolic syndrome-like phenotype in adulthood », *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 291, 4 : E792-E799.
- STEIN D.T., E.E. BABCOCK, C.R. MALLOY et J.D. MCGARRY, 1995 « Use of proton spectroscopy for detection of homozygous fatty ZDF-drt rats before weaning », *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity*, 19, 11 : 804-810.
- STEPIEN M., C. GAUDICHON, G. FROMENTIN, P. EVEN, D. TOMÉ et D.D. AZZOUT-MARNICHE, 2011 « Increasing Protein at the Expense of Carbohydrate in the Diet Down-Regulates Glucose Utilization as Glucose Sparing Effect in Rats », *PLoS ONE*, 6, 2 : np.

SUN Y., J. ZHANG, W. SONG et A. SHAN, 2018 « Vitamin E alleviates phoxim-induced toxic effects on intestinal oxidative stress, barrier function, and morphological changes in rats », *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 26 : 26682-26692.

SUZUKI T. et H. HARA, 2010 « Dietary fat and bile juice, but not obesity, are responsible for the increase in small intestinal permeability induced through the suppression of tight junction protein expression in LETO and OLETF rats », *Nutrition & Metabolism*, 7 : 19.

T

TAKEUCHI M., 2020 « Toxic AGEs (TAGE) theory: a new concept for preventing the development of diseases related to lifestyle », *Diabetology & Metabolic Syndrome*, 12, 1 : 105.

TALBOT P., J.M. RADZIWIŁŁ-BIENKOWSKA, J.B.J. KAMPHUIS, K. STEENKESTE, S. BETTINI, V. ROBERT, M.-L. NOORDINE, C. MAYEUR, E. GAULTIER, P. LANGELLA, C. ROBBE-MASSELOT, E. HOUDEAU, M. THOMAS et M. MERCIER-BONIN, 2018 « Food-grade TiO₂ is trapped by intestinal mucus in vitro but does not impair mucin O-glycosylation and short-chain fatty acid synthesis in vivo: implications for gut barrier protection », *Journal of Nanobiotechnology*, 16.

TAYLOR B.A. et S.J. PHILLIPS, 1996 « Detection of Obesity QTLs on Mouse Chromosomes 1 and 7 by Selective DNA Pooling », *Genomics*, 34, 3 : 389-398.

TCHKONIA T., T. THOMOU, Y. ZHU, I. KARAGIANNIDES, C. POTHOUKAKIS, M.D. JENSEN et J.L. KIRKLAND, 2013 « Mechanisms and Metabolic Implications of Regional Differences among Fat Depots », *Cell metabolism*, 17, 5 : 644-656.

TEL G., M. ÖZTÜRK, M.E. DURU, M. HARMANDAR et G. TOPÇU, 2010 « Chemical composition of the essential oil and hexane extract of *Salvia chionantha* and their antioxidant and anticholinesterase activities », *Food and Chemical Toxicology*, 48, 11 : 3189-3193.

TELLECHEA M.L., M.F. MENEGUE et C.J. PIROLA, 2017 « The Association between High Fat Diet around Gestation and Metabolic Syndrome-related Phenotypes in Rats: A Systematic Review and Meta-Analysis », *Scientific Reports*, 7.

- THABET H., N. BRAHMI, N. KOURAÏCHI, H. ELGHORD et M. AMAMOU, 2009 « Intoxications par les pesticides organophosphorés : nouveaux concepts », *Réanimation*, 18, 7 : 633-639.
- THALHAMER T., M.A. MCGRATH et M.M. HARNETT, 2007 « MAPKs and their relevance to arthritis and inflammation », *Rheumatology*, 47, 4 : 409-414.
- THOMPSON M.D., M.J. CISMOWSKI, A.J. TRASK, S.W. LALLIER, A.E. GRAF, L.K. ROGERS, P.A. LUCCHESI et D.R. BRIGSTOCK, 2016 « Enhanced Steatosis and Fibrosis in Liver of Adult Offspring Exposed to Maternal High-Fat Diet », *Gene expression*, 17, 1 : 47-59.
- TIMCHALK C., A. BUSBY, J.A. CAMPBELL, L.L. NEEDHAM et D.B. BARR, 2007 « Comparative pharmacokinetics of the organophosphorus insecticide chlorpyrifos and its major metabolites diethylphosphate, diethylthiophosphate and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol in the rat », *Toxicology*, 237, 1-3 : 145-157.
- TIMCHALK C., R.J. NOLAN, A.L. MENDRALA, D.A. DITTENBER, K.A. BRZAK et J.L. MATTSSON, 2002 « A Physiologically Based Pharmacokinetic and Pharmacodynamic (PBPK/PD) Model for the Organophosphate Insecticide Chlorpyrifos in Rats and Humans », *Toxicological Sciences*, 66, 1 : 34-53.
- TIRELLI V., T. CATONE, L. TURCO, E. DI CONSIGLIO, E. TESTAI et I. DE ANGELIS, 2007a « Effects of the pesticide clorpyrifos on an in vitro model of intestinal barrier », *Toxicology in Vitro*, 21, 2 : 308-313.
- TOM B.H., L.P. RUTZKY, M.M. JAKSTYS, R. OYASU, C.I. KAYE et B.D. KAHAN, 1976 « Human colonic adenocarcinoma cells. I. Establishment and description of a new line », *In Vitro*, 12, 3 : 180-191.
- TURCO L., T. CATONE, F. CALONI, E.D. CONSIGLIO, E. TESTAI et A. STAMMATI, 2011 « Caco-2/TC7 cell line characterization for intestinal absorption: How reliable is this in vitro model for the prediction of the oral dose fraction absorbed in human? », *Toxicology in Vitro*, 25, 1 : 13-20.

TURPIN W., C. HUMBLLOT, M.-L. NOORDINE, L. WRZOSEK, J. TOMAS, C. MAYEUR, C. CHERBUY, J.-P. GUYOT et M. THOMAS, 2013 « Behavior of Lactobacilli Isolated from Fermented Slurry (bensaalga) in Gnotobiotic Rats », *PLoS ONE*, 8, 4.

U

UBAID UR RAHMAN H., W. ASGHAR, W. NAZIR, M.A. SANDHU, A. AHMED et N. KHALID, 2021 « A comprehensive review on chlorpyrifos toxicity with special reference to endocrine disruption: Evidence of mechanisms, exposures and mitigation strategies », *Science of The Total Environment*, 755 : 142649.

V

VAGUE J., 1996 « A Determinant Factor of the Forms of Obesity », *Obesity Research*, 4, 2 : 201-203.

VAIRO P., G. PAOLELLA et A. FASANO, 2013 « Microbiota and gut-liver axis: a mini-review on their influences on obesity and obesity related liver disease », *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 56, 5 : 461-468.

VAN DE WALLE J., A. HENDRICKX, B. ROMIER, Y. LARONDELLE et Y.-J. SCHNEIDER, 2010 « Inflammatory parameters in Caco-2 cells: Effect of stimuli nature, concentration, combination and cell differentiation », *Toxicology in Vitro* : 9.

VANDENBERG L.N., W.V. WELSHONS, F.S. VOM SAAL, P.-L. TOUTAIN et J.P. MYERS, 2014 « Should oral gavage be abandoned in toxicity testing of endocrine disruptors? », *Environmental Health*, 13 : 46.

VANDESOMPELE J., K. DE PRETER, F. PATTYN, B. POPPE, N. VAN ROY, A. DE PAEPE et F. SPELEMAN, 2002 « Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes », *Genome Biology*, 3 : research0034.

VELMURUGAN G., T. RAMPRASATH, K. SWAMINATHAN, G. MITHIEUX, J. RAJENDHRAN, M. DHIVAKAR, A. PARTHASARATHY, D.D.V. BABU, L.J. THUMBURAJ, A.J. FREDDY, V. DINAKARAN, S.S.M. PUHARI, B. REKHA, Y.J. CHRISTY, S. ANUSHA, G. DIVYA, K. SUGANYA, B. MEGANATHAN, N. KALYANARAMAN, V. VASUDEVAN, R. KAMARAJ, M. KARTHIK, B. JEYAKUMAR, A. ABHISHEK, E. PAUL, M. PUSHPANATHAN, R.K. RAJMOHAN, K. VELAYUTHAM, A.R. LYON et S. RAMASAMY, 2017 « Gut microbial degradation of organophosphate insecticides-induces glucose intolerance via gluconeogenesis », *Genome Biology*, 18, 1 : 8.

VIDA M., P. RIVERA, A.L. GAVITO, J. SUÁREZ, F.J. PAVÓN, S. ARRABAL, M. ROMERO-CUEVAS, D. BAUTISTA, A. MARTÍNEZ, F.R. DE FONSECA, A. SERRANO et E. BAIXERAS, 2014 « CB1 Blockade Potentiates Down-Regulation of Lipogenic Gene Expression in Perirenal Adipose Tissue in High Carbohydrate Diet-Induced Obesity », *PLoS ONE*, 9, 2.

VISMAYA et P.S. RAJINI, 2014 « Oral exposure to the organophosphorus insecticide, Monocrotophos induces intestinal dysfunction in rats », *Food and Chemical Toxicology*, 71 : 236-243.

W

WAKEMAN D., J.E. SCHNEIDER, J. LIU, W.S. WANDU, C.R. ERWIN, J. GUO, T.S. STAPPENBECK et B.W. WARNER, 2012 « Deletion of p38-alpha MAPK within the Intestinal Epithelium Promotes Colon Tumorigenesis », *Surgery*, 152, 2 : 286-293.

WALTER E., S. JANICH, B.J. ROESSLER, J.M. HILFINGER et G.L. AMIDON, 1996 « HT29-MTX/Caco-2 Cocultures as an in Vitro Model for the Intestinal Epithelium: In Vitro–in Vivo Correlation with Permeability Data from Rats and Humans », *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 85, 10 : 1070-1076.

WANG N., H. WANG, H. YAO, Q. WEI, X.-M. MAO, T. JIANG, J. XIANG et N. DILA, 2013 « Expression and activity of the TLR4/NF-κB signaling pathway in mouse intestine following administration of a short-term high-fat diet », *Experimental and Therapeutic Medicine*, 6, 3 : 635-640.

- WANG Y., J. ZHANG, X. YI et F.-S.X. YU, 2004 « Activation of ERK1/2 MAP kinase pathway induces tight junction disruption in human corneal epithelial cells », *Experimental Eye Research*, 78, 1 : 125-136.
- WANG Z., Z. BAO, Y. DING, S. XU, R. DU, J. YAN, L. LI, Z. SUN, C. SHAO et W. GU, 2019 « Nε-carboxymethyl-lysine-induced PI3K/Akt signaling inhibition promotes foam cell apoptosis and atherosclerosis progression », *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 115 : 108880.
- WANKHADE U.D., Y. ZHONG, P. KANG, M. ALFARO, S.V. CHINTAPALLI, B.D. PICCOLO, K.E. MERCER, A. ANDRES, K.M. THAKALI et K. SHANKAR, 2018 « Maternal High-Fat Diet Programs Offspring Liver Steatosis in a Sexually Dimorphic Manner in Association with Changes in Gut Microbial Ecology in Mice », *Scientific Reports*, 8, 1 : 16502.
- WHITAKER R.C. et W.H. DIETZ, 1997 « Predicting Obesity in Young Adulthood from Childhood and Parental Obesity », *The New England Journal of Medicine* : 5.
- WHYATT R.M., D. CAMANN, F.P. PERERA, V.A. RAUH, D. TANG, P.L. KINNEY, R. GARFINKEL, H. ANDREWS, L. HOEPNER et D.B. BARR, 2005 « Biomarkers in assessing residential insecticide exposures during pregnancy and effects on fetal growth », *Toxicology and Applied Pharmacology*, 206, 2 : 246-254.
- WHYATT R.M., V. RAUH, D.B. BARR, D.E. CAMANN, H.F. ANDREWS, R. GARFINKEL, L.A. HOEPNER, D. DIAZ, J. DIETRICH, A. REYES, D. TANG, P.L. KINNEY et F.P. PERERA, 2004 « Prenatal Insecticide Exposures and Birth Weight and Length among an Urban Minority Cohort », *Environmental Health Perspectives*, 112, 10 : 1125-1132.
- WIGG A., I. ROBERTS-THOMSON, R. DYMOCK, P. MCCARTHY, R. GROSE et A. CUMMINS, 2001 « The role of small intestinal bacterial overgrowth, intestinal permeability, endotoxaemia, and tumour necrosis factor α in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis », *Gut*, 48, 2 : 206-211.
- WIKMAN-LARHED A. et P. ARTURSSON, 1995 « Co-cultures of human intestinal goblet (HT29-H) and absorptive (Caco-2) cells for studies of drug and peptide absorption », *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 3, 3 : 171-183.

WILLETT W.C., 1995 « Weight, weight change, and coronary heart disease in women. Risk within the “normal” weight range », *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 273, 6 : 461-465.

WRIGLEY S., D. ARAFA et D. TROPEA, 2017 « Insulin-Like Growth Factor 1: At the Crossroads of Brain Development and Aging », *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11.

X

XIE F., P. XIAO, D. CHEN, L. XU et B. ZHANG, 2012 « miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs », *Plant Molecular Biology*, 80, 1 : 75-84.

XU L.-X., Y. LV, Y.-H. LI, X. DING, Y. WANG, X. HAN, M.-H. LIU, B. SUN et X. FENG, 2017 « Melatonin alleviates brain and peripheral tissue edema in a neonatal rat model of hypoxic-ischemic brain damage: the involvement of edema related proteins », *BMC Pediatrics*, 17.

XUE Y., H. WANG, M. DU et M.-J. ZHU, 2014 « Maternal obesity induces gut inflammation and impairs gut epithelial barrier function in non-obese diabetic (NOD) mice », *The Journal of nutritional biochemistry*, 25, 7 : 758-764.

Y

YADAV I. et N. DEVI, 2017 « Pesticides Classification and Its Impact on Human and Environment ». *in* 140-158.

YANG R.-B., M.R. MARK, A. GRAY, A. HUANG, M.H. XIE, M. ZHANG, A. GODDARD, W.I. WOOD, A.L. GURNEY et P.J. GODOWSKI, 1998 « Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling », *Nature*, 395, 6699 : 284-288.

YIU J.H.C., B. DORWEILER et C.W. WOO, 2017 « Interaction between gut microbiota and toll-like receptor: from immunity to metabolism », *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, 95, 1 : 13-20.

YOUSEF M.I., T.I. AWAD et E.H. MOHAMED, 2006 « Deltamethrin-induced oxidative damage and biochemical alterations in rat and its attenuation by Vitamin E », *Toxicology*, 227, 3 : 240-247.

Z

ZHANG Q., X. XIAO, J. ZHENG, M. LI, M. YU, F. PING, T. WANG et X. WANG, 2018a « Liraglutide protects cardiac function in diabetic rats through the PPAR α pathway », *Bioscience Reports*, 38, 2.

ZHANG Y., Y. CHANG, H. CAO, W. XU, Z. LI et L. TAO, 2018b « Potential threat of Chlorpyrifos to human liver cells via the caspase-dependent mitochondrial pathways », *Food and Agricultural Immunology*, 29, 1 : 294-305.

ZHAO Q., B. GADAGBUI et M. DOURSON, 2005 « Lower birth weight as a critical effect of chlorpyrifos: A comparison of human and animal data », *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 42, 1 : 55-63.

ZHOU Z., C. BIAN, Z. LUO, C. GUILLE, E. OGUNRINDE, J. WU, M. ZHAO, S. FITTING, D.L. KAMEN, J.C. OATES, G. GILKESON et W. JIANG, 2019 « Progesterone decreases gut permeability through upregulating occludin expression in primary human gut tissues and Caco-2 cells », *Scientific Reports*, 9.

ZOUITEN-MEKKI L., M. SERGHINI, M. FEKIH, L. KALLEL, S. MATRI, N.B. MUSTAPHA, J. BOUBAKER et A. FILALI, 2013 « Rôle de la cellule épithéliale dans l'homéostasie intestinale et les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin », *médecine/sciences*, 29, 12 : 1145-1150.

ZUCKERMAN A.J., 1995 « IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans », *Journal of Clinical Pathology*, 48, 7 : 691-691.

DE ZWART L.L., H.E.M.G. HAENEN, C.H.M. VERSANTVOORT, G. WOLTERINK, J.G.M. VAN ENGELEN et A.J.A.M. SIPS, 2004 « Role of biokinetics in risk assessment of drugs and chemicals in children », *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 39, 3 : 282-309.

RESUME

L'exposition maternelle aux résidus de pesticides alimentaires et/ou à une alimentation déséquilibrée induirait des risques pour la descendance à l'âge adulte à développer une obésité et des troubles métaboliques. Une perturbation associée de la fonction hépatique et/ou de l'homéostasie intestinale engendrerait de graves problèmes de santé.

Nous avons évalué les conséquences d'une exposition de rates de 4 mois avant la conception jusqu'à la fin de la lactation à un pesticide organophosphoré, le chlorpyrifos (CPF) et à un régime obésogène (HFD) sur la descendance mâle. Nous avons observé à l'âge adulte (60 jours) des perturbations de la mise en place de la barrière intestinale et des fonctions métaboliques hépatiques. En parallèle, nous avons développé un modèle de co-culture de cellules épithéliales intestinales humaines (Caco-2/TC7 & HT29-MTX), afin de mimer les effets du CPF sur la barrière muqueuse intestinale humaine.

Une exposition péri-gestationnelle au CPF induit des altérations de la barrière épithéliale intestinale et une diminution de la néoglucogénèse et de la lipogénèse *de novo* hépatiques chez la descendance à l'âge adulte. Le HFD entraîne les mêmes effets sans les aggraver. Le CPF augmente l'expression des gènes des protéines des jonctions serrées mais n'induit ni réponse inflammatoire ni augmentation de la perméabilité intestinale *in vitro*. L'exposition *in utero* au pesticide ou à un régime déséquilibré modifie donc le métabolisme des nouveau-nés qui pourraient, à l'âge adulte, développer des complications métaboliques et/ou avoir des répercussions sur d'autres fonctions physiologiques à l'origine de maladies chroniques non communicables.

Mots clés : pesticides organophosphorés – obésité – barrière intestinale - troubles métaboliques – métabolisme hépatique – périnatalité

ABSTRACT

Maternal exposure to food pesticide residues and/or an obesogenic diet could be at the origin of obesity and metabolic disorders in progeny at adulthood. Disturbances of liver metabolism and/or of intestinal homeostasis may predispose to serious problems in overall health.

We have, on one hand, evaluated the consequences of exposure of dams to chlorpyrifos (CPF) or to an obesogenic diet (HFD) from 4 months before conception to the end of lactation on their male rat offspring. We have observed in the offspring at adulthood (60 days) alterations of the intestinal barrier and of hepatic metabolic functions. We have concomitantly developed a co-culture model of human intestinal epithelial cells (Caco-2/TC7 & HT29-MTX), in order to mimic the effects of CPF on human intestinal barrier.

Perigestational exposure to CPF induces deleterious effects in the offspring at adulthood, especially in terms of the epithelial barrier settlement but also a decrease in gluconeogenesis and *de novo* lipogenesis in the liver. The obesogenic diet has the same consequences without increasing them. The pesticide increases gene expression of tight-junction proteins but does not induce any inflammatory response nor intestinal permeability alterations. *In utero* exposure to a pesticide or to an unbalanced diet therefore disrupts the metabolism of newborns, which could, at adulthood, develop metabolic complications and repercussions on other physiological functions at the origin of non-communicable chronic diseases.

Key words: pesticides – obesity – intestinal barrier - metabolic disorders – hepatic metabolism – perinatal